

Aus dem Institut für Pathologie

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

Immunologisches Mikromilieu von Vorläuferläsionen des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marie Schulte

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Irene Esposito

Zweitgutacher: Herr Prof. Dr. Nikolas Stoecklein

Für meine Familie

Zusammenfassung (deutsch)

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist eine sehr aggressive Krankheit mit einer schlechten Prognose. Die immunologische Mikroumgebung spielt bekanntermaßen eine ausschlaggebende Rolle im biologischen Verhalten des PDAC. Während in den letzten Jahren zunehmend Wissen zu den molekularen Eigenschaften der Vorläuferläsionen des PDACs gewonnen wurde, fehlt nach wie vor ein detailliertes Verständnis des Immunmikromilieus der Vorläuferläsionen.

Ziel war es daher, das immunologische Mikromilieu von Vorläuferläsionen des PDAC zu charakterisieren, um frühe Veränderungen zu detektieren, welche einen Einfluss auf die Entwicklung des Pankreaskarzinoms haben könnten.

Tissue Microarrays (TMAs) von gastralen, intestinalen und pankreatobiliären intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN, n=50), einer intraduktalen onkozytär-papillären Neoplasie (IOPN, n=1), pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN, n=32), muzinös-zystischen Neoplasien (MCN, n=9), azinär-duktaalen Metaplasien (ADM, n=16) und normalem Pankreasgewebe (n=69) sowie PDAC (n=44) von insgesamt n=76 Patient:innen wurden erstellt. Immunzellen wurden mithilfe des OPAL™7 Multiplex-Immunfluoreszenz Ansatzes, basierend auf Tyramid-Signalamplifikation, gefärbt, wodurch eine simultane Detektion von multiplen Markern (CD3, CD4, CD8, FoxP3, PD1, CD20, CD68, CD163, Tryptase und Granzyme B) innerhalb desselben Gewebes gewährleistet werden kann. Nach Normalisierung auf DAPI+Zellen wurde die Zellfluoreszenz mittels ImageJ Software durch individuell codierte Makros für jeden Zelltyp mit automatisierter Signaldetektion gezählt.

Während PDAC-Proben eine eher immunsuppressive Umgebung mit erhöhter Anzahl an CD68+/CD163+ M2-Makrophagen sowie FoxP3+ regulatorischen T-Zellen zeigte, waren ADM, PanIN und gastrale IPMN eher durch ein immunaktives Mikromilieu mit starker Zellinfiltration, vor allem durch CD3+/CD8+ zytotoxische T-Zellen, charakterisiert. MCN sowie intestinale IPMN zeigten unabhängig vom Dysplasiegrad niedrigere Level an Immunzellinfiltration.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das immunologische Mikromilieu von Vorläuferläsionen des PDACs sehr dynamisch und heterogen ist, was suggeriert, dass verschiedene immunologische Abläufe eine Rolle in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms spielen.

Zusammenfassung (englisch)

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a highly aggressive disease with a poor prognosis. Its immunological landscape is known to play a pivotal role in the biological behavior of PDAC. While an increasing knowledge on molecular features of PDAC precursors has been gained in recent years, the immunological microenvironment of PDAC precursor lesions is still lacking a detailed characterization.

We aimed to characterize the immunological microenvironment of PDAC precursor lesions in order to detect early changes that could have an influence on the development of pancreatic cancer.

Tissue microarrays of gastric, intestinal and pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN, n=50), intraductal oncocytic papillary neoplasms (IOPN, n=1), pancreatic intraepithelial neoplasias (PanIN, n=32), mucinous cystic neoplasms (MCN, n=9), acinar-to-ductal metaplasia (ADM, n=16), normal pancreatic tissues (n=69) and PDAC (n=44) from n=76 patients in total were constructed. Immune cells were stained using the OPAL™7 multiplexed immunofluorescence approach based on tyramide signal amplification to guarantee simultaneous detection of multiple markers (CD3, CD4, CD8, FoxP3, PD1, CD20, CD68, CD163, Tryptase and Granzyme B) within the same tissue. We counted cell fluorescence by running individually coded macros for each cell type with automated signal detection and normalized to DAPI+ cells using ImageJ software.

While PDAC samples showed a more immunosuppressive landscape with increased numbers of CD68+/CD163+ M2 macrophages as well as FoxP3+ regulatory T-cells, ADM, PanIN and gastric IPMN were characterized by a rather immunoactive landscape, with the highest level of immune cell infiltration mainly consisting of CD3+/CD8+ cytotoxic T cells. Intestinal IPMN and MCN displayed lower levels of immune cell infiltration, independently from the degree of dysplasia.

Our results show that the immunological microenvironment of PDAC precursor lesions is highly dynamic and heterogenous, suggesting that different immunological mechanisms play a role in pancreatic tumorigenesis.

Abkürzungsverzeichnis

ADM.....	Azinär-duktales Metaplasie
Arg1	Arginase-1
Bregs	Regulatorische B-Zellen, <i>regulatory B cells</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAFs.....	Krebsassoziierte Fibroblasten, <i>cancer associated fibroblasts</i>
CD	Cluster of differentiation
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A
CK.....	Cytokeratin
CSF-1R.....	Colony-stimulating factor 1 receptor
CTLA-4	Cytotoxic-T-lymphocyte associated protein 4
CTLs	Zytotoxische T-Zellen, <i>cytotoxic T lymphocytes</i>
DAB	DAB3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA.....	Hyaluronan
IFN-γ.....	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IOPN.....	Intraduktales onkozytär-papilläre Neoplasie
IPMN.....	Intraduktales papillär-muzinöse Neoplasie
JAK	Januskinase
KRAS.....	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LTS	Langzeitüberlebende, long term survivors
MCN	Muzinös zystische Neoplasie, <i>mucinous cystic neoplasm</i>
MDSCs	Myeloide Suppressorzellen, <i>myeloid derived suppressor cells</i>
MHC-I	Major Histocompatibility Complex-I
mIHC	Multiplex-Immunhistochemie
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MUC	Mucin
NBF	Neutral buffered Formalin
NK.....	Natural killer (cells)
Non-LTS	Nicht-Langzeitüberlebende, <i>non-long term survivors</i>
NOS.....	Stickstoffmonoxid-Synthase
PanIN.....	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	Programmed cell death protein-1
PDAC.....	Duktales Adenokarzinom des Pankreas, <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PSCs	Pankreatische Stellatumzellen, <i>pancreatic stellate cells</i>

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
Shh	Sonic Hedgehog
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAMs	Tumorassoziierte Makrophagen, <i>tumor associated macrophages</i>
TBS-T	Tris-buffered saline - Tween
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGFβ	Tumor growth factor beta
TH-Zellen	T-Helferzellen
TMA	Tissue Microarray
TME	Tumormikromilieu, <i>Tumor microenvironment</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	tumor protein 53
Tregs	Regulatorische T-Zellen, <i>regulatory T cells</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Tyramide Signal Amplification
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, <i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumormikromilieu	1
1.1.1	Tumorstroma	1
1.1.2	Immunmikromilieu	1
1.2	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	2
1.2.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	2
1.2.2	Diagnostik und Therapie	2
1.2.3	Mikromilieu	3
1.2.3.1	Krebs-assoziierte Fibroblasten	4
1.2.3.2	Pankreatische Stellatumzellen.....	4
1.2.3.3	Immunzellen	5
1.2.3.4	Extrazelluläre Matrix und Angiogenese	7
1.3	Vorläuferläsionen	8
1.3.1	Azinär-Duktales Metaplasie (ADM)	8
1.3.2	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN).....	9
1.3.3	Intraduktales Papillär-Muzinöse Neoplasie (IPMN).....	11
1.3.3.1	Gastrale IPMN	12
1.3.3.2	Intestinale IPMN	13
1.3.3.3	Pankreatobiliäre IPMN.....	13
1.3.4	Intraduktales Onkozytär-Papilläre Neoplasie (IOPN).....	13
1.3.5	Muzinös-zystische Neoplasie (MCN)	14
1.4	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2	Chemikalien.....	16
2.1.3	Puffer.....	16
2.1.4	Geräte und Ausrüstung	17
2.1.5	Kits	18

2.1.6	Antikörper	18
2.1.7	Software	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Kollektiv	19
2.2.2	Schneiden der Paraffinblöcke	19
2.2.3	Immunhistochemie	20
2.2.4	Tissue Microarrays	21
2.2.5	Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie	22
2.2.6	Datenverarbeitung	26
2.2.7	Statistische Auswertung	27
2.3	Ethikvotum.....	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Etablierung der Antikörper.....	29
3.2	Deskriptive Analyse der Patient:innencharakteristika	31
3.3	Testung auf Normalverteilung	32
3.4	Zellen der angeborenen Immunantwort	32
3.5	Zellen der erworbenen Immunantwort.....	36
4	Diskussion	47
4.1	Rolle von Makrophagen in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms....	47
4.2	Rolle von Mastzellen in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms	48
4.3	Rolle der T- und B-Zell-vermittelten Immunreaktion in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms	49
4.4	Rolle der CD8+ - und CD4+ T-Zellen in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms	50
4.5	Unterschiede zwischen low- und high grade PanIN und IPMN Läsionen	52
4.6	Heterogenität der Immunantwort in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms	53
4.7	Anwendbarkeit im klinischen Alltag	53
4.8	Technische Herausforderungen und Limitationen der Arbeit	55
4.9	Schlussfolgerung und Ausblick	57
5	Literatur – und Quellenverzeichnis.....	59

6	Tabellenverzeichnis.....	77
7	Abbildungsverzeichnis.....	78
8	Anhang.....	82

1 Einleitung

1.1 Tumormikromilieu

1.1.1 Tumorstroma

Das Stroma ist das stützende Bindegewebe eines Organs. Vergleichbar mit gesundem Gewebe umfassen auch einige Tumore neben ihrem parenchymatösen Anteil ein Tumorstroma (sogenanntes desmoplastisches Stroma bzw. sogenannte Desmoplasie). Es besteht einerseits aus nicht-malignen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten und Immunzellen sowie Blut- und Lymphgefäßen und andererseits aus extrazellulären Matrixmolekülen wie Kollagen, Fibrin und Proteoglykanen. Zunehmend wird deutlich, dass dem Stroma eine große Rolle hinsichtlich des Tumorüberlebens und Tumorwachstums zukommt und es damit auch als potentiell therapeutisches Ziel von Interesse ist (1,2). So können Tumorzellen ihre Mikroumgebung mitunter durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen modulieren, wodurch sich die Zellen des Mikromilieus anpassen und die Tumorprogression- und Metastasierung unterstützen (3). Aber auch die extrazelluläre Matrix (EZM) als nicht-zelluläre Komponente des Stromas ist sehr dynamisch und unterliegt einem konstanten *remodeling*, also einem kontinuierlichen Prozess der Transformation und des Umbaus. Eine Dysregulation dieser Vorgänge kann ebenso die Entstehung und Entwicklung maligner Erkrankungen begünstigen (4). Gleichzeitig existieren auch Daten, die bekräftigen, dass Stromabestandteile einen inhibierenden Einfluss auf die Tumorprogression haben können (5).

1.1.2 Immunmikromilieu

Immunzellen sind eine weitere wichtige Komponente der Tumormikroumgebung. Neben den Zellen der angeborenen Immunantwort, wie den Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, *Natural-Killer-Zellen* und myeloiden Suppressorzellen, sind auch die Zellen der adaptiven Immunantwort, also die T- und B-Lymphozyten, von großer Bedeutung für die Tumorprogression (3). Die Kommunikation der Immunzellen miteinander erfolgt entweder direkt oder vermittelt durch Zytokin- und Chemokinfreisetzung. In Abhängigkeit der Anzahl und des Aktivierungsstadiums der Immunzellen sowie der Freisetzung verschiedener immunmodulierender Faktoren können Immunzellen einerseits eine antitumorale Immunität bewirken, aber andererseits auch ein tumorförderndes Milieu begünstigen (6–8).

1.2 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Mit kontinuierlich steigender Inzidenz ist das duktale Adenokarzinom des Pankreas (= *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) weltweit die siebthäufigste krebsassoziierte Todesursache (9). In den Vereinigten Staaten bildet das PDAC mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 11% derzeit die vierthäufigste Mortalitätsursache unter allen Krebsarten ab und wird voraussichtlich bis 2030 aufgrund weiter zunehmender Todeszahlen dort sogar an zweiter Stelle stehen (10,11). Diese Fakten unterstreichen die schlechte Prognose des PDAC und machen den dringenden Bedarf nach neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen deutlich. In stärker entwickelten Ländern sind die Inzidenzen des dukталen Pankreaskarzinoms im Vergleich zu entwicklungsschwächeren Ländern drei- bis vierfach erhöht, Männer sind zudem etwas häufiger betroffen als Frauen (9,10).

Viele verschiedene Risikofaktoren konnten bereits für das duktale Pankreaskarzinom determiniert werden. Hierzu gehören einerseits Lifestyle-Aspekte wie Alkoholkonsum (12), Nikotinabusus (13) und Übergewicht (14) sowie bestimmte Ernährungsgewohnheiten, insbesondere der Konsum von rotem oder stark verarbeitetem Fleisch (15,16). Andererseits spielen auch nicht direkt modifizierbare Aspekte eine Rolle. Dazu zählen ein höheres Lebensalter (17), Diabetes mellitus (18), eine positive Familienanamnese (19,20), genetische Prädisposition (21) und die chronische Pankreatitis (22,16).

1.2.2 Diagnostik und Therapie

Das PDAC zählt auch bedingt durch Schwierigkeiten in der Diagnostik und Therapie zu einer der aggressivsten und tödlichsten Tumorentitäten.

Eines der vordergründigen Probleme ist die oftmals späte Diagnosestellung aufgrund fehlender Symptomatik in der frühen Erkrankungsphase. In der Regel kommt es erst im weiter fortgeschrittenen Krankheitsverlauf zu teilweise unspezifischen Anzeichen wie Bauch- oder Rückenschmerzen, Gewichtsverlust oder schmerzlosem, obstruktionsbedingtem Ikterus (23–25). Gleichzeitig erscheinen unter Nutzen-Risiko-Abwägung bildgebende oder interventionelle Früherkennungsmaßnahmen nur in einer vordefinierten Hochrisikogruppe, wie bei familiär gehäuftem Auftreten eines PDAC, sinnvoll. Klinisch sinnvoll einsetzbare Tumormarker für Screeningzwecke konnten bisher nicht identifiziert werden (24,26,27).

Die einzig potentiell kurative Therapie des Pankreaskarzinoms ist derzeit die chirurgische Resektion (28). In der Regel erfolgt daraufhin eine Chemotherapie mit Gemcitabin, gegebenenfalls in Kombination mit Capecitabin (29,30). Alternativ stehen 5-Fluoruracil bei Gemcitabin-Unverträglichkeit (31) oder mFOLFIRINOX, ein Kombinationsschema mit den Wirkstoffen Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin zur Verfügung. Das mFOLFIRINOX-Schema ist durch die höhere Toxizität nur für Patient:innen in gutem Allgemeinzustand geeignet (29). Allerdings werden nur ca. 13% der Fälle in einem lokal begrenzten, primär operablen Tumorstadium diagnostiziert, bei knapp der Hälfte der Patient:innen liegt bei Diagnosestellung bereits ein metastasierter Zustand vor (10). Forschungsansätze, die sich auf bekannte Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms fokussieren, stellen daher einen wichtigen Ansatzpunkt dar, um Einblicke in die Progression dieses Malignoms zu erhalten und perspektivisch Strategien zur früheren Detektion zu erarbeiten.

1.2.3 Mikromilieu

Das Tumormikromilieu (TME) spielt in der Entstehung und Entwicklung des PDAC eine entscheidende Rolle. Hierzu gehören zelluläre Bestandteile wie krebsassoziierte Fibroblasten (CAFs), pankreatische Stellatumzellen (*pancreatic stellate cells*, PSCs), Immunzellen, sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix (32–34). Zwei wesentliche Mechanismen charakterisieren dabei das TME des PDAC: Desmoplasie und ausgeprägte Immunsuppression (32).

Desmoplasie, also eine ausgedehnte tumorassoziierte Fibrose, entsteht durch eine Überexpression von extrazellulären Matrixmolekülen (35), welche beispielsweise von im Rahmen der Tumorigenese aktivierten PSCs sezerniert werden (36). Es gibt viele Hinweise darauf, dass das Stroma die Tumorprogression unterstützt. So kann das desmoplastische Stroma beispielsweise eine Chemotherapie-Resistenz bedingen und ist daher mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (37).

Andererseits gibt es Studien, die darauf hindeuten, dass Bestandteile des Tumorstromas das Tumorwachstum auch potenziell hemmen können. Beispielsweise konnten Rhim et al. anhand eines Mausmodells demonstrieren, dass durch Deletion des Liganden *Sonic hedgehog* (Shh), welcher im PDAC unter anderem ein erhöhtes Stromawachstum verursacht, Pankreaskarzinome zwar ein vermindertes Stroma aufwiesen, aber in der Konsequenz deutlich aggressiver waren und stärker proliferierten (38).

Gleichzeitig ist das PDAC bekannt für sein immunsuppressives Mikromilieu. Es ist beispielsweise beschrieben, dass die *Major-Histocompatibility-Complex-I-* (MHC-I) Expression im PDAC erniedrigt ist, wodurch Tumorzellen nicht von CD8+ T-Zellen erkannt werden und dem Immunsystem entfliehen können (39,40), obwohl CD8+ T-Zellen eigentlich von großer Bedeutung für die Bekämpfung von Tumorzellen sind und hohe Level an CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der Nähe von Pankreastumorzellen mit einem verbesserten Patient:innenüberleben einhergehen (41).

Eine Übersicht über die verschiedenen Komponenten des Mikromilieus im Pankreaskarzinom und seinen Vorläuferläsionen ist in Abb. 1 dargestellt. Weitere Ausführungen zu den einzelnen Bestandteilen des Mikromilieus finden sich in den folgenden Abschnitten.

1.2.3.1 Krebs-assoziierte Fibroblasten

Krebs-assoziierte Fibroblasten (cancer-associated fibroblasts, CAFs) stellen die wichtigste zelluläre Komponente des TMEs dar und sind entscheidend für die Entstehung des desmoplastischen Stromas im PDAC. Sie können bis zu 90% der Tumormasse in Pankreaskarzinomen ausmachen (42). Es lässt sich zwischen krebsfördernden (= *promoting*) pCAFs und krebshemmenden (= *restraining*) rCAFs unterscheiden (43).

pCAFs sind an verschiedenen Prozessen, wie der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), Tumorzellmigration und -invasion sowie Metastasierung und Angiogenese beteiligt (42,44,45).

rCAFs sind bisher noch weniger gut verstanden und charakterisiert. Eine Hypothese ist, dass pCAFs aus rCAFs hervorgehen. Es ist aber auch möglich, dass beide Subpopulationen einen unterschiedlichen Ursprung aufweisen (43).

1.2.3.2 Pankreatische Stellatumzellen

Pankreatische Stellatumzellen (PSCs) sind myofibroblasten-ähnliche Zellen im exokrinen Teil des Pankreas (46). Im gesunden Pankreasgewebe sind sie unter anderem für die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) verantwortlich und damit für den Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix (47). Während der Karzinogenese kommt es zur Aktivierung der PSCs, wodurch sie proliferieren (46) und über verschiedene Signalwege, beispielsweise Interleukin6-JAK-STAT-vermittelt oder über den *Sonic-Hedgehog*-Signalweg, zu Desmoplasie führen können (48). Über die Sekretion des Chemokins

CXCL12 können PSCs auch die CD8+ T-Zellmigration in das Tumorstroma vermindern und so eine immunsuppressive Wirkung ausüben (49).

1.2.3.3 Immunzellen

Myeloide Suppressorzellen (MDSCs) stellen eine heterogene Gruppe unreifer myeloider Zellen dar (50). Bei Patient:innen mit PDAC konnten erhöhte Level an MDSCs im peripheren Blut festgestellt werden, was ein prädiktiver Marker für ein Chemotherapieversagen sein könnte (51). MDSCs können mitunter durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oxidativen Stress in T-Zellen verursachen und so eine immunsuppressive Wirkung entfalten (52). Durch Depletion der Aminosäure L-Arginin mittels der Enzyme Arginase-1 (Arg-1) und NO-Synthase (NOS) können MDSCs außerdem die Vermehrung von T-Zellen hemmen (53).

Makrophagen sind eine heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichen funktionellen und phänotypischen Besonderheiten (54). Sie können – vermittelt durch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, Zytokine wie IL-3 und Chemokine wie CXCL12 und CCL2 – zu **Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs)** differenzieren (55,56). TAMs lassen sich in M1- und M2-Makrophagen unterteilen. M1-Makrophagen haben durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine eine tumorizide Wirkung, während M2-Makrophagen über die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine die Tumorprogression unterstützen (54,57). Ähnlich wie MDSCs können TAMs über Expression von Arginin-1 in den Metabolismus von T-Zellen eingreifen (58) sowie über die Freisetzung von *Transforming Growth Factor beta* (TGFβ), IL-10 und Prostaglandin E2 (PGE2) regulatorische T-Zellen (Tregs) rekrutieren und CD8+T-Zellfunktionen hemmen (59). Das Gesamtüberleben von PDAC-Patient:innen mit einer hohen Anzahl an TAMs mit M2-Phänotyp im Tumorstroma ist im Vergleich zu Patient:innen mit niedriger Infiltrationsrate von M2-Makrophagen verkürzt (60).

B-Zellen produzieren Antikörper und Zytokine und dienen als antigenpräsentierende Zellen (61–63). Eine Subspezies der B-Zellen sind die **regulatorischen B-Zellen (Bregs)**, welche über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise die Freisetzung von IL-10 und IL-35, eine immunmodulierende Wirkung entfalten können (63–66). Es konnte gezeigt werden, dass IL-35 produzierende Bregs in der Pathogenese des PDAC einen tumorfördernden Effekt aufweisen (67).

CD8+ zytotoxische T-Zellen (CTLs) spielen eine essenzielle Rolle in der antitumoralen Immunantwort. Unter anderem über die Freisetzung zytotoxischer Moleküle wie Perforin,

Granulysin und Granzyme verursachen CTLs eine Porenbildung in der Zielzelle, woraufhin Caspasen und Endonukleasen aktiviert werden, welche den programmierten Zelltod induzieren (68). Sind CTLs jedoch über längere Zeit den Tumorneoantigenen exponiert, kann dies zu einer Erschöpfung der T-Zellen (*T-cell exhaustion*) führen, wodurch es zu einer erhöhten Expression von *Immune-Checkpoint* Molekülen wie dem *cytotoxic-T-lymphocyte associated protein 4* (CTLA-4) und *programmed cell death protein-1* (PD-1) kommt und ihre Effektorfunktion vermindert wird (68,69). Tumoren exprimieren zudem PD-L1, den Liganden für PD-1, welcher auch in Pankreastumorzellen nachgewiesen werden konnte (65,70).

CD4+ T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) lassen sich in mehrere Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilen. TH-1-Zellen produzieren Interferon-gamma (IFN- γ) und fördern die Aktivierung von CTLs, *Natural Killer* (NK-) Zellen und M1-Makrophagen und unterstützen damit die Tumorbekämpfung (71,72). TH-2-Zellen sezernieren unter anderem IL-4 und IL-13 und tragen somit zur Aktivierung von M2-Makrophagen bei (71), welche wiederum das Tumorwachstum fördern können (54,57). Über die Produktion von IL-4 und IL-5 tragen TH-2-Zellen außerdem zur Entstehung von Allergien und Asthma, aber auch zum Schutz vor Parasiten bei (71,72). Im PDAC konnte eine prädominierende TH-2-Zellinfiltration gegenüber den TH-1-Zellen nachgewiesen werden, was mit einem reduzierten Überleben von PDAC Patient:innen einhergeht (73). Eine weitere Untergruppe der T-Helfer-Zellen sind die TH-17-Zellen, welche unter anderem IL-17 produzieren (71,74) und insbesondere in fortgeschrittenen Stadien des PDACs verstärkt vorkommen. Sie sind mit einem kürzeren Gesamtüberleben und dem Auftreten von Metastasen im Pankreaskarzinom vergesellschaftet (75).

Regulatorische T-Zellen (Tregs) haben die Aufgabe, durch Hemmung der übermäßigen T-Zellaktivierung die Selbsttoleranz des Immunsystems zu regulieren und somit beispielsweise Autoimmunerkrankungen vorzubeugen (76,77). Im Pankreaskarzinom können Tregs allerdings eine verstärkte Immunsuppression bewirken, in dem sie zum Beispiel Zytokine wie IL-10 und TGF β sezernieren und damit T-Helferzell-Funktionen hemmen (78). Sie sind daher mit einer Tumorrogression und Prognoseverschlechterung assoziiert (79).

Mastzellen sind insbesondere für IgE-vermittelte allergische Reaktionen und ihre damit einhergehende Rolle bei Erkrankungen wie allergischem Asthma oder dem atopischen Ekzem bekannt (80,81). Eine weitere wichtige Funktion haben Mastzellen in der Abwehr von Pathogenen wie Bakterien und Parasiten (81,82). Im TME werden den Mastzellen

sowohl pro– als auch antitumorigene Eigenschaften zugeschrieben. Einerseits ist beschrieben, dass sie über die Rekrutierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems antitumorale Effekte verstärken. Andererseits könnten sie auch zur Tumorangiogenese über eine Freisetzung von VEGF sowie zum Abbau der EZM durch Freisetzung von MMPs beitragen, was eine Metastasierung begünstigen könnte (83,84). Es gibt Hinweise darauf, dass Mastzellen auch in der Entstehung und Progression des PDACs eine Rolle spielen (85,86).

1.2.3.4 Extrazelluläre Matrix und Angiogenese

Die Extrazelluläre Matrix bildet mit ihren einzelnen Bestandteilen einerseits das nicht-zelluläre Gerüst des Mikromilieus und ist andererseits Teil aktiver Prozesse und komplexer Interaktionen (87,88), wodurch sie auch eine Rolle in der Pathogenese maligner Erkrankungen spielt (4,34). Die wichtigsten Elemente der EZM sind Proteoglykane, Kollagene, Elastin, Fibronectin, Laminin und Glykoproteine wie Tenascin und Periostin (87,88). In der Karzinogenese des PDAC ist Kollagen I beispielsweise ein Hauptbestandteil der ausgeprägten Desmoplasie (89,90), große Mengen an Kollagen I sind mit einer verschlechterten Prognose assoziiert (35). Des Weiteren ist bekannt, dass das Glykosaminoglykan Hyaluronan (HA) im PDAC deutlich überexprimiert ist, was unter anderem durch Verminderung der Zelladhäsion das Tumorwachstum fördert (91–93).

Auch die Angiogenese, also die Entstehung neuer Blutgefäße, spielt für die Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle, da maligne Zellen für ein schnelles Wachstum ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe benötigen (94,95). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) wird durch multiple Signalwege reguliert und ist in der Angiogenese des PDAC von zentraler Bedeutung. Beispielsweise exprimieren die Pankreastumorzellen STAT3 als Teil des JAK-STAT-Signalwegs, was zu einer erhöhten Freisetzung von VEGF führt (96). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Mucin-1 im duktalem Pankreaskarzinom zu einer Hypoxie-induzierten Angiogenese führen kann (97). Therapeutische Ansätze, wie der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF, sind bisher allerdings überwiegend erfolglos geblieben (98,99).

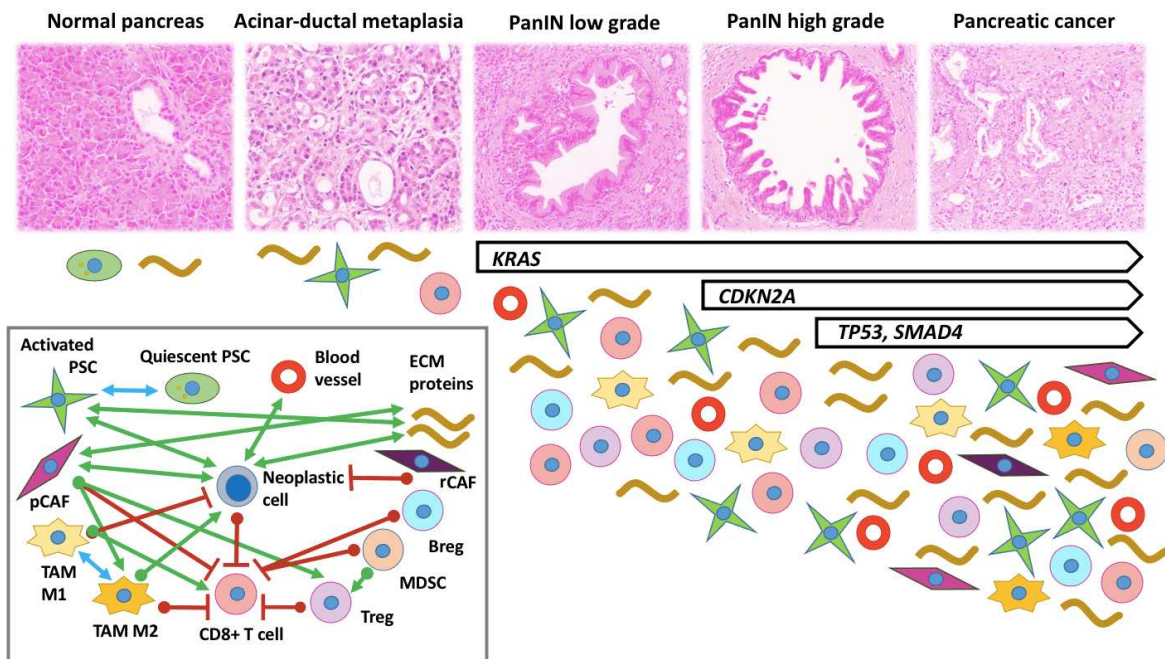


Abbildung 1: Molekulargenetische, zelluläre und immunologische Ereignisse während der Karzinogenese des PDAC

(mit freundlicher Genehmigung von Häberle, L und Opitz, F, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf)

1.3 Vorläuferläsionen

1.3.1 Azinär-Duktales Metaplasie (ADM)

Auf der Basis von Untersuchungen genetisch modifizierter Mausmodelle entwickelte sich die Annahme, dass das duktales Adenokarzinom des Pankreas aus einer Metaplasie-Neoplasie-Karzinom-Sequenz heraus entsteht. Die metaplastische Komponente stellt hierbei die sogenannte azinär-duktales Metaplasie (ADM) dar, aus welcher potentiell die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) und konsekutiv das PDAC hervorgehen kann (100,101).

Charakteristisch für ADM-Läsionen ist die Transdifferenzierung azinärer Zellen zu einem duktalem Phänotyp aufgrund von inflammatorischen und fibrotischen Prozessen, wie beispielsweise bei chronischer Pankreatitis (101,102). Dieser Vorgang ist potentiell reversibel (101).

Mikroskopisch kommt es bei ADM in frühen Stadien zu einer Abflachung von Azinuszellen. Später entwickeln sie neben teilweise noch intakten Azini tubuläre Strukturen, welche dann

schlussendlich von atrophischem, fibrotischem und entzündlichem Gewebe umgeben werden (102) (siehe Abb. 2).

Während immunhistologisch initial sowohl azinäre als auch duktale Marker exprimiert werden, kommt es in späteren Stadien einerseits zu einem Verlust der Expression azinärer Marker wie zum Beispiel von Trypsin und Amylase sowie andererseits zu einer Expression duktaler Marker wie beispielsweise Cytokeratin 7 (CK7) und CK19 (102–104). Molekulargenetisch finden sich in ADM teilweise *KRAS*-Mutationen (104,105).

ADM rufen klinisch keine spezifischen Symptome hervor. Hinweise, dass ADM selbst das Patient:innen Outcome beeinflussen, gibt es nicht (102).

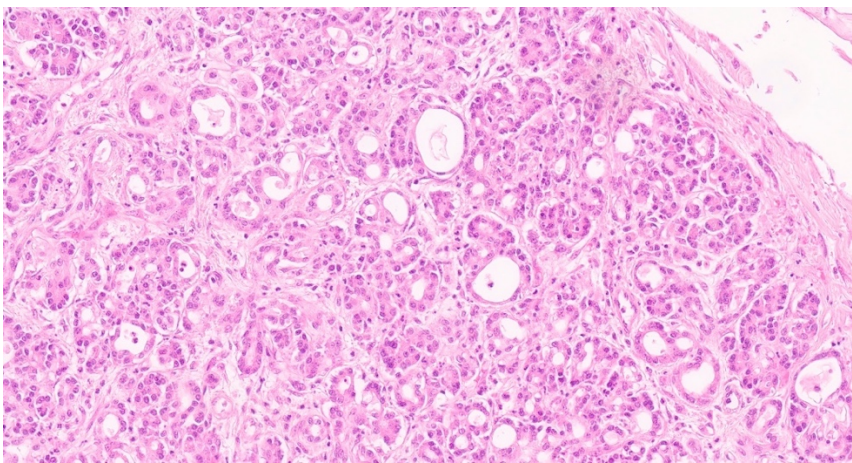


Abbildung 2: Azinär-Duktale Metaplasie (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)

1.3.2 Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie (PanIN)

Die pankreatische intraepitheliale Neoplasie ist eine mikroskopische Vorläuferläsion des PDAC (100,106), welche sich in low- und high-grade Läsionen unterteilen lässt (107). Low-grade-PanIN finden sich insbesondere in Patient:innen über 40 Jahre und werden in ca. 16-80% der Pankreasresektionen ohne Karzinom detektiert (108,109). Während low-grade-PanIN eher mit gesunden, sowie Pankreata mit chronischer Pankreatitis oder nichtmalignen Neoplasien assoziiert sind, treten high-grade-PanIN fast ausschließlich in maligne verändertem Pankreasgewebe auf (105,108,109).

Bei PanIN handelt es sich um duktale Läsionen, sie zeigen also einen dukталen Phänotyp und haben per definitionem einen maximalen Durchmesser von 0,5 cm (100,110). PanIN finden sich klassischerweise in peripheren, inter- und intralobulären Gängen und insbesondere low-grade-Läsionen sind häufig in der Nähe von azinär-duktalem Metaplasien und fibrotischem Gewebe lokalisiert. Morphologisch weisen PanIN ein hochprismatisches

und muzinreiches Epithel mit mehr oder weniger ausgeprägter papillärer Architektur auf (106,107) (siehe Abb. 3). Immunhistochemisch sind PanIN positiv für Mucin(MUC)5AC und MUC6, d.h. die Epithelzellen zeigen eine gastrale Differenzierung (100,106).

Während beim PDAC Mutationen der vier Gene *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* und *SMAD4* auf molekularer Ebene eine entscheidende Rolle spielen (111), finden sich auch in low-grade-PanIN in über 90% der Fälle bereits *KRAS*-Mutationen (112). Seltener können in high-grade-PanIN auch Mutationen von *CDKN2A* detektiert werden. Alterationen der Gene *TP53* und *SMAD4* kommen hingegen kaum vor und treten nahezu ausschließlich in high-grade-PanIN auf (113).

Aus klinischer Sicht bleiben PanIN häufig unentdeckt, da sie keine Symptome bei Patient:innen verursachen, radiologisch nicht detektiert werden können und somit lediglich im Rahmen der histopathologischen Untersuchung von Pankreasresektaten identifiziert werden. Low-grade-PanIN kommen häufig auch in normalem Pankreasgewebe vor und entarten selten (106,108,109). High-grade-PanIN finden sich hingegen fast ausschließlich in Verbindung mit PDAC (108). Bei Auffinden von low-grade PanIN im Absetzungsrand eines Pankreaskarzinomresektats ergibt sich hinsichtlich der Prognose keine Indikation zur chirurgischen Nachresektion, die Rolle von high-grade PanIN im Absetzungsrand wird kontrovers diskutiert (114,115).

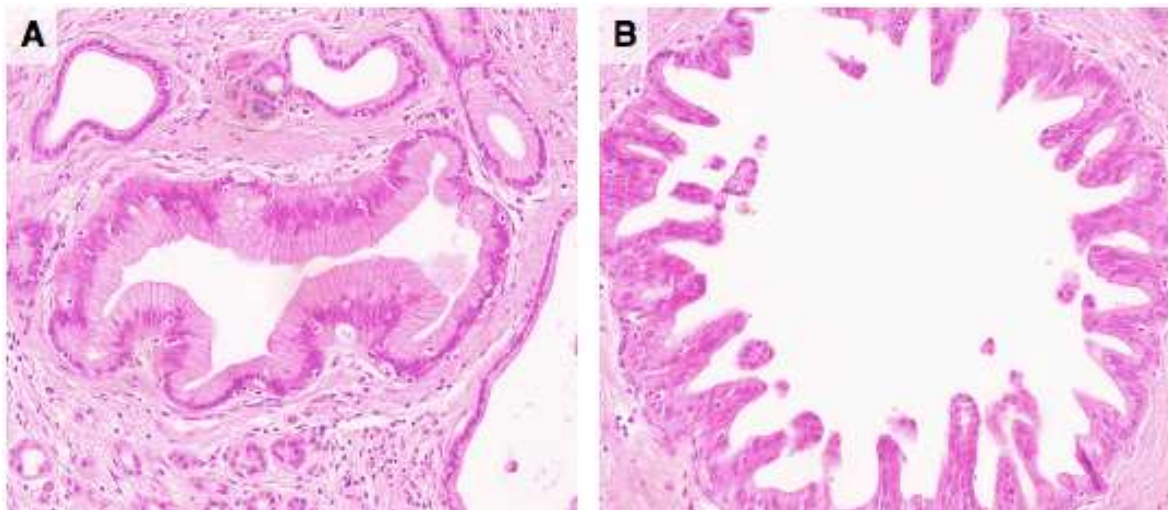


Abbildung 3: PanIN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)

Abb. 3A: PanIN low grade

Abb. 3B: PanIN high grade

1.3.3 Intraduktale Papillär-Muzinöse Neoplasie (IPMN)

Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) zählen, gemessen an Daten zu chirurgischen Resektionen, zu den häufigsten zystischen Läsionen des Pankreas (116–118). Sie treten bei Männern und Frauen gleich oft auf (119) und das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (120,121).

IPMN lassen sich makroskopisch in Haupt- und Seitengang-IPMN unterteilen (100). Hauptgang-IPMN entstehen im *Ductus pancreaticus* und finden sich zumeist im Pankreaskopf, wohingegen es sich bei den IPMN vom Seitengang-Typ um periphere Gangläsionen handelt, die ebenfalls häufig im Pankreaskopf, insbesondere im *Processus uncinatus*, lokalisiert sind (106). Hauptgang-IPMN sind im Gegensatz zu Seitengang-IPMN häufiger mit Karzinomen assoziiert, wodurch dieser Unterscheidung eine hohe klinische Relevanz zukommt (122–124). IPMN werden in low-grade-Läsionen mit geringer oder mittelgradiger Dysplasie und high-grade Läsionen mit hochgradiger Dysplasie untergliedert (100).

Von klinischer Seite können insbesondere Hauptgang-IPMN abdominelle Schmerzen, einen obstruktiven Ikterus und auch Gewichtsverlust oder Beschwerden im Sinne einer chronischen Pankreatitis hervorrufen, während Seitengang-IPMN meist asymptomatisch sind (123,125).

Bei Auftreten einer Hauptgang-IPMN ohne invasiven Anteil besteht nach vollständiger Tumoresektion eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 85%, wohingegen Patient:innen mit Hauptgang-IPMN mit assoziiertem invasivem Karzinom eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur ca. 48% aufweisen. Bei letzterem besteht allerdings eine große Varianz abhängig von der Art des Karzinoms und des Tumorstadiums (123).

Histopathologisch können IPMN anhand ihrer Morphologie und ihres Immunprofils in drei Subtypen klassifiziert werden: Gastrale, intestinale und pankreatobiliäre IPMN (126).

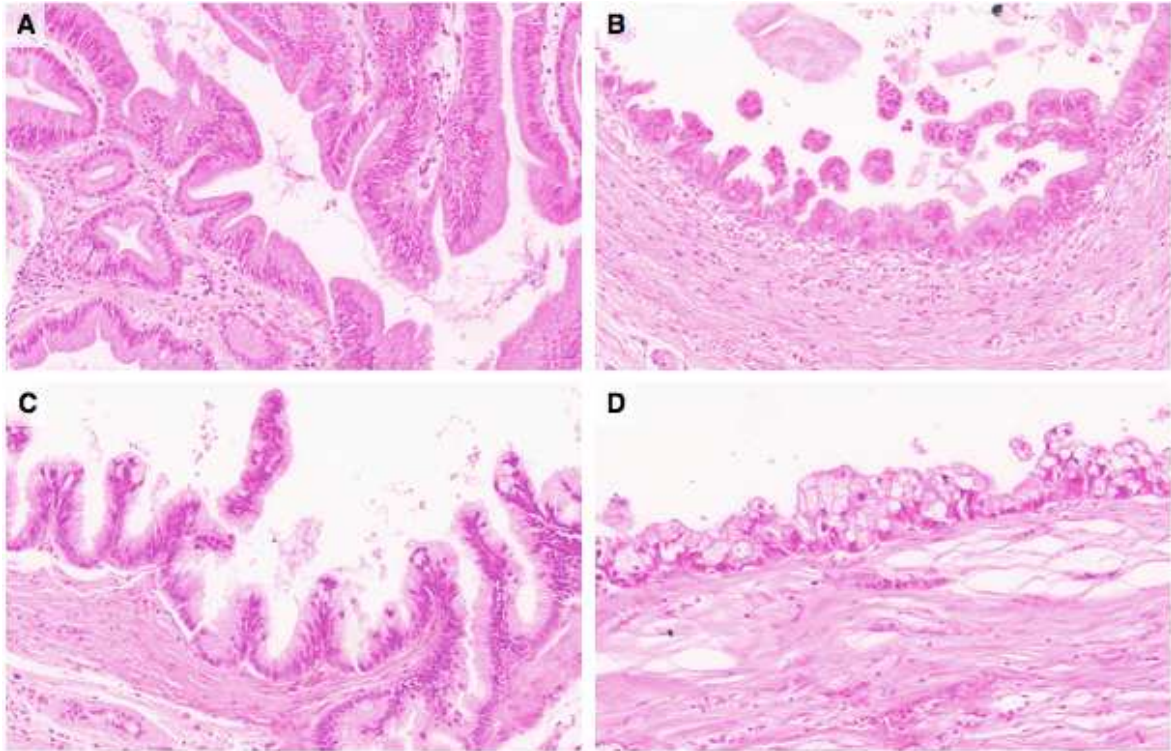


Abbildung 4: IPMN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)

Abb. 4A: Gastrale IPMN, low grade

Abb. 4B: Gastrale IPMN, high grade

Abb. 4C: Intestinale IPMN, high grade

Abb. 4D: Pankreatobiliäre IPMN, high-grade

1.3.3.1 Gastrale IPMN

Die häufigste Subgruppe stellen die gastralen IPMN dar. Die epitheliale Differenzierung ähnelt der des Magenanspruchs, zudem besteht eine große Ähnlichkeit mit PanIN-Läsionen (siehe Abb. 4A und B). Zur Unterscheidung von PanIN und kleinen Seitengang-IPMN werden IPMN als Läsionen ≥ 1 cm definiert, während PanIN in der Regel auf eine Größe von $\leq 0,5$ cm beschränkt sind. Immunhistochemisch können für gewöhnlich die Muzine MUC5AC und MUC6 detektiert werden (106). Molekulargenetisch werden bei IPMN vom gastralen Typ in rund der Hälfte der Fälle *GNAS*- und *KRAS*-Mutationen nachgewiesen (127). In ca. 10% der Fälle finden sich mit den gastralen IPMN assoziierte invasive Karzinome (128), wobei gastrale IPMN und duktales Adenokarzinome auch zeitgleich ohne unmittelbare bzw. eindeutige Assoziation auftreten können (sog. *concomitant* Karzinome). Zudem sind PDACs, die in Verbindung zu IPMN stehen, häufig kleiner und weniger invasiv, was auf einer früheren Diagnosestellung oder günstigeren biologischen Eigenschaften beruhen könnte (129).

1.3.3.2 Intestinale IPMN

IPMN vom intestinalen Typ finden sich üblicherweise im *Ductus pancreaticus* (123) und führen durch eine ausgeprägte Schleimproduktion mit konsekutiver Verlegung der Pankreasgänge häufig zu einer chronisch-obstruktiven Pankreatitis (106). Morphologisch weisen die Epithelien der intestinalen IPMN Ähnlichkeiten mit villösen Kolonadenomen auf (siehe Abb. 4C). Immunhistochemisch sind sie positiv für MUC2, MUC5AC und CDX2 (121,130). Molekulargenetisch treten zumeist (in ca. 74 - 100 % der Fälle) *GNAS*-Mutationen auf, welche in der Regel bereits in low-grade Läsionen detektiert werden können (127,131). IPMN vom intestinalen Typ sind in ca. einem Drittel der Fälle bei Diagnosestellung mit muzinösen Adenokarzinomen assoziiert. Diese weisen eine bessere Prognose als die duktales Adenokarzinome auf, welche wiederum typischerweise eher aus gastralen oder pankreatobiliären IPMN hervorgehen (106,132,133) oder ohne Assoziation zu IPMN entstehen.

1.3.3.3 Pankreatobiliäre IPMN

IPMN vom pankreatobiliären Typ kommen wie die intestinalen IPMN typischerweise im Hauptgang vor und sind insgesamt sehr selten. Sie bilden im Gegensatz zu den intestinalen IPMN wenig Schleim (106,120,134). Pankreatobiliäre IPMN exprimieren immunhistochemisch MUC1 und MUC5AC (121,135). Molekulargenetisch finden sich häufig *TP53*- und *KRAS*-Mutationen (136). Pankreatobiliäre IPMN weisen in der Regel hochgradige Dysplasien auf, in über der Hälfte der Fälle liegt bei Diagnosestellung bereits ein duktales Adenokarzinom vor (137).

1.3.4 Intraduktale Onkozytär-Papilläre Neoplasie (IOPN)

Die intraduktale onkozytär-papilläre Neoplasie wurde früher als Subtyp der IPMN aufgeführt. Aufgrund molekularer Unterschiede und der besseren Prognose dieser Läsion wird die IOPN inzwischen gemäß der WHO-Klassifikation zu Tumoren des Verdauungstrakts von 2019 als eigenständige Entität gewertet (138).

IOPN sind sehr seltene Läsionen, die für gewöhnlich im Pankreashauptgang vorkommen und im *Caput pancreatis* zu finden sind (106,139). Sie produzieren wenig Schleim und haben sowohl zystische als auch solide Anteile. Histologisch weisen sie baumartig verzweigte Papillen und onkozytäre Zellen auf (140,141) (siehe Abb. 5). Die für IPMN typischen *KRAS*- oder *GNAS*-Mutationen kommen in IOPN selten vor (142,143). In knapp 30% der Fälle tritt ein invasives Karzinom auf, welches in der Regel aber mit einer guten Prognose vergesellschaftet ist (140).

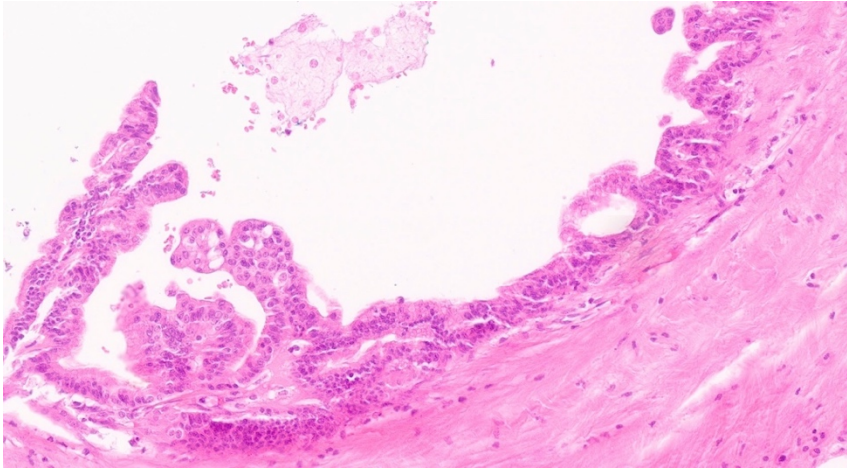


Abbildung 5: IOPN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)

1.3.5 Muzinös-zystische Neoplasie (MCN)

Muzinös-zystische Neoplasien (MCN) stellen ca. ein Zehntel der zystischen Läsionen des Pankreas dar und treten fast ausschließlich bei Frauen auf. Typischerweise finden sie sich im *Corpus-Cauda*-Bereich des Pankreas als große, runde, uni- oder multilokuläre Raumforderungen ohne Verbindung zum Pankreasgangsystem (120,144,145).

Histologisch weisen MCN ein schleimbildendes Epithel und ein charakteristisches subepitheliales ovariell-ähnliches Stroma auf (146) (s. Abb. 6). Die Epithelzellen sind positiv für CEA und MUC5AC, während das Stroma klassischerweise Östrogen- und Progesteronrezeptoren, α -Inhibin und Calretinin exprimiert (145,146). In etwa 12% der Fälle liegt eine invasive Komponente vor, bei der sich typischerweise eine Positivität für MUC1 zeigt (142,145).

Molekulargenetisch werden insbesondere in low-grade MCN *KRAS*-Mutationen beschrieben, wohingegen Alterationen der *TP53* und *SMAD4*-Gene primär in high-grade MCN Läsionen auftreten (146). Anders als bei IPMN konnten in MCN keine *GNAS*-Mutationen gefunden werden (147).

Von klinischer Seite stehen abdominelle Schmerzen im Vordergrund. Auch Symptome wie Fatigue, Gewichtsverlust oder eine akute Pankreatitis können auftreten (142). Aufgrund des Entartungspotentials ist die zu bevorzugende Therapie eine vollständige chirurgische Resektion (148). Bei Vorliegen nicht-invasiver MCNs liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 100%, bei Auftreten eines invasiven Karzinoms reduziert sich diese auf 57% (142).

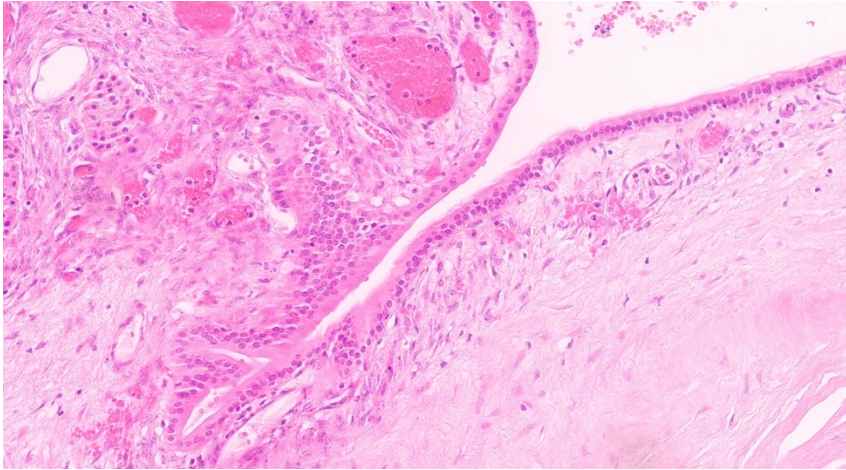


Abbildung 6: MCN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)

1.4 Ziele der Arbeit

Für die Karzinogenese und den späteren Behandlungsverlauf des PDAC spielt neben den zugrunde liegenden zellulären und molekularen Regulationsmechanismen auch das immunologische Mikromilieu eine entscheidende Rolle (32,72).

Ziel der Arbeit ist daher ein tiefergreifendes Verständnis der Mikroumgebung des PDAC mit Fokus auf seine Vorläuferläsionen ADM, PanIN, IPMN, IOPN und MCN anhand der Antikörper-basierten Untersuchung verschiedener Proteine im Gewebe, die Aufschluss über die körpereigene Immunantwort und Einflüsse der Vorläuferläsionen und des PDACs auf das Immunsystem geben.

Konkreter wurde hierbei mittels Multiplex-Immunhistochemie das Verhalten von B-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen untersucht. Folglich können Ansätze zur Charakterisierung und Klassifizierung der Läsionen neben morphologischen und molekularen Aspekten auch um immunologische Faktoren ergänzt werden.

Dies bietet einen erweiterten Kenntniskern zur Entstehung und Entwicklung des duktales Pankreaskarzinoms und somit die Möglichkeit, exaktere prognostische Aussagen treffen zu können sowie gegebenenfalls Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapieformen zu entschlüsseln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Objektträger	Engelbrecht GmbH (Edermünde, DE)
Mikrotomklingen	pfm medical AG (Köln, DE)
Pipettenspitzen	Starlab International GmbH (Hamburg, DE)
Reaktionsgefäße (0,2 – 2 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Reaktionsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, AUT)
Gewebekassetten	R. Langenbrinck GmbH (Emmendingen, DE)
Deckgläser	Engelbrecht GmbH (Edermünde, DE)

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Xylol	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Ethanol	VWR International GmbH (Darmstadt, DE)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ziegenserum	Abcam (Cambridge, UK)
DAB3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Abcam (Cambridge, UK)
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Eukitt® Quick-hardening Mounting Medium	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Triton-X	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA))
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Tween® 20	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Formaldehyd 10%	neoFroxx GmbH (Einhausen, DE)

2.1.3 Puffer

Puffer	
--------	--

Citratpuffer (pH6)	10 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat → Puffern am pH-Meter mit NaOH und HCL → Auffüllen mit Aqua dest. auf 1l
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) (pH9)	10 mM Tris 1 mM EDTA → pH-Werteinstellung am pH-Meter mit NaOH und HCL → Auffüllen mit Aqua dest. auf 1l
<i>Tris-buffered saline-Tween</i> (TBS-T) (pH 7,6)	250mM TRIS 150 mM NaCl → pH-Werteinstellung am pH-Meter mit NaOH und HCL → 0,1% Tween20
<i>Blocking Solution</i>	1% BSA in PBS 10% Ziegenserum 0,1% Triton-X
AR6 Buffer Working Solution	Fertiglösung (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
Neutral gepuffertes Formalin (NBF) (pH 7)	Formaldehyd 10% Aqua dest. NaH ₂ PO ₄ 4 g/L

2.1.4 Geräte und Ausrüstung

Geräte	Hersteller
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Mikrotom	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TCS SP8 STED 3X Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, DE)
Dampfdrucktopf	Fissler GmbH (Idar-Oberstein, DE)
Vortexer	Bender & Hobein AG (Zürich, CHE)
Manual Tissue Arrayer MTA-1	Beecher Instruments, Inc. (Sun Prairie, WI, USA)
Feinwaage	Denver Instrument (New York, NY, USA)
pH-Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH (Vöhringen, DE)
Tischzentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, DE)

Wasserbad	Labortechnik GmbH+Co. KG (Lonsee-Ettlenschieß, DE)
-----------	--

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
Vectastain ABC Kit IgG Maus	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Vectastain ABC Kit IgG Kaninchen	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Opal 7-Color Manual IHC Kit	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Anti-CD68 (Monoclonal Mouse; Clone KP1)	mlHC 1:100	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, DE)	M0814
Anti-CD3 (Monoclonal Rabbit; Clone SP7C)	mlHC 1:60	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH (Hamburg, DE)	CI597C0I
Anti-CD20 (Monoclonal Mouse; Clone L26)	mlHC 1:600	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, DE)	M0755
Anti-Tryptase (Monoclonal Mouse; Clone AA1)	mlHC 1:2000	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH (Hamburg, DE)	TI868C01
Anti-CD163 (Monoclonal Mouse; Clone EDHu-1)	mlHC 1:300	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)	MCA1853
Anti-CD8 (Monoclonal Mouse; Clone C8/1448)	mlHC 1:125	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, DE)	M7103
Anti-CD4 (Monoclonal Rabbit; Clone SP35)	mlHC 1:75	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH (Hamburg, DE)	CI851C0I
Anti-Granzyme B (Monoclonal Mouse; Clone GrB-7)	mlHC 1:20	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, DE)	M7235
Anti-PD1 (Monoclonal Mouse; Clone NAT105)	mlHC 1:25	Cell Marque (Rocklin, CA, USA)	315M-96
Anti-FoxP3 (Monoclonal Mouse; Clone 236A/E7)	mlHC 1:400	Abcam (Cambridge, UK)	ab20034

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Produktnummer
Pferd Anti-Maus-IgG	1:200	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)	PK-6102
Ziege Anti-Kaninchen IgG	1:200	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)	PK-6102
Opal Polymer HRP Maus + Kaninchen	<i>Ready-to-use</i>	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)	NEL744001KT

2.1.7 Software

Software	Hersteller
Aperio ImageScope	Leica Biosystems (Wetzlar, DE)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, WA, USA)
FIJI	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
LAS X Core	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
IBM SPSS Statistics 26	IBM (Armonk, NY, USA)
Zotero 6.0 beta	Roy Rosenzweig Center for History and New Media (Washington, DC, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Kollektiv

Es wurden aus den Archivbeständen der Diagnostik des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf von 2008 bis 2019 Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet und zu einem Kollektiv zusammengestellt. Diese umfassen Gewebeproben von 76 Patient:innen, deren Pankreasgewebe Meta- oder Neoplasien sowie teilweise maligne Veränderungen aufwies.

2.2.2 Schneiden der Paraffinblöcke

Die zuvor gekühlten Gewebeproben wurden am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 2 μ m geschnitten und in ein ca. 46°C heißes Wasserbad überführt, was zur Glättung beiträgt. Im Anschluss wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet.

2.2.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Versuche erfolgten primär zur Etablierung der verwendeten Antikörper an Tonsillengewebe als Voraussetzung für die anschließende Durchführung der fluoreszenzbasierten Multiplex-Immunhistochemie (mIHC).

Die Schnitte wurden zunächst für eine Stunde bei 60°C im Brutschrank getrocknet, um die Gewebeadhäsion am Objektträger zu erhöhen. Anschließend erfolgte die Deparaffinisierung des Gewebes für 30 Minuten in Xylol. Zur Rehydratisierung wurden die Schnitte dann in eine absteigende Alkoholreihe mit zunächst 100% Ethanol für 15 Minuten und anschließend 96% sowie 70% Ethanol für jeweils 5 Minuten überführt. Daraufhin wurden die Schnitte kurz in Aqua dest gewaschen. In einem nächsten Schritt erfolgte die Antigendemaskierung im Dampfdrucktopf für ca. 15 Minuten je nach Antikörper mit Citratpuffer (pH6) oder TE-Puffer (pH9). Die Antigendemaskierung dient der Wiederherstellung der durch den Fixierungsprozess veränderten Epitopkonformation im Gewebe, wodurch eine Antigen-Antikörperbindung wieder möglich wird. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, woraufhin für 5 Minuten ein Waschschriff mit TBS-T erfolgte. Daraufhin wurde ein 20-minütiger Peroxidase-Block mit 3% H₂O₂ in PBS durchgeführt, wodurch die endogene Peroxidaseaktivität im Gewebe gehemmt wird. Nach einem weiteren Waschvorgang mit TBS-T wurde für eine Stunde eine *Blocking Solution*, bestehend aus 10% Ziegsenserum, 0,1% Triton und 1% bovinem Serumalbumin in PBS, auf die Schnitte pipettiert. Dadurch können unspezifische Bindungen vermindert und demzufolge Hintergrundsignale reduziert werden. Anschließend wurde der Primäre Antikörper verdünnt mit *Blocking Solution* (wie zuvor beschrieben) auf die Schnitte aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte erneut in TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde der sekundäre, biotinylierte Antikörper von Vector Laboratories in Abhängigkeit des Primärantikörpers mit Anti-Maus-IgG oder Anti-Kaninchen-IgG für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1:200 auf die Schnitte aufgetragen. Als Nächstes wurde das ABC-Reagens zur Detektion des Sekundärantikörpers vorbereitet. Dieses besteht aus einem Komplex aus Avidin, der biotinylierten Meerrettichperoxidase und PBS. Nach einem Waschschriff mit TBS-T wurde das ABC-Reagens auf die Schnitte pipettiert und für weitere 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T wurde für circa 3 bis 4 Minuten mit einer DAB-Lösung gefärbt. Diese bestand aus 4 µl Chromogen und 200 µl Puffersubstrat. Nach kurzem Waschen in Leitungswasser wurde anschließend mit Hämalaulösung für 10-15 Sekunden gegengefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte gründlich unter fließendem Leitungswasser für 2 Minuten gewaschen. Nachfolgend wurde

das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 96% und 100% Ethanol dehydriert und für 5 Minuten in Xylol gegeben. Zuletzt wurde je ein Tropfen Eindeckelmedium von *Vectashield* auf die Schnitte aufgetragen und das Gewebe mit einem Deckgläschen bedeckt.

Tabelle 1: Immunhistochemie-Protokolle

Primärantikörper	Verdünnung	Antigendemaskierung	Sekundärantikörper
CD3	1:100	Citratpuffer	IgG Kaninchen
CD4	1:75	TE-Puffer	IgG Kaninchen
CD8	1:200	Citratpuffer	IgG Maus
CD20	1:400	TE-Puffer	IgG Maus
CD68	1:100	TE-Puffer	IgG Maus
CD163	1:400	TE-Puffer	IgG Maus
Tryptase	1:1500	Citratpuffer	IgG Maus
PD1	1:25	TE-Puffer	IgG Maus
FoxP3	1:600	TE-Puffer	IgG Maus
Granzyme B	1:20	TE-Puffer	IgG Maus

2.2.4 Tissue Microarrays

In Vorbereitung für die Durchführung der Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie wurden aus dem Pankreasgewebe Tissue Microarrays (TMAs) angefertigt. Dabei werden aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Blöcken bestimmte Zielregionen, welche zuvor anhand von HE-Schnitten definiert und markiert wurden, mit einem TMA-Gerät ausgestanzt und in einem leeren Paraffinblock zusammengefügt (s. Abb. 7A und 7B). Hierfür wurden Stanzzyylinder mit 2 mm Durchmesser verwendet, wodurch sowohl die Vorläuferläsionen bzw. das Tumorgewebe als auch die umgebende Mikroumgebung möglichst repräsentativ abgebildet werden konnte. Als Positivkontrolle wurde Tonsillengewebe verwendet. Hiervon wurden ebenfalls Gewebeproben auf die TMAs überführt.

Die Verwendung von TMAs im Vergleich zu normalen Gewebeschnitten hat zum einen den Vorteil, dass weniger Versuchsmaterial benötigt wird und der zeitliche Aufwand der Versuche vermindert wird. Zum anderen können die verschiedenen Gewebestanzungen im Vergleich zueinander besser beurteilt werden, weil exakt gleiche Versuchsbedingungen gegeben sind.

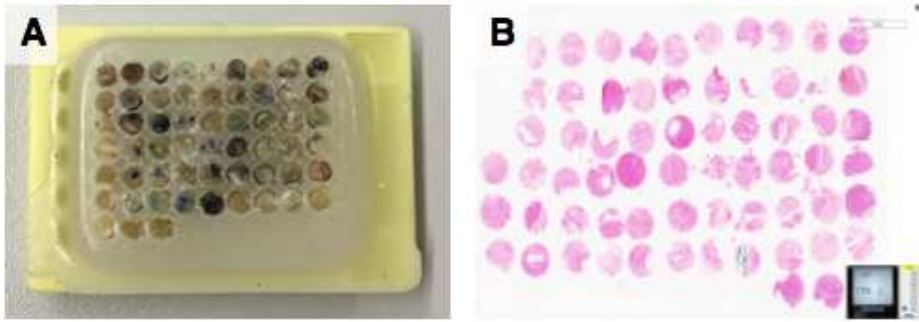


Abbildung 7: Tissue Microarrays

Abb. 7A: Paraffinblock mit Gewebestücken

Abb. 7B: HE-Färbung von Tissue Microarrays

2.2.5 Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie

Die Multiplex-Fluoreszenz-Immunhistochemie ist eine Methode, welche es erlaubt, mehrere Antigen-Antikörper-Färbungen gleichzeitig an einer Gewebeprobe durchzuführen. Dies bietet zum einen den Vorteil, dass insgesamt weniger Gewebe für die Färbungen benötigt wird. Zum anderen kann sich hierdurch auch die Aussagekraft der Färbungen erhöhen, da Abweichungen zwischen den Versuchsbedingungen vermieden werden und die Färbungen direkt an einem Gewebe miteinander verglichen werden können. Das Prinzip der Multiplex-Immunhistochemie beruht auf der *Tyramide Signal Amplification (TSA)*. Hierbei entsteht nach vorangehender Antigen-Antikörperbindung eine kovalente, permanente Bindung zwischen einem Tyramide-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff und den Tyrosinbindungsstellen des Antigens. Während der Primär- und Sekundärantikörperkomplex durch Hitzebehandlung vom Antigen gelöst werden kann, bleibt eine permanente Bindung zwischen dem Antigen und dem Fluorophor bestehen. So können konsekutiv neue Primärantikörper und neue Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, ohne dass die Färbung vorheriger Antigene verloren geht (Abb. 8).

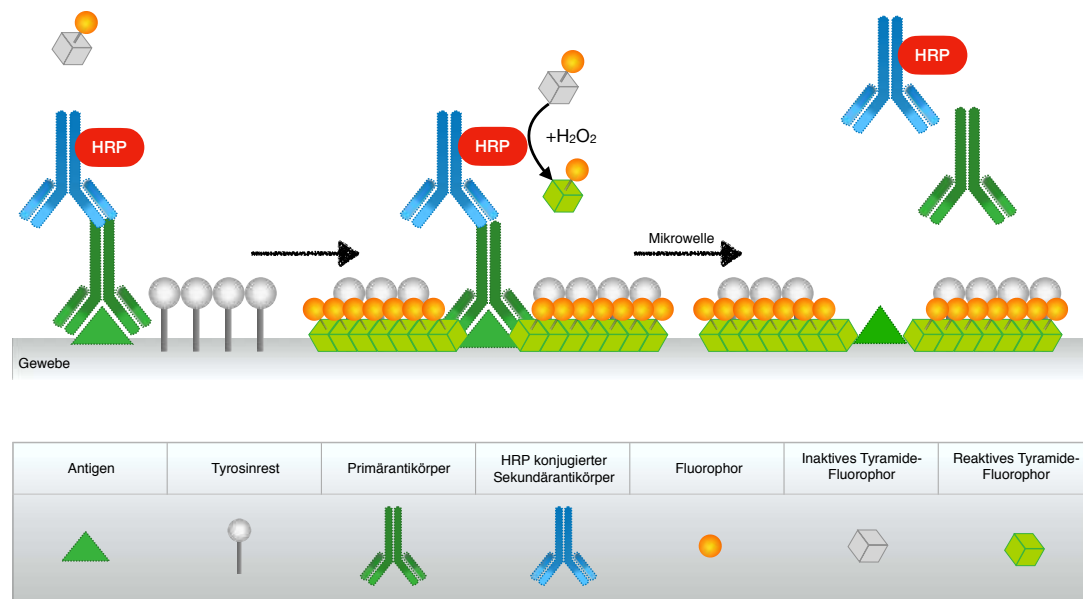


Abbildung 8: Grundprinzip der TSA-basierten Fluoreszenz-mIHC
 Der Sekundärantikörper bindet zunächst an den mit dem Antigen gebundenen Primärantikörper. Anschließend erfolgt die Aktivierung und kovalente Bindung des Tyramide-Fluorophors an die Tyrosinbindungsstellen des Antigens. Unter Hitzeinduktion werden der Primär – und Sekundärantikörper abgelöst, das Fluoreszenzsignal verbleibt am Antigen. (Modifiziert nach *Cell Signaling Technology*, 2016)

Zunächst wurden die Schnitte für eine Stunde bei 65°C getrocknet und anschließend für 30 Minuten in Xylol deparaffinisiert. Daraufhin wurden die Objektträger für je 10 Minuten in eine absteigende Alkoholreihe mit 100%, 95% und 70% Ethanol überführt und dann in Aqua dest gewaschen. Anschließend erfolgte ein Schritt zur Fixierung des Gewebes in 10% neutral gepuffertem Formalin für 20 Minuten. Nach erneutem Waschen in Aqua dest wurden die Schnitte in eine Pufferlösung (*AR6 Buffer*) überführt und zur Antigendemaskierung für 15 Minuten bei mittlerer-niedriger Stufe in der Mikrowelle erhitzt. Nachfolgend wurden die Objektträger für 30 Minuten in der Pufferlösung abgekühlt und dann in Aqua dest und TBS-T gewaschen. Daraufhin erfolgte ein 20-minütiger Peroxidase-Block mit 3% H₂O₂ in PBS. Nach erneutem Waschen wurde die *Antibody Blocking Solution* (Fertiglösung) von Perkin Elmer auf die Schnitte aufgetragen und für 10 Minuten auf den Objektträgern belassen. Danach wurde der erste Primärantikörper (CD20 in Panel 1 bzw. FoxP3 in Panel 2) verdünnt mit dem *Antibody Diluent/Blocking Solution* auf die Schnitte pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte für dreimal zwei Minuten in TBS-T gewaschen. Dann wurde der Sekundärantikörper (Fertiglösung, Opal Polymer HRP Maus und Kaninchen Antikörper) aufgetragen und für 10 Minuten bei

Raumtemperatur darauf belassen, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit TBS-T. Um ein Fluoreszenzsignal zu generieren, wurde anschließend die *Opal Fluorophore Working Solution*, bestehend aus einem Fluoreszenzfarbstoff und *Amplification Diluent*, im Verhältnis 1:100 auf die Schnitte gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeder Fluoreszenzfarbstoff wurde zuvor in je 75 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und bei -20 Grad Celsius gelagert. Im Anschluss erfolgte wieder ein Waschschrift in TBS-T. Um einen neuen Primärantikörper auftragen zu können, ohne dass es zu einer ungewollten Bindung des Sekundärantikörpers an den zuvor aufgetragenen Primärantikörper kommt, musste der Primär-Sekundär-Antikörperkomplex vom Gewebe gelöst werden. Dies erfolgte durch erneutes Erhitzen der Schnitte für 15 Minuten in der Mikrowelle. Nach Abkühlen der Objektträger wurde das Protokoll wieder ab dem Schritt, den *Blocking Buffer* aufzutragen, neu begonnen. Jeder nachfolgende Primärantikörper wurde für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und mit einem neuen Fluoreszenzfarbstoff eines anderen Wellenlängenbereichs markiert. Zum Schluss wurden die Schnitte mit der 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) *Working Solution*, bestehend aus zwei Tropfen DAPI und 1ml TBS-T, für fünf Minuten gegengefärbt und ein letztes Mal für je zwei Minuten in TBS-T und Wasser gewaschen und am Ende mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen bedeckt.

Die Reihenfolge der Primärantikörper und die Kombination mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen stellte bei der Etablierung der Multiplex-Fluoreszenz-IHC den entscheidenden Punkt zur Verbesserung der Qualität der Färbungen dar.

Im Folgenden ist in Tabelle 2 für Panel 1 und in Tabelle 3 für Panel 2 die Reihenfolge der Primärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung in der mIHC sowie dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff aufgeführt. Tabelle 4 stellt die Opal Fluorophore mit ihrer jeweiligen Wellenlänge dar.

Tabelle 2: mIHC-Protokoll Panel 1

Reihenfolge Primärantikörper	Verdünnung	Fluoreszenzfarbstoff
1. CD20	1:600	Opal 540
2. Tryptase	1:2000	Opal 620
3. CD3	1:60	Opal 520
4. CD68	1:100	Opal 570
5. CD163	1:300	Opal 690

Tabelle 3: mIHC-Protokoll Panel 2

Reihenfolge Primärantikörper	Verdünnung	Fluoreszenzfarbstoff
1. FoxP3	1:400	Opal 620
2. CD8	1:125	Opal 570
3. PD-1	1:25	Opal 540
4. CD4	1:75	Opal 520
5. Granzyme B	1:20	Opal 690

Tabelle 4: Opal Fluorophore und ihre Wellenlängen

Fluorophor	Exzitation (nm)	Emission (nm)
Spectral DAPI	358	461
Opal 520	494	525
Opal 540	523	536
Opal 570	550	570
Opal 620	588	616
Opal 690	676	694

In Abb. 9 ist exemplarisch das multiplex-gefärbte Immunmikromilieu zweier Vorläuferläsionen dargestellt.

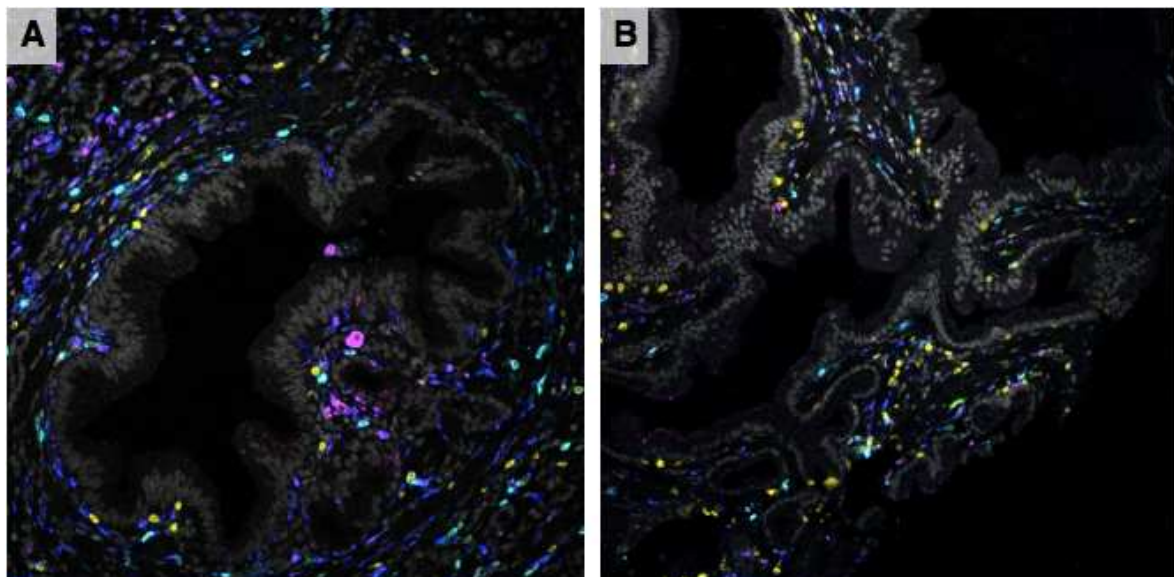


Abbildung 9: Multiplex-Fluoreszenzfärbung

Abb. 9A: Multiplex-Bild einer PanIN-Läsion

Abb. 9B: Multiplex-Bild einer intestinalen IPMN high grade Läsion

2.2.6 Datenverarbeitung

Das Mikroskopieren der gefärbten Multiplex-Proben erfolgte mit dem Leica TCS SP8 STED 3X Konfokalmikroskop. Dieses erlaubt eine optimale Anpassung an die Anregungswellenlänge der jeweiligen Fluorophore und ein simultanes Einsetzen mehrerer Anregungslinien.

Die Bilderfassung für die nachfolgende Auswertung wurde im Anschluss mit der Leica LAS X Softwareplattform durchgeführt.

Zur Auswertung der Färbungen wurde schließlich die Software FIJI/ImageJ verwendet. Da sich die Färbungen je nach Marker hinsichtlich Morphologie, Größe und Intensität unterschiedlich verhalten und zudem teilweise veränderte Bedingungen, z.B. durch unterschiedlich starke Hintergrundsignale bestanden, war es erforderlich, für jeden Marker eine separate Analyse durchzuführen. Hierfür wurden, in Zusammenarbeit mit dem *Center for Advanced Imaging* der Heinrich-Heine-Universität, für alle Marker individuelle Makros zur automatisierten Bildanalyse codiert. Anhand dieser wurden unter anderem Größenminima und -maxima festgelegt, Threshold-Einstellungen angepasst sowie Hintergrundfärbungen reduziert (s. Abb. 10).

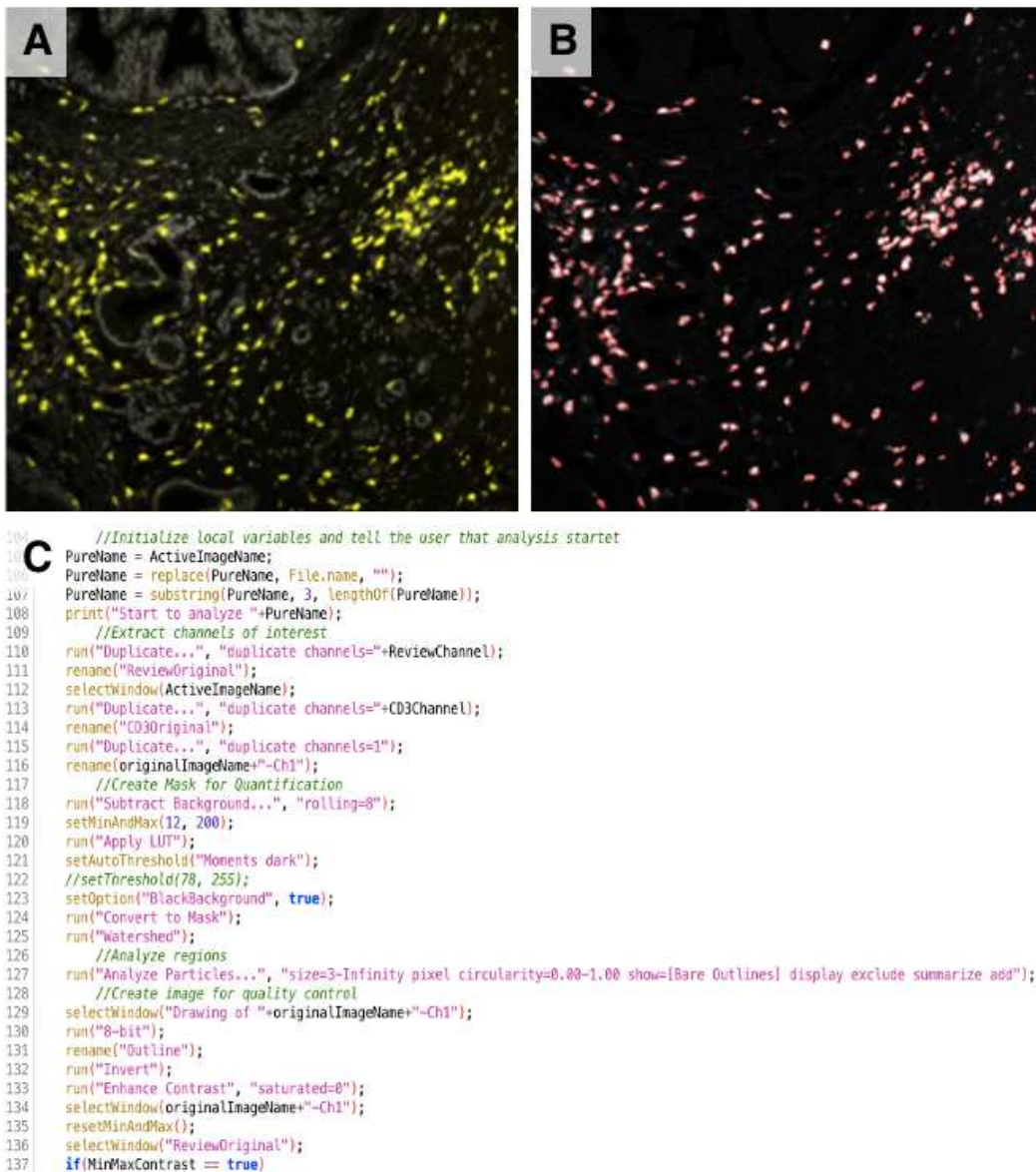


Abbildung 10: Auswertung mit Leica LAS X und ImageJ

Abb. 10A: Fluoreszenzgefärbtes Bild nach Erfassung mit der Leica LAS X Software

Abb. 10B: Erkennung der einzelnen Zellen (rot umrandet) nach Bildanalyse mit ImageJ

Abb. 10C: Exemplarischer Ausschnitt eines Makros für den Marker CD3

2.2.7 Statistische Auswertung

Nach der Auszählung der Färbungen wurden die Daten in Exceltabellen überführt. Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit dann auf die Gesamtzellzahl (anhand von DAPI-Färbungen) sowie die jeweilige Gewebefläche normiert. Die statistische Auswertung erfolgte im Anschluss mit SPSS. Nach Widerlegung der Normalverteilung mittels *Kolmogorov-Smirnov* und *Shapiro-Wilk*-Test wurde der nicht-parametrische Datensatz bei Vorliegen von mehr als zwei Gruppen weiter mit dem *Kruskal-Wallis*-Test und im Anschluss

mit der *Dunn-Bonferroni*-Korrektur als post-hoc Analyse ausgewertet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$).

2.3 Ethikvotum

Die Verwendung der Gewebeproben wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Rahmen des Ethikvotums „Molekulare Analysen zur malignen Progression von Tumoren an FFPE-Gewebeproben aus Altbeständen der Diagnostik (Pathologie), welche nicht mehr für die Diagnostik benötigt werden“ mit dem Aktenzeichen 3821 genehmigt. Die Verarbeitung der Proben erfolgte pseudonymisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Antikörper

Die verwendeten Immunmarker wurden zunächst mittels klassischer Immunhistochemie an Tonsillengewebe etabliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 abgebildet.

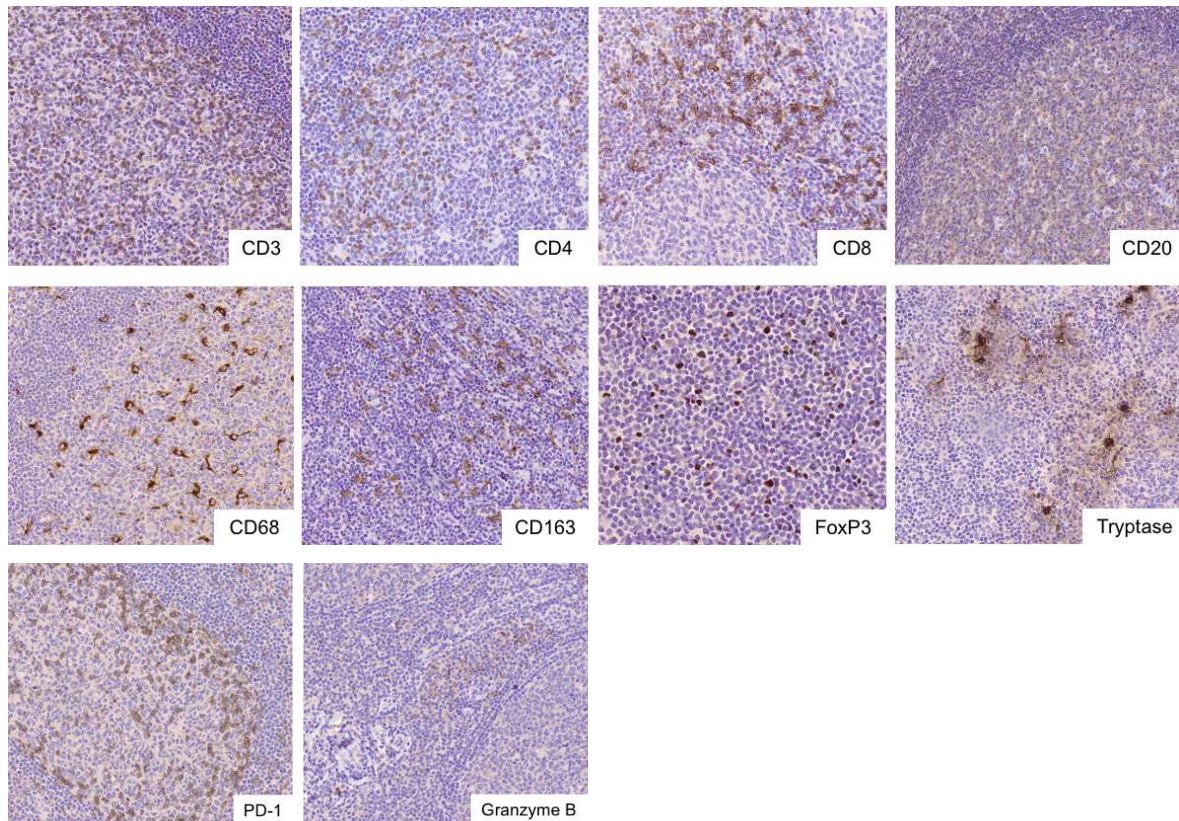


Abbildung 11: Immunhistochemische Etablierung der Marker an Tonsillengewebe. Zeiss Axioskop 2 plus. Vergrößerung: 20x

Im Anschluss konnten die Marker dann für die fluoreszenzbasierte Multiplex-Immunhistochemie optimiert und mit dem Leica TCS SP8 STED 3X Konfokalmikroskop aufgenommen werden. Im Folgenden (Abb. 12) sind die einzelnen Marker nach der Etablierung an Tonsillengewebe dargestellt.

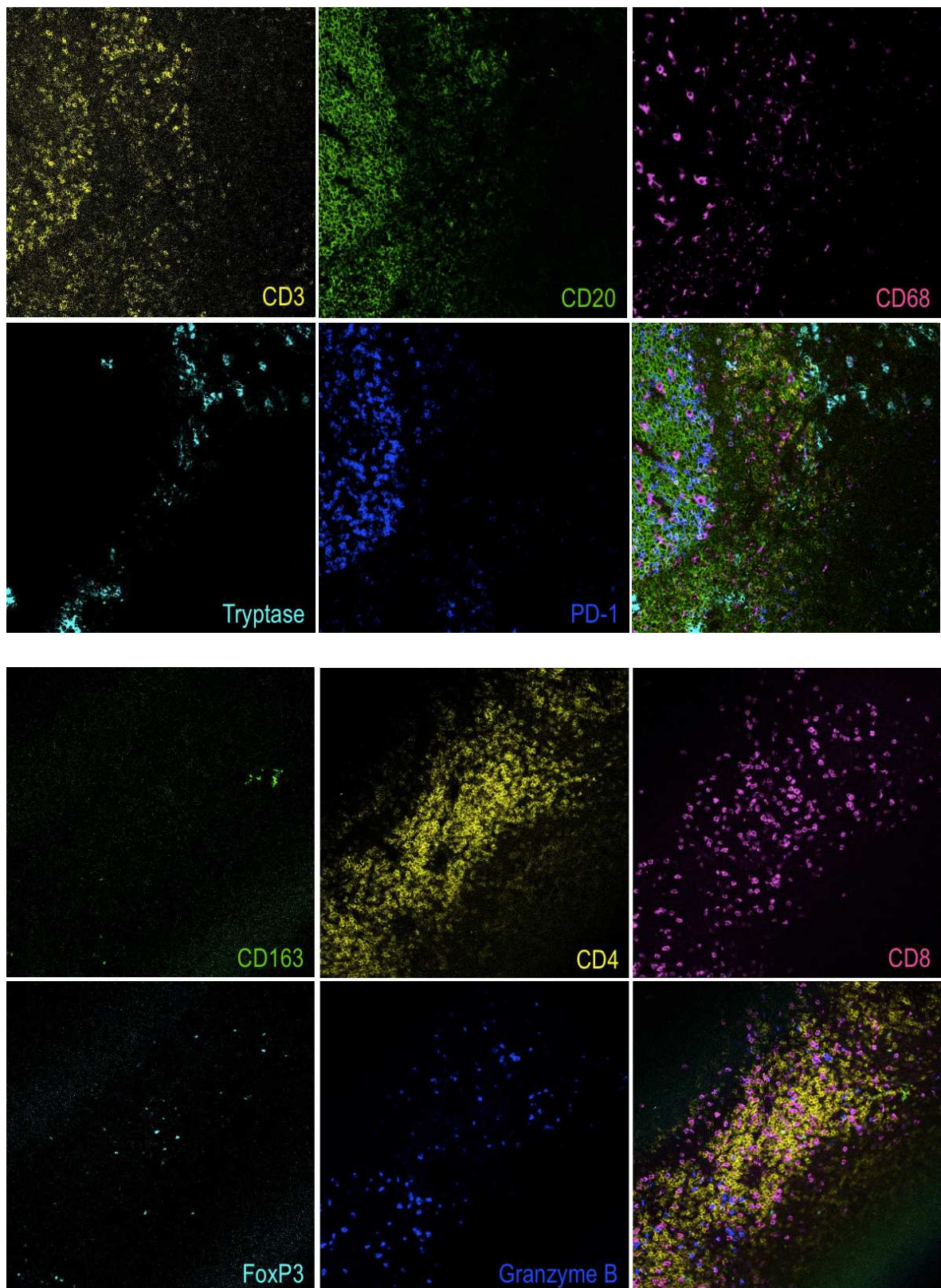


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der einzelnen Marker an Tonsillengewebe. Leica TCS SP8 Mikroskop, Vergrößerung: 20x

3.2 Deskriptive Analyse der Patient:innencharakteristika

Von 76 Patient:innen wurden je nach vorhandener Diagnose insgesamt 221 Gewebeproben verwendet. Davon enthält das Kollektiv 69 Proben von Normalgewebe, 108 Vorläuferläsionen und 44 Tumorproben (= PDAC, davon jeweils 22 aus zentralen und 22 aus peripheren Tumoranteilen). Im Detail sind die Informationen nachfolgend in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 5: Deskriptive Analyse nach Patient:innen. Aufgelistet ist die Anzahl der Patient:innen mit Alter und Geschlecht. Die Altersangaben beziehen sich auf das Alter bei Diagnosestellung in Jahren.

Patient:innen gesamt	Alter				Geschlecht	
	Minimum	Maximum	Median	Mittelwert	Männlich	Weiblich
76	26	84	72	67	41%	59%

Tabelle 6: Deskriptive Analyse nach Diagnosen. Aufgelistet sind die Anzahl und der prozentuale Anteil der verschiedenen diagnostizierten Vorläuferläsionen sowie Normalgewebe und PDAC (= Tumor zentral und Tumor peripher) mit Alter und Geschlecht der Patient:innen. Die Altersangaben beziehen sich auf das Alter bei Diagnosestellung in Jahren.

		Geschlecht					Alter		
		weiblich		männlich		Gesamt	Median	Minimum	Maximum
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent				
Diagnose	Normalgewebe	41	59,4%	28	40,6%	69	73	26	84
	ADM	9	56,3%	7	43,8%	16	72	55	83
	PanIN low grade	13	52,0%	12	48,0%	25	74	37	83
	PanIN high grade	3	42,9%	4	57,1%	7	77	64	81
	Gastrale IPMN low grade	17	60,7%	11	39,3%	28	75	56	84
	Gastrale IPMN high grade	5	71,4%	2	28,6%	7	76	56	83
	Intestinale IPMN low grade	3	60,0%	2	40,0%	5	74	57	82
	Intestinale IPMN high grade	6	66,7%	3	33,3%	9	67	55	74
	Pankreatobiliäre IPMN	0	0,0%	1	100,0%	1	67	67	67
	IOPN	1	100,0%	0	0,0%	1	76	76	76
	MCN low grade	7	87,5%	1	12,5%	8	46	26	64
	MCN high grade	1	100,0%	0	0,0%	1	37	37	37
	Tumor zentral	11	50,0%	11	50,0%	22	76	37	83
	Tumor peripher	11	50,0%	11	50,0%	22	76	64	83

3.3 Testung auf Normalverteilung

Zunächst wurden die Daten mittels *Kolmogorov-Smirnov* und *Shapiro-Wilk*-Tests auf Normalverteilung untersucht. Wie der untenstehenden Tabelle 6 zu entnehmen ist, ergab sich für alle Werte eine Signifikanz von 0,0. Somit konnte gezeigt werden, dass die Daten bei $p < 0,05$ nicht normalverteilt sind. Folglich wurden für die weitere Auswertung nicht-parametrische Tests verwendet.

Tabelle 7: Test auf Normalverteilung

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
CD3	,143	213	,000	,828	213	,000
CD20	,291	213	,000	,551	213	,000
CD68	,153	213	,000	,855	213	,000
Tryptase	,195	213	,000	,779	213	,000
CD163	,142	213	,000	,857	213	,000
CD4	,194	213	,000	,763	213	,000
PD1	,356	213	,000	,384	213	,000
CD8	,160	213	,000	,847	213	,000
FoxP3	,276	213	,000	,593	213	,000
GranzymeB	,301	213	,000	,479	213	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

3.4 Zellen der angeborenen Immunantwort

Als Mastzellmarker wurde Tryptase genutzt. Die Anzahl der Mastzellen war in allen Vorläuferläsionen mit der Ausnahme von MCN signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe. Besonders statistisch signifikant waren die Unterschiede von ADM ($p < 0,001$), PanIN ($p < 0,001$), gastralen IPMN ($p < 0,001$) und intestinalen IPMN ($p < 0,05$) verglichen mit Normalgewebe. Im Verhältnis zu MCN fanden sich in allen Vorläuferläsionen (mit Ausnahme von intestinalen IPMN) signifikant gesteigerte Mastzellzahlen (siehe Abb. 13). Ebenso war die Anzahl der Tryptase+ Mastzellen in gastralen IPMN im Vergleich zu Tumorgewebe signifikant erhöht ($p < 0,05$).

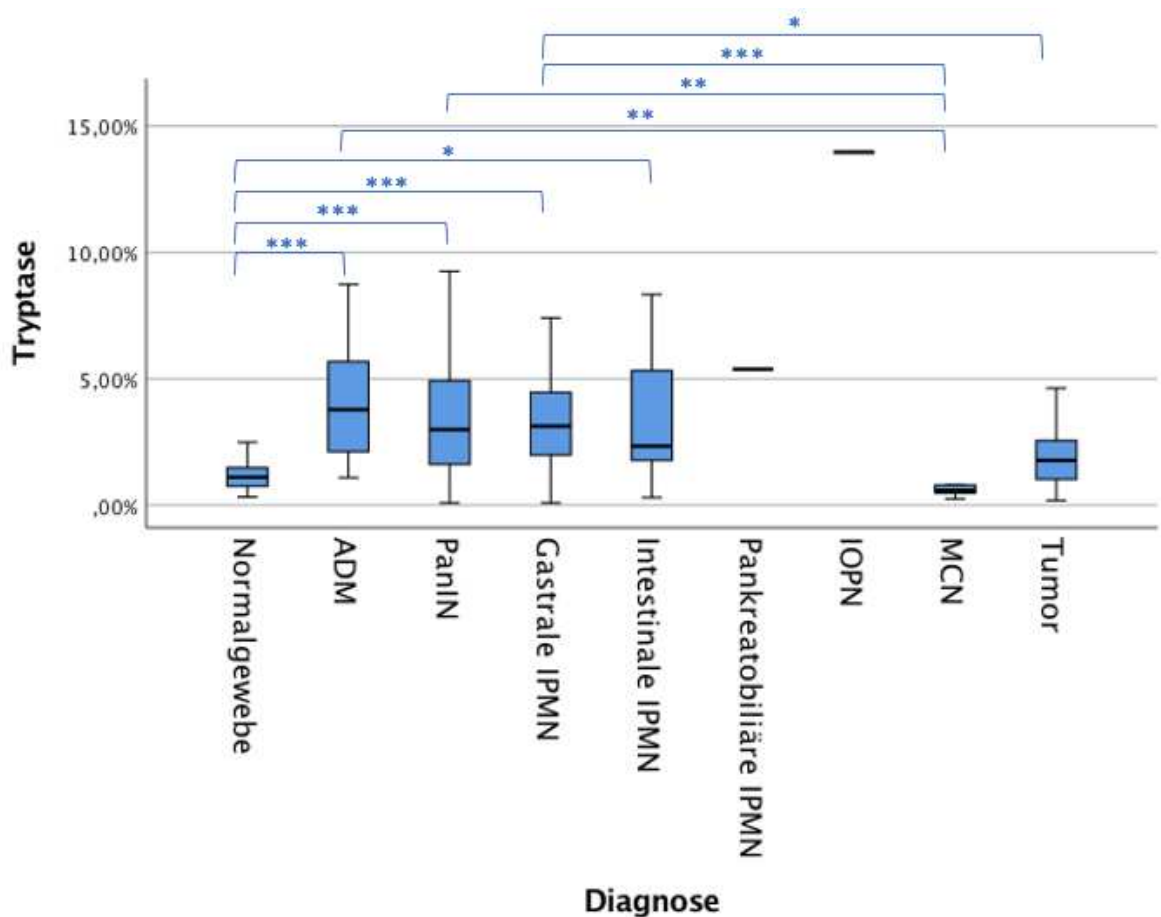


Abbildung 13: Vergleich der Trypsin+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Zur Detektion von Makrophagen im Allgemeinen wurde CD68 als Marker verwendet. Dabei zeigten sich grundsätzlich in allen Vorläuferläsionen mehr CD68 positive Zellen im Vergleich zu Normalgewebe. Signifikant erhöht waren die Makrophagen in ADM ($p < 0,001$), PanIN ($p < 0,05$) sowie PDAC ($p < 0,001$) im Verhältnis zu Normalgewebe. High-grade PanIN zeigten einen erhöhten Median der CD68+ Färbungen im Vergleich zu PanIN low grade Läsionen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Weiterhin fanden sich im Verhältnis zu gastralen IPMN vermehrt Makrophagen in ADM ($p < 0,05$) und PDAC ($p < 0,05$).

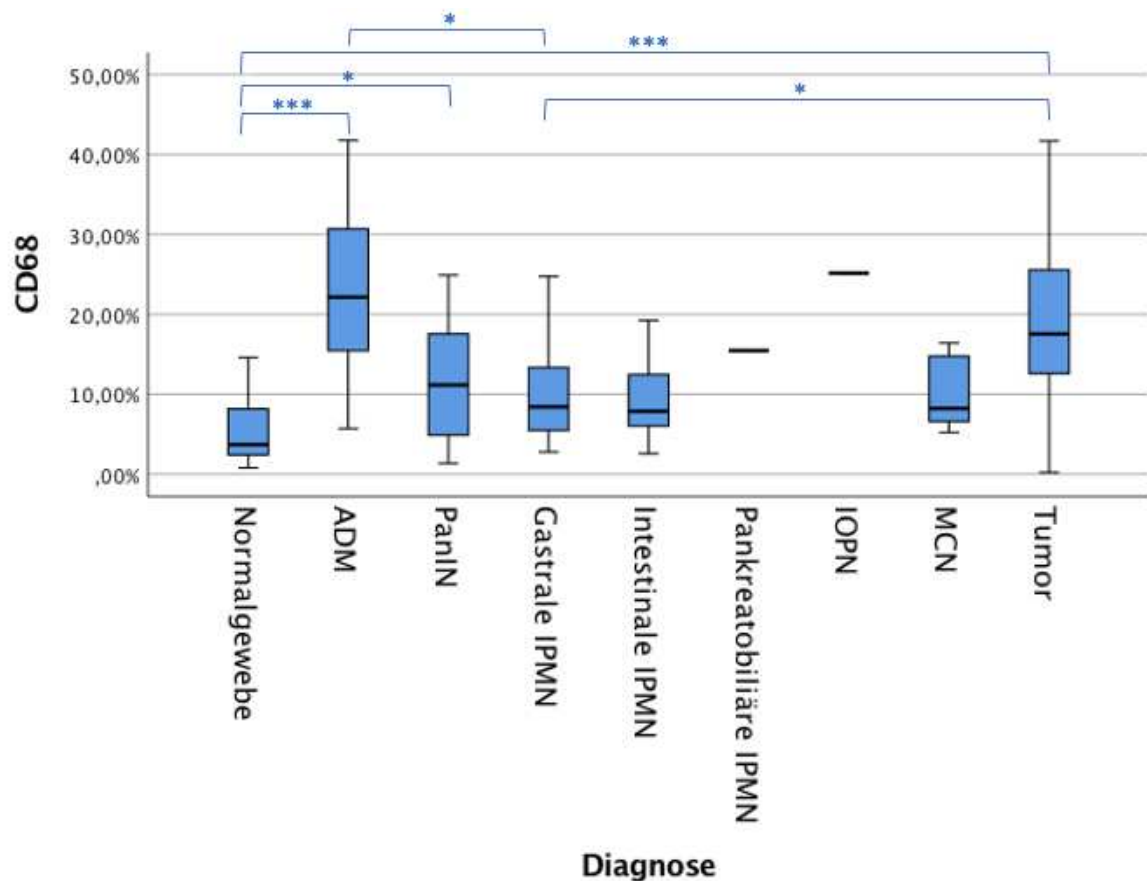


Abbildung 14: Vergleich der CD68+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Zusätzlich wurde CD163 zur immunhistochemischen Färbung von M2-Makrophagen genutzt. Wie in Abb. 15 zu sehen ist, ließen sich im Vergleich zu Normalgewebe insbesondere deutliche Anstiege der CD163+ Zellen in ADM ($p < 0,01$) und Tumorgewebe ($p < 0,001$) feststellen. Die anderen Vorläuferläsionen wiesen eher niedrige CD163+ Zellzahlen auf. Die Anzahl der CD163+ Zellen war zudem im PDAC im Vergleich zu gastralen IPMN signifikant erhöht ($p < 0,001$).

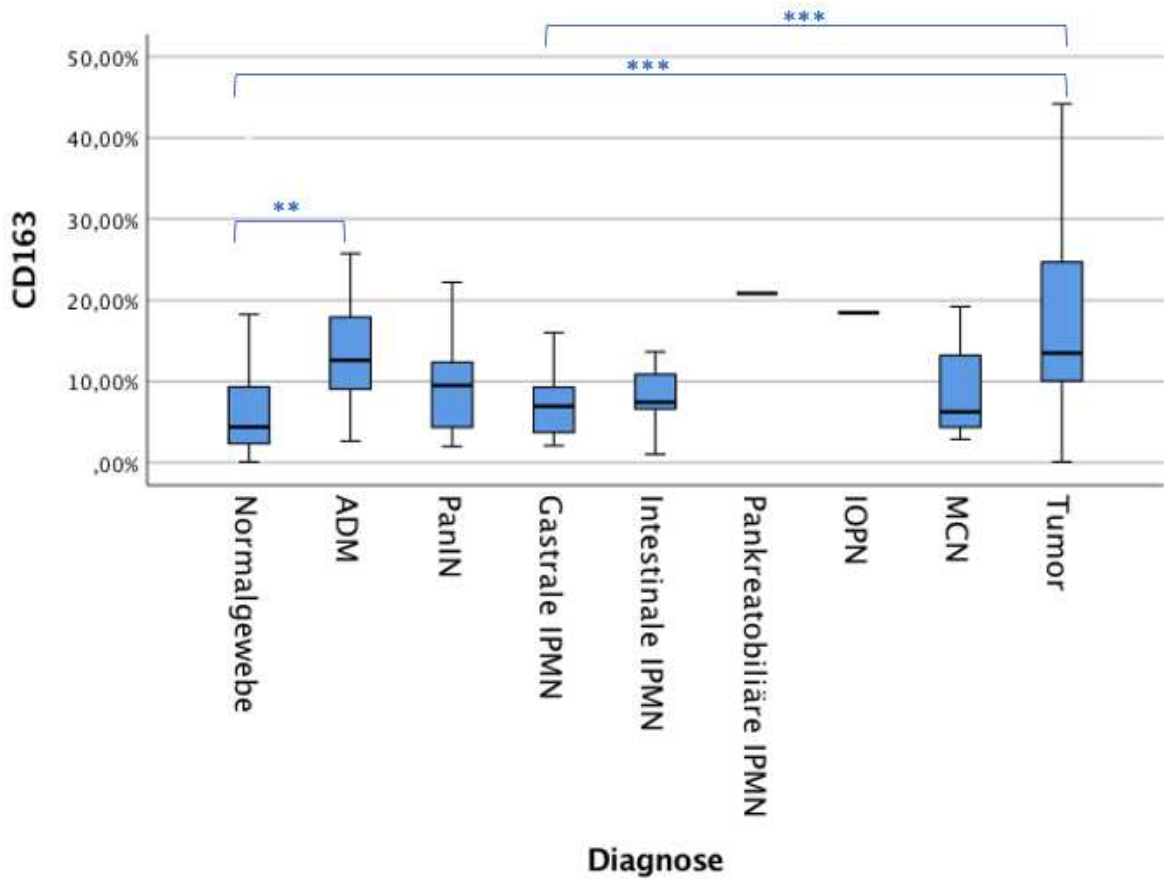


Abbildung 15: Vergleich der CD163+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

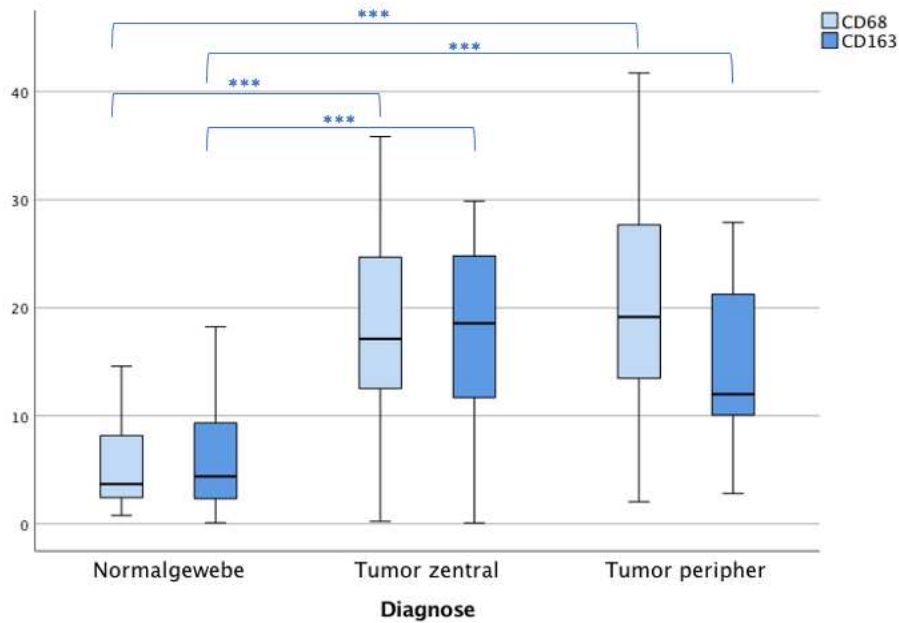


Abbildung 16: Vergleich der CD68+ (hellblau) und CD163+ Zellen (dunkelblau) zwischen Normalgewebe, zentralen und peripheren Tumoranteilen. Die CD68+ und CD163+ Zellen sind im Tumorgewebe signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe.

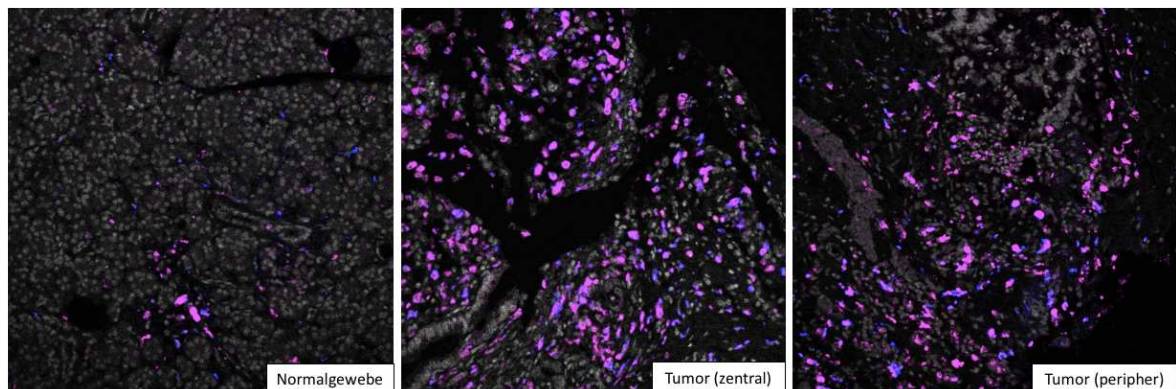


Abbildung 17: CD68+ Zellen (pink) und CD163+ Zellen (lila) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Normalgewebe und PDAC zentral und peripher. Repräsentative Abbildung. Es finden sich mehr CD68+ und CD163+ Zellen im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Graufärbung: DAPI. Vergrößerung: 20x

3.5 Zellen der erworbenen Immunantwort

Zur Untersuchung von B-Zellen wurde das Protein CD20 als genereller B-Zell-Marker verwendet.

Im Median zeigten sich, wie auch Abb. 18 zu entnehmen ist, die CD20+ B-Zellen in sämtlichen Vorläuferläsionen sowie auch dem PDAC deutlich niedriger im Vergleich zu den CD3+ T-Zellen.

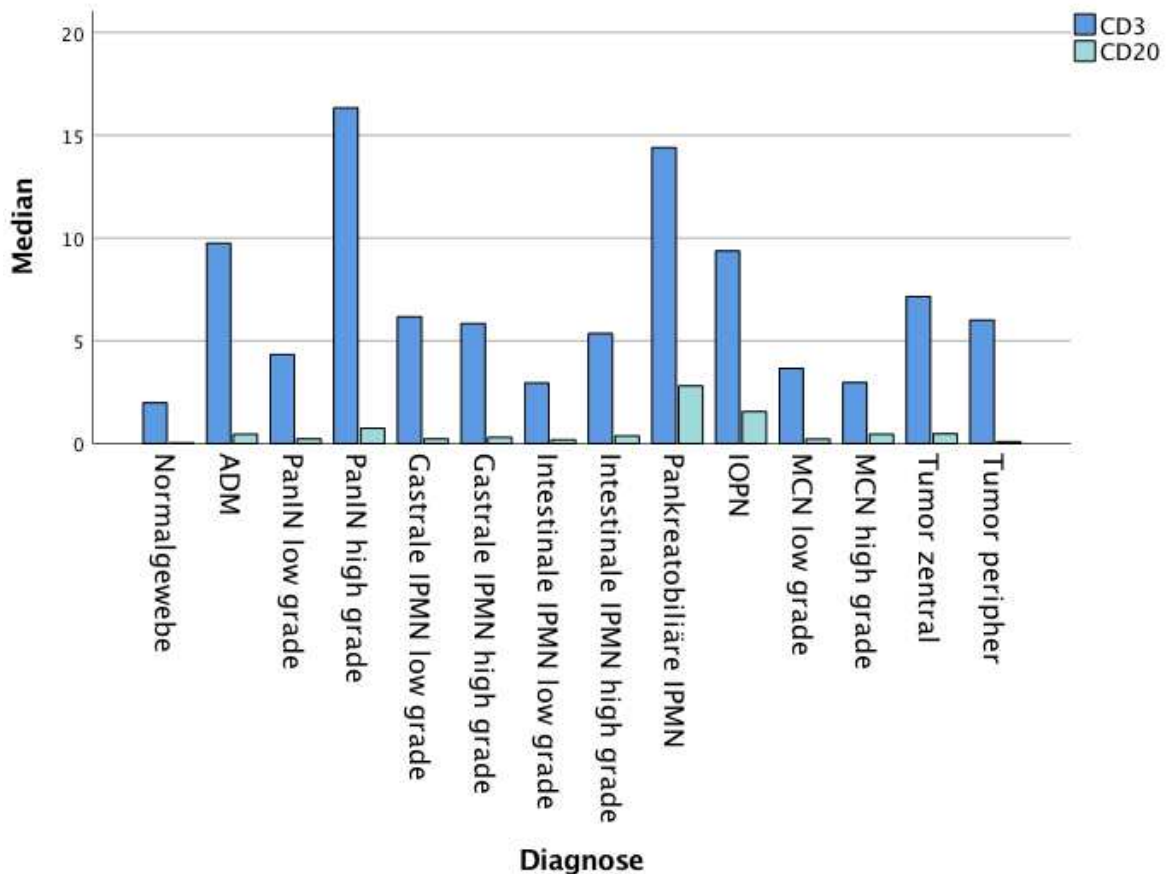


Abbildung 18: Median der CD3+ Zellen (dunkelblau) im Vergleich zu CD20+ Zellen (hellblau). Graphische Darstellung der Mediane im gruppierten Balkendiagramm. Über alle dargestellten Vorläuferläsionen hinweg sowie im Normalgewebe und dem Tumorgewebe ist der Median der CD20+ Zellen gegenüber den CD3+ Zellen deutlich geringer.

Wie in Abb. 19 graphisch dargestellt, wurde Normalgewebe mit Vorläuferläsionen und Gewebeproben des PDAC im Hinblick auf CD20 positive Zellen verglichen. Die CD20-Zellzahl (B-Zellzahl) zeigte sich in allen Vorläuferläsionen und im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht. Es fanden sich signifikant mehr B-Zellen in ADM ($p < 0,001$), PanIN ($p < 0,001$), gastralen IPMN ($p < 0,001$), intestinalen IPMN ($p < 0,01$), MCN ($p < 0,05$) und Tumor ($p < 0,001$) im Verhältnis zu Normalgewebe.

Tendenziell zeigten sich bei genauer Differenzierung des Dysplasiegrades im Median mehr positive CD20 Zellen in den high-grade Läsionen von PanIN, gastralen und intestinalen IPMN verglichen mit den korrespondierenden low-grade Läsionen.

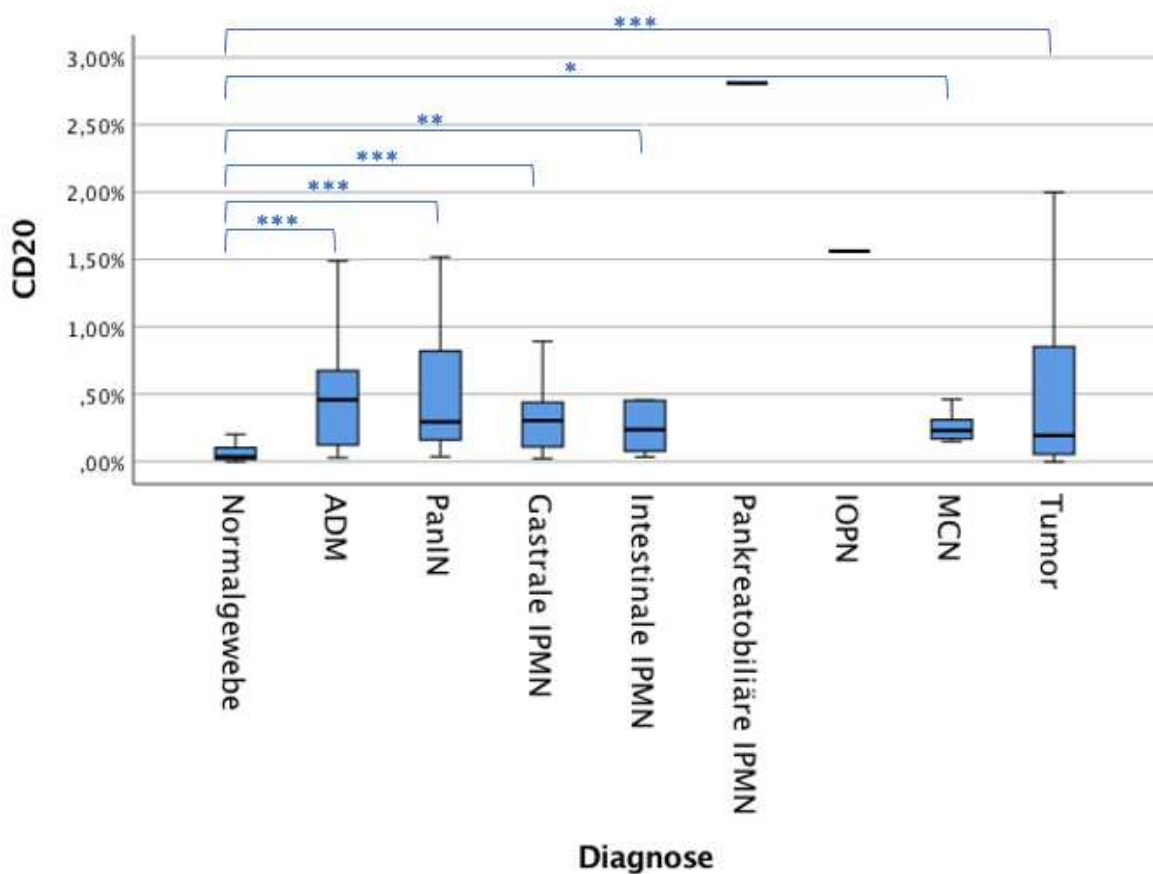


Abbildung 19: Vergleich der CD20+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

In Abb. 20 sind vergleichend die Unterschiede zwischen den Vorläuferläsionen, Normalgewebe und Tumorgewebe im Hinblick auf die CD3-Zellzahl, stellvertretend für die Gesamtheit der T-Zellen, dargestellt. Es konnte ein signifikanter Anstieg der T-Zellzahl von ADM ($p < 0,001$), PanIN ($p < 0,001$) und gastralen IPMN ($p < 0,001$) verglichen mit Normalgewebe festgestellt werden. High-grade PanIN wiesen im Verhältnis zu low-grade PanIN im Median tendenziell mehr CD3+ Zellen auf. Ebenso fanden sich signifikant mehr T-Zellen in Tumorgewebe im Vergleich mit Normalgewebe ($p < 0,001$).

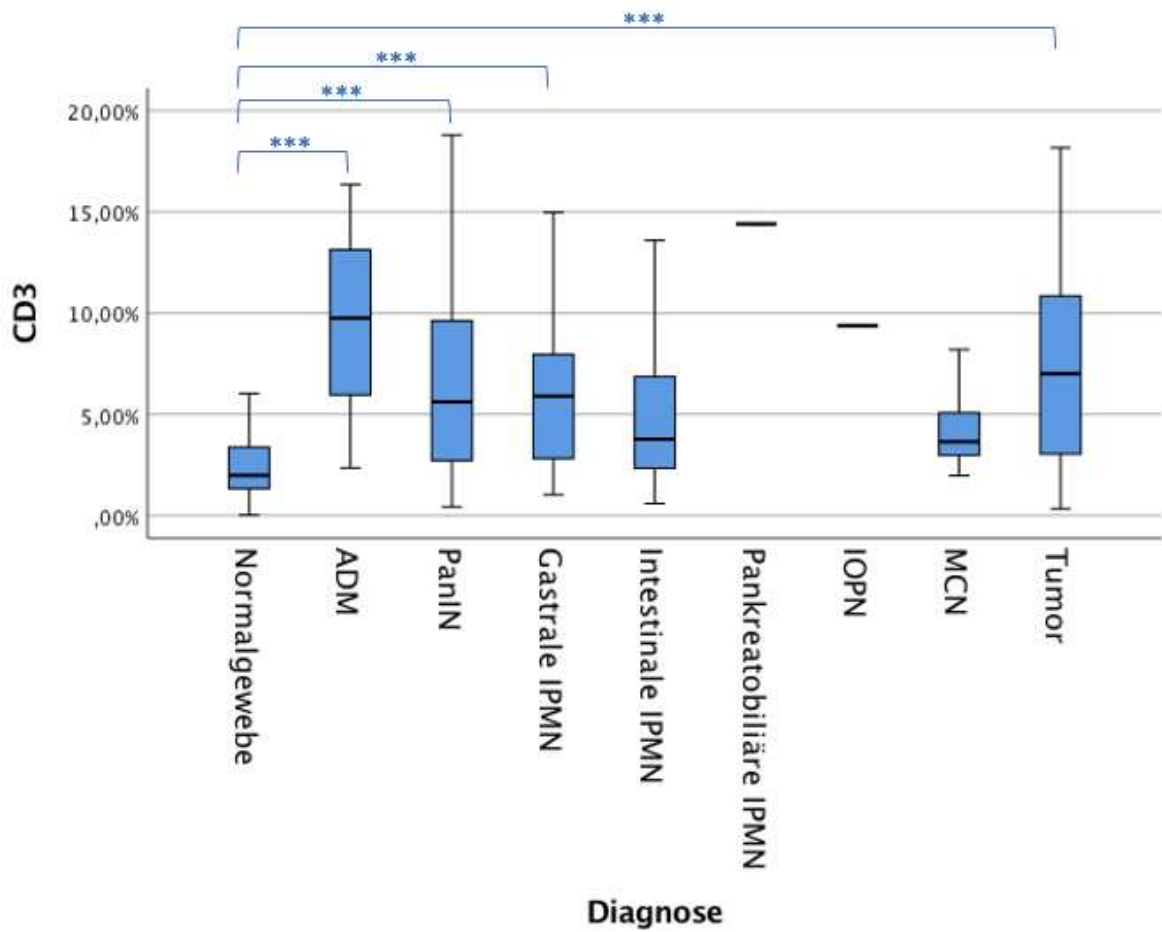


Abbildung 20: Vergleich der CD3+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

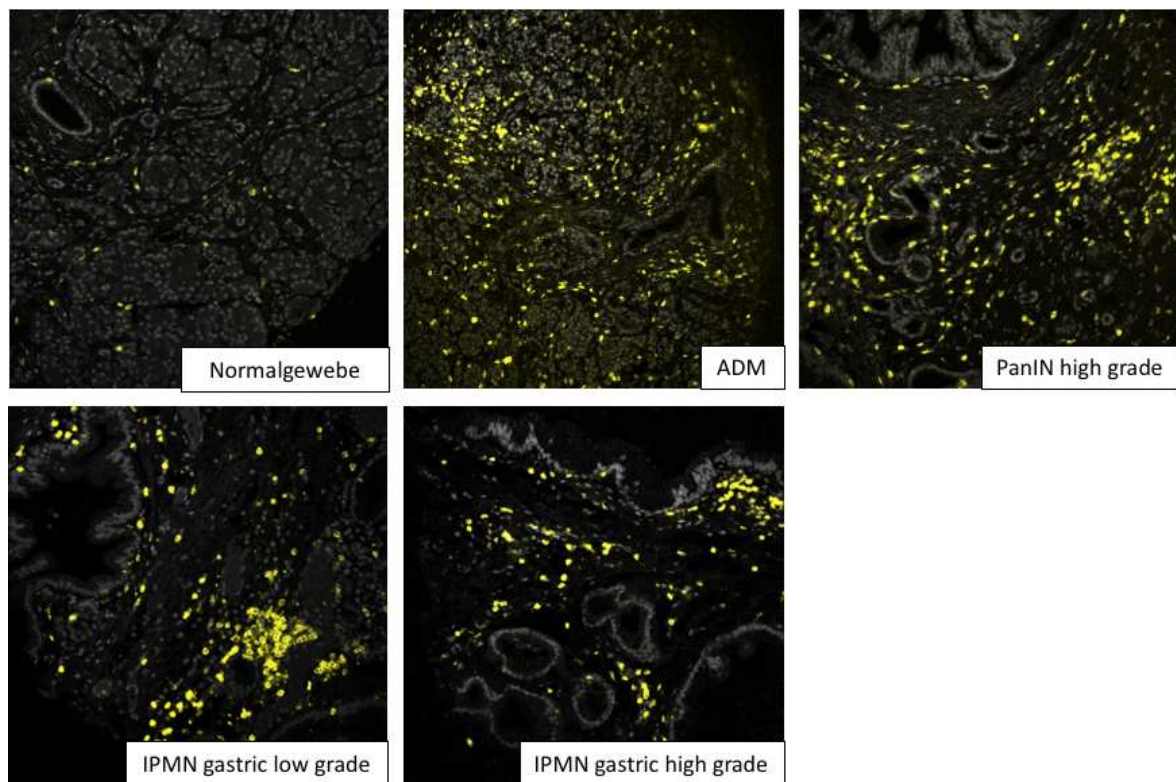


Abbildung 21: CD3+ Zellen (gelb) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Normalgewebe, ADM, PanIN high grade sowie gastralen IPMN low und high grade. Repräsentative Abbildung. Es finden sich mehr CD3+ Zellen in den aufgeführten Vorläuferläsionen als im Normalgewebe. Graufärbung: DAPI. Vergrößerung: 20x

Stellvertretend für den Anteil an zytotoxischen T-Zellen wurde CD8 als Marker für die Immunhistochemie verwendet. In Abb. 22 sind die verschiedenen Läsionen jeweils im Bezug auf die CD8-Zellzahl dargestellt. Es ließen sich nach statistischer Auswertung signifikante Anstiege der Anzahl an CD8+ Zellen von ADM ($p < 0,01$), PanIN ($p < 0,01$) und gastralen IPMN ($p < 0,001$) verglichen mit Normalgewebe ableiten, wobei sich in high-grade PanIN und low-grade gastralen IPMN jeweils tendenziell höhere Mediane zeigten.

Als weiterer Marker wurde zur genaueren Identifizierung der zytotoxischen T-Zellen Granzyme B genutzt. Im Rahmen der Multiplex-IHC konnten hier allerdings (bei positiver externer Kontrolle an normalem Tonsillengewebe) nur wenige Pankreaszellen gefärbt werden und es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Vorläuferläsionen, Tumor- und Normalgewebe.

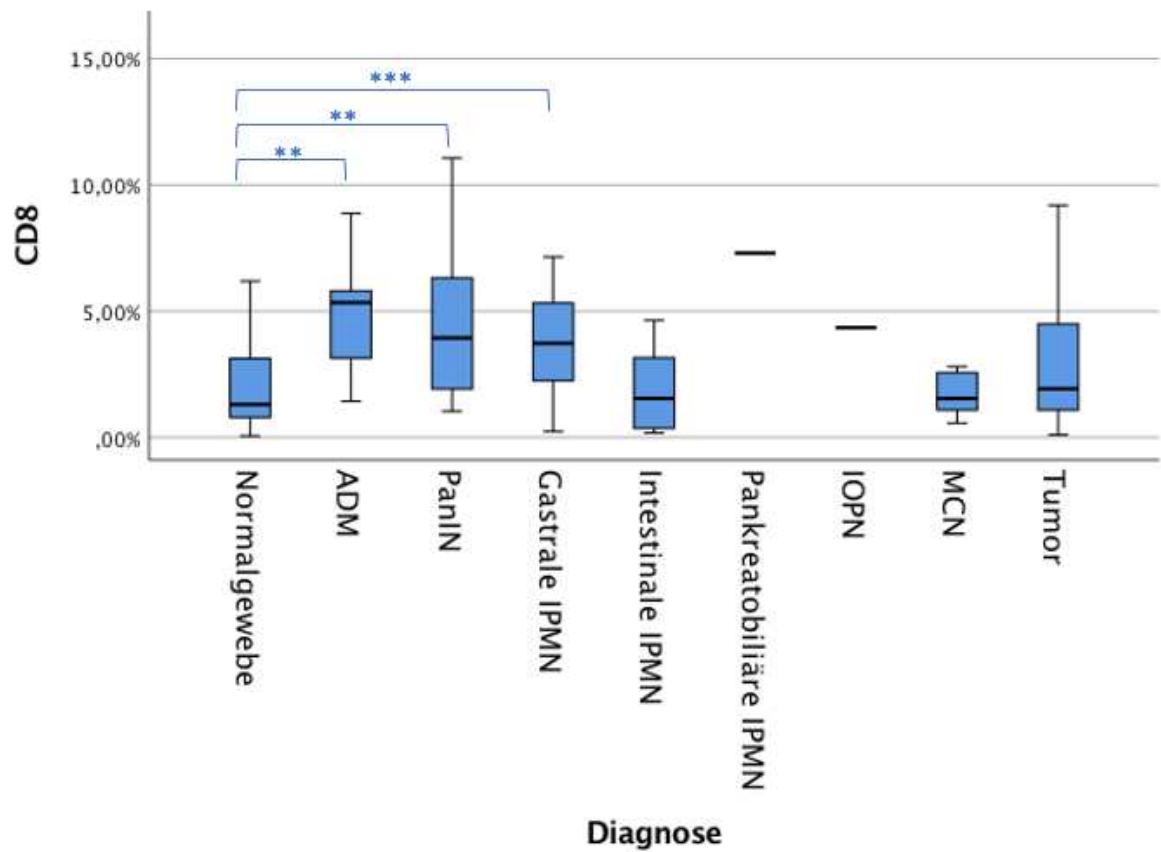


Abbildung 22: Vergleich der CD8+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

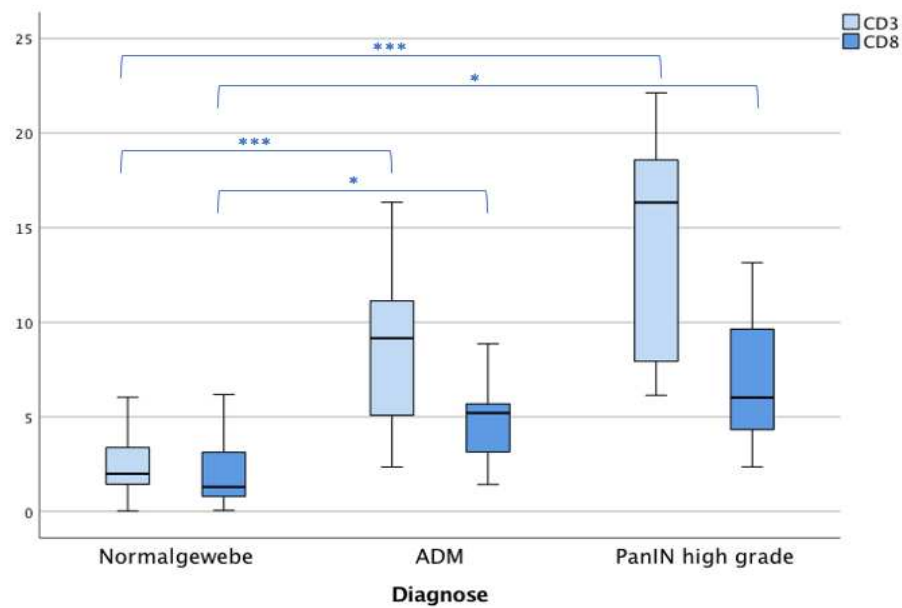


Abbildung 23: Vergleich der CD3+ (hellblau) und CD8+ Zellen (dunkelblau) zwischen Normalgewebe, ADM und PanIN high grade. Die CD3+ und CD8+ Zellen sind in ADM und PanIN high grade signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe.

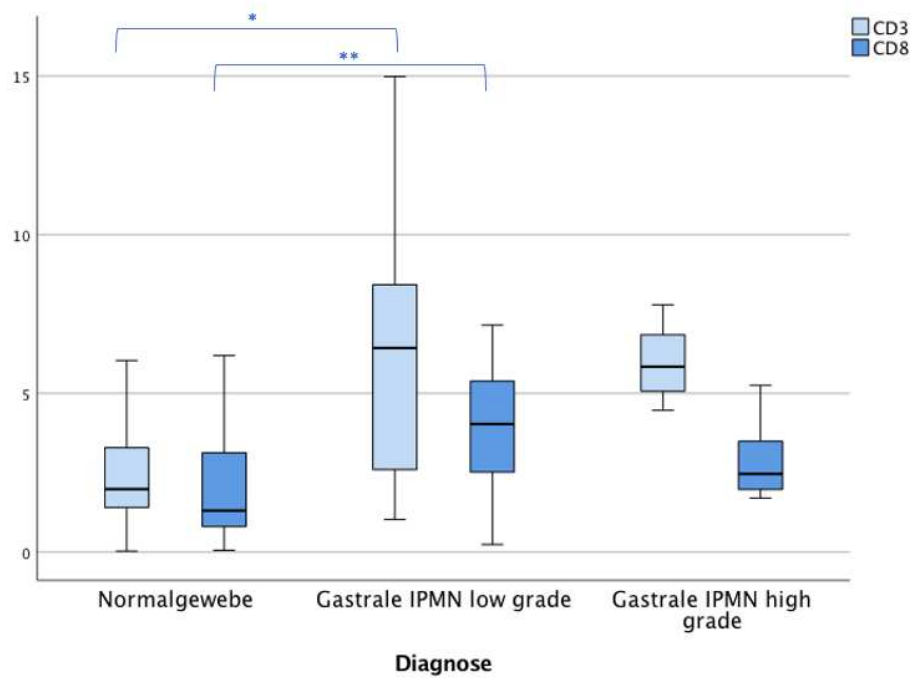


Abbildung 24: Vergleich der CD3+ (hellblau) und CD8+ Zellen (dunkelblau) zwischen Normalgewebe, gastralen IPMN low grade und high grade. Die CD3+ und CD8+ Zellen sind in low grade gastralen IPMN signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe. Für gastrale IPMN high grade ergeben sich im Vergleich keine signifikanten Zellzahlveränderungen.

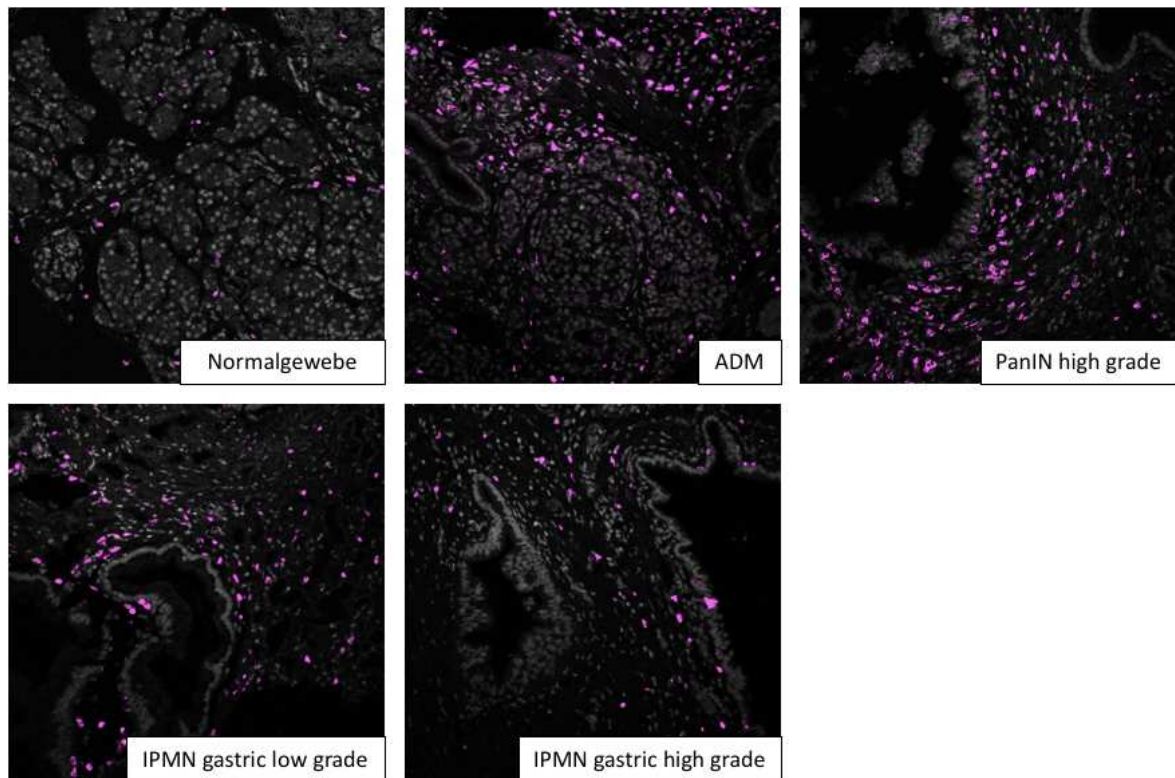


Abbildung 25: CD8+ Zellen (pink) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Normalgewebe, ADM, PanIN high grade sowie gastralen IPMN low und high grade. Repräsentative Abbildung. Es finden sich mehr CD8+ Zellen in den aufgeführten Vorläuferläsionen als im Normalgewebe. Graufärbung: DAPI. Vergrößerung: 20x

Zur Evaluation der T-Helferzellen wurde CD4 als Marker verwendet. In Abb. 26 dargestellt ist die Zahl der CD4+ Zellen verglichen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumorgewebe. Es zeigten sich signifikant höhere T-Helfer-Zellzahlen in ADM-Läsionen ($p < 0,01$), PanIN ($p < 0,01$), gastralen IPMN ($p < 0,05$) sowie PDAC ($p < 0,001$) im Vergleich zu Normalgewebe.

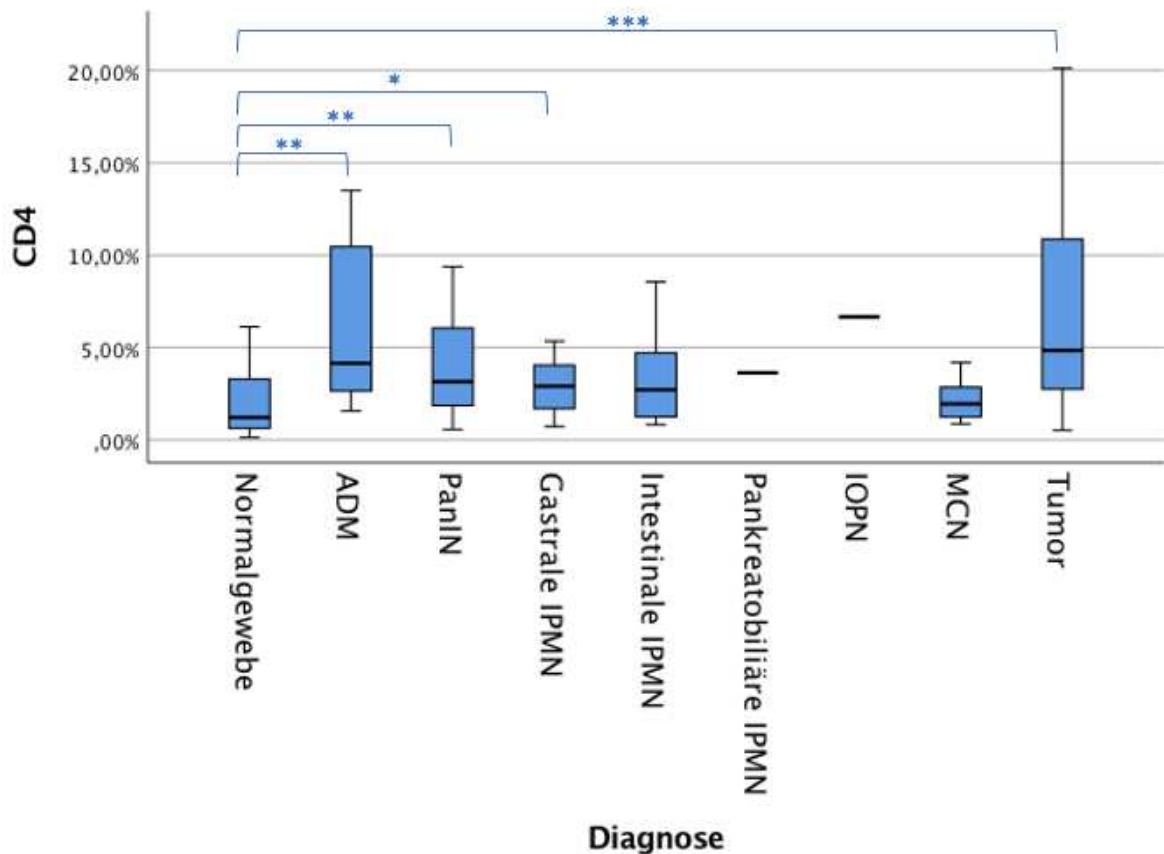


Abbildung 26: Vergleich der CD4+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

FoxP3 wurde als Marker für die regulatorischen T-Zellen verwendet. Wie in Abb. 27 dargestellt, fanden sich insgesamt sowohl im Normalgewebe als auch in den Vorläuferläsionen und dem PDAC geringe FoxP3-Zellzahlen. Es ergab sich im Vergleich zu Normalgewebe eine signifikante Vermehrung der FoxP3+ Zellen in ADM ($p < 0,01$), PanIN ($p < 0,05$), gastralen IPMN ($p < 0,01$) und Tumor ($p < 0,001$).

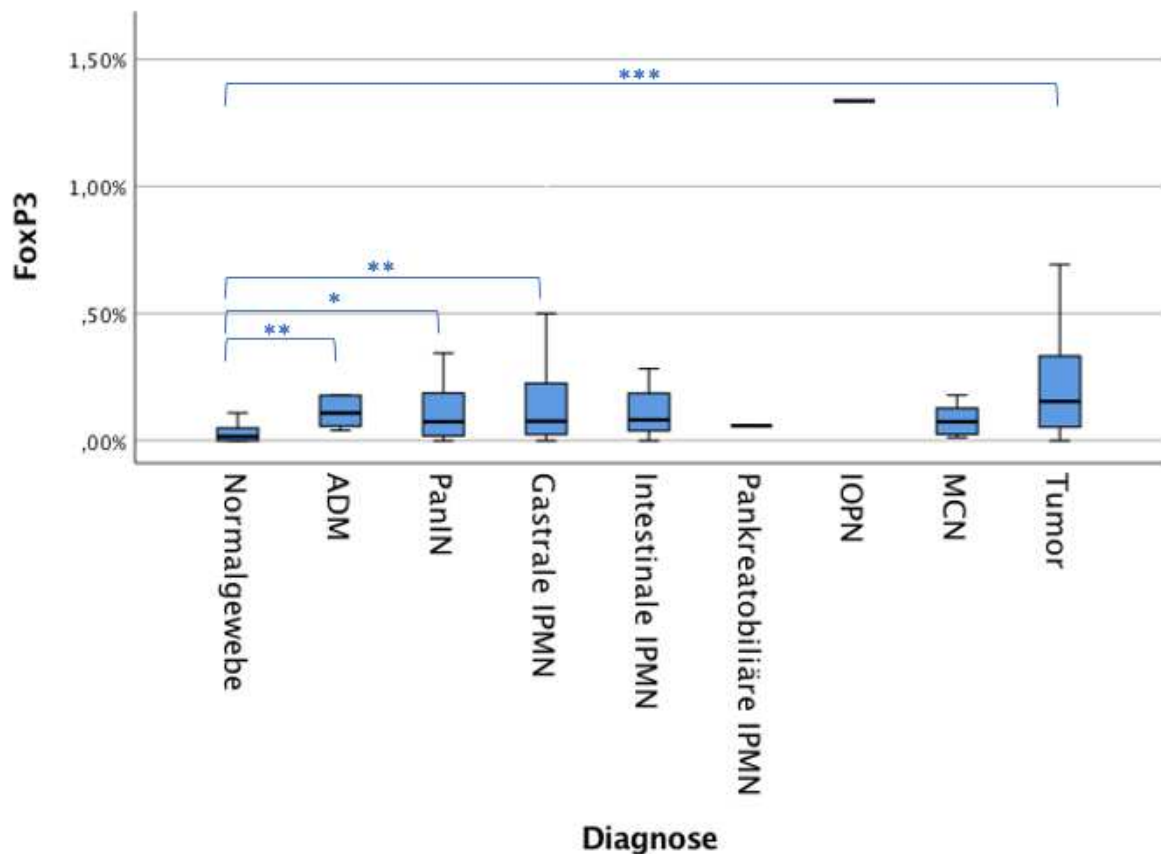


Abbildung 27: Vergleich der FoxP3+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Zur Evaluation der Rolle von *Immune-Checkpoints* im PDAC und seinen Vorläuferläsionen wurde PD-1 als Marker genutzt. Es konnten signifikante Steigerungen der PD-1+ Zellen für ADM ($p < 0,05$), PanIN ($p < 0,01$) gastralen IPMN ($p < 0,01$) und PDAC ($p < 0,05$) im Vergleich zu Normalgewebe festgestellt werden (vgl. Abb. 28). Insgesamt waren (bei positiver externer Kontrolle an normalem Tonsillengewebe) nur wenige PD-1+ Zellen in den verschiedenen Pankreasgeweben zu identifizieren.

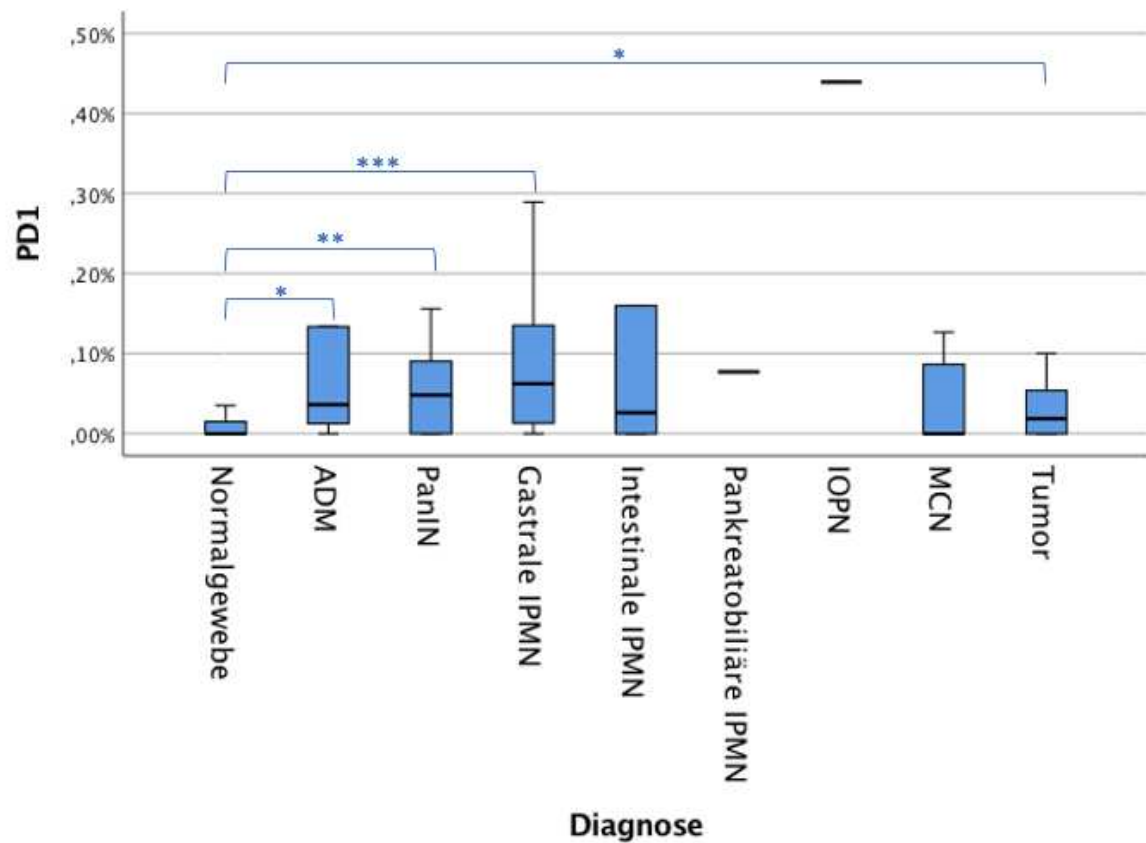


Abbildung 28: Vergleich der PD-1+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

4 Diskussion

Das Tumormikromilieu im PDAC stellt einen wichtigen Faktor in Bezug auf die Tumorprogression und -metastasierung dar (32,33). Insgesamt wird das PDAC überwiegend zu den immunsuppressiven Tumorentitäten gezählt (149,150). Dies deckt sich weitestgehend mit unseren Ergebnissen, welche zeigen, dass das Immuninfiltrat sowohl in zentralen als auch peripheren Tumoranteilen im Vergleich zu Normalgewebe verstärkt durch FoxP3+ Zellen, CD4+ T-Zellen sowie CD68+/CD163+ Makrophagen charakterisiert ist.

Gleichzeitig gibt es bislang nur wenige Daten zur Untersuchung früher Stadien der Tumorgenese des PDACs. In dieser Promotionsarbeit wurden Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems und ihr Verhalten im Verlauf der Entstehung des PDAC mit Fokus auf verschiedene Vorläuferläsionen genauer untersucht. Wir konnten zeigen, dass die Zusammensetzung der Immunzellen in Vorläuferläsionen des PDAC sehr heterogen ist. Dies gibt Hinweise darauf, dass Immunzellen eine aktive Rolle in der Karzinogenese des PDAC spielen und die Entwicklung des PDAC einer dynamischen Beziehung zwischen dem Immunmikromilieu und epithelialen Zellen unterliegt.

Im Folgenden sollen die erarbeiteten Ergebnisse dieses Promotionsprojekts in den Kontext der wissenschaftlichen Datenlage eingeordnet werden. Hierfür werden zunächst die Zellen der angeborenen Immunantwort, gefolgt von den Zellen der erworbenen Immunantwort, näher beleuchtet. Im Anschluss werden weitere wichtige Aspekte zu Unterschieden der jeweiligen Vorläuferläsionen sowie zur klinischen Relevanz und Herausforderungen bzw. Limitationen der Arbeit dargestellt.

4.1 Rolle von Makrophagen in Vorläuferläsionen des duktaalen Pankreaskarzinoms

Die Zahl der CD68+ Makrophagen stieg im eigenen Patient:innenkollektiv in ADM, PanIN (vor allem high-grade) und PDAC im Vergleich zu Normalgewebe signifikant an. Die CD163+ M2-Makrophagen kamen vor allem in ADM und PDAC gehäuft vor. Eine Erklärung für die hohen Zahlen an Makrophagen in ADM könnten die Forschungsergebnisse von *Liou et al.* sein (151,152). Sie konnten zeigen, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in der Transdifferenzierung von Azinuszellen hin zu ADM spielen. Dies geschieht unter anderem

durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Tumornekrosefaktor (TNF) und durch Enzyme wie MMP9. Wie auch in unseren Ergebnissen dargestellt, konnten *Liou et al.* in einer weiteren Studie auch eine starke Präsenz an CD68+ Makrophagen im Mikromilieu von PanIN feststellen. Dabei handelte es sich in der Umgebung von ADM primär um M1-Makrophagen, während die Makrophagen um PanIN Läsionen überwiegend M2-polarisiert waren. Als entscheidender Faktor für die Polarisierung der Makrophagen konnte IL-13 identifiziert werden (153). Das verstärkte Vorkommen von M2-Makrophagen im Mikromilieu von PanIN zeigte sich in unserem Kollektiv jedoch nicht bzw. nur in Tendenzen. Konkordant mit unseren Resultaten fanden auch *Clark et al.* sowohl in PanIN als auch im PDAC erhöhte Zahlen an Makrophagen (154). In einer Studie von *Bastea et al.* wurde Pomalidomid, ein Medikament aus der Gruppe der Immunmodulatoren, welches durch Herabregulation des Transkriptionsfaktors *Interferon regulatory factor 4* zu einer Erniedrigung der M2-Makrophagenzahlen führt, an Mäusen getestet. Dies bewirkte durch die Reduktion der M2-Makrophagen eine deutliche Verringerung von Fibrose in PanIN Läsionen (155). Eine Vielzahl an Studien konnte bereits belegen, dass hohe Level an M2-Makrophagen zu einem schlechteren Outcome bei PDAC Patient:innen führen (60,156).

4.2 Rolle von Mastzellen in Vorläuferläsionen des duktalen Pankreaskarzinoms

In dieser Promotionsarbeit fanden sich in ADM, PanIN sowie gastralen und intestinalen IPMN signifikante Steigerungen der Mastzell-Zahlen im Vergleich zu Normalgewebe. Interessanterweise wiesen MCN und PDAC im Verhältnis hierzu nur sehr geringe Anteile an Mastzellen auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass Mastzellen während der Karzinogenese in den genannten Vorläuferläsionen eine Rolle spielen, jedoch bei Auftreten des Karzinoms im Verlauf weniger relevant werden. Ein anderes Erklärungsmodell könnte die Arbeit von *Chang et al.* sein (157). Konkordant zu unseren Ergebnissen fanden sie ebenso einen erhöhten Zustrom von Mastzellen in die Mikroumgebung von PanIN Läsionen. Während die Mastzellen um PanIN gleichmäßig verteilt waren, zeigte sich im PDAC eine Akkumulation der Mastzellen vor allem am Infiltrationsrand des Tumors, sodass es im eigenen Kollektiv aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung womöglich zu einer erschwerten Erfassung durch die Verwendung von TMAs und die Software-basierte Analyse gekommen sein könnte. Zwar wurde durch die Nutzung von Proben aus peripheren und zentralen Tumoranteilen im eigenen Kollektiv versucht, dies zu berücksichtigen, dennoch könnte es potentiell zu Einschränkungen gekommen sein.

Esposito et al. konnten bereits mehrfach einen Zusammenhang zwischen Mastzellaktivierung, chronischer Pankreatitis und PDAC feststellen (158–160). Andere Studien konnten *in vitro* sogar eine Unterstützung des Tumorwachstums durch Mastzellen (161) sowie eine Mastzell-begünstigte Chemotherapie-Resistenz im PDAC durch TGF-beta Aktivierung zeigen (162).

4.3 Rolle der T- und B-Zell-vermittelten Immunreaktion in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms

Die T-Zell-vermittelte Immunantwort zeigte sich in unseren Ergebnissen in allen Geweben (Normalgewebe, Vorläuferläsionen und PDAC) prädominant im Vergleich zur B-Zell-vermittelten Immunreaktion. Dies lässt darauf schließen, dass B-Zellen im Mikromilieu von Pankreasgewebe grundsätzlich eine untergeordnete Rolle spielen und nur einen geringen Einfluss auf die Karzinogenese haben. Dennoch konnten wir, trotz insgesamt geringer B-Zellzahlen, in Teilen eine signifikante Dynamik feststellen. Das Mikromilieu von ADM, PanIN, IPMN und MCN wies verglichen mit Normalgewebe signifikant mehr CD20+ Zellen auf.

Insgesamt ist die Datenlage zur Rolle von B-Zellen im PDAC und vor allem seinen Vorläuferläsionen allerdings noch spärlich. Eine Studie von *Pylayeva-Gupta et al.* weist darauf hin, dass B-Zellen, welche in PanIN und PDAC von humanen und murinen Gewebeproben gefunden wurden, über eine IL-35 vermittelte Immunreaktion die Tumorphilierung im PDAC unterstützen (67). Andere Daten suggerieren, dass hohe Level an CD20+ B-Lymphozyten im PDAC mit einem verbesserten Überleben der Patient:innen einhergehen könnten (163). So wird die Notwendigkeit deutlich, genauer zwischen den einzelnen B-Zell-Subpopulationen und ihren unterschiedlichen pro- und antitumorigenen Wirkungen zu differenzieren. Limitierend ist an dieser Stelle auch, dass die meisten durchgeführten Untersuchungen zur Relevanz der B-Zellen im PDAC an Mausmodellen oder sehr kleinen Patient:innenkollektiven erfolgt sind (164).

Die T-Zell-vermittelte Immunantwort war in unseren Ergebnissen bezogen auf CD3 als allgemeiner T-Lymphozyten-Marker verglichen mit Normalgewebe neben hohen T-Zellzahlen im Tumorgewebe interessanterweise auch in einigen Vorläuferläsionen des PDAC sehr präsent. Im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe fanden sich in dieser Promotionsarbeit signifikant gesteigerte Pan-T-Zellzahlen für ADM, PanIN sowie gastrale IPMN. Ebenso konnten *Clark et al.* an einem Mausmodell bereits zum Zeitpunkt der Entstehung von PanIN-Läsionen eine Zunahme der CD3+ Zellen in der Mikroumgebung

ermitteln (154). Auch in einer Studie von *Sadozai et al.*, in der das TME von PDAC-Proben von Langzeitüberlebenden (*long term survivors*, LTS) und nicht-Langzeitüberlebenden (Non-LTS) verglichen wurde, konnte in der Gruppe der LTS ein Immunmikromilieu unter anderem reich an CD3+ und CD4+ Zellen festgestellt werden (165). Dadurch wird deutlich, dass T-Lymphozyten eine große Relevanz im PDAC besitzen. Unsere Daten zeigen darüber hinaus, dass es bereits in sehr frühen Stadien der Karzinogenese zu Veränderungen der T-Zell-Antwort kommt.

An dieser Stelle bedarf es einer genaueren Differenzierung der verschiedenen T-Zell-Populationen mit ihren unterschiedlichen Funktionen, worauf im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll.

4.4 Rolle der CD8+ - und CD4+ T-Zellen in Vorläuferläsionen des duktaalen Pankreaskarzinoms

CD8+ Zellen werden durch Interaktionen mit Antigenen, welche auf anderen Zellen über den MHC-I-Komplex präsentiert werden, aktiviert. Durch Sekretion verschiedener Enzyme, können die dann aktivierten zytotoxischen T-Zellen Tumorzellen angreifen. Daher spielen sie eine wichtige Rolle in der antitumoralen Immunantwort (68,150). Die CD8+ zytotoxischen T-Zellen zeigten sich in unseren Ergebnissen insbesondere in ADM, PanIN und gastralen IPMN (vor allem low-grade) erhöht im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. Interessanterweise fand sich im PDAC kein wesentlicher Anstieg der CD8+ Zellen im Vergleich zum Normalgewebe. Zytotoxische T-Zellen scheinen also in der Karzinogenese des PDAC einer großen Dynamik zu unterliegen. Unsere Ergebnisse suggerieren, dass die beginnende pankreatische Karzinogenese (in Stadien der Vorläuferläsionen ADM, PanIN und low grade IPMN vom gastralen Subtyp) zunächst eine aktive Reaktion der zytotoxischen T-Zellen triggert, die dann im späteren Verlauf wieder unterdrückt wird. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie von *Roth et al.*, welche die Immunlandschaft von IPMN low- und high-grade im Vergleich zu PDAC mittels Immunhistochemie (IHC) untersuchten (166). Sie konnten feststellen, dass die immunologische Mikroumgebung in IPMN low-grade im Vergleich zu PDACs reich an CD8+ T-Lymphozyten ist. Auch *Bernard et al.* konnten in ihrer Studie ein pro-inflammatorisches Mikromilieu reich an CD8+ zytotoxischen T-Zellen in low grade IPMN feststellen, welches im Verlauf der Progression zum PDAC zunehmend verloren ging (167). Dies spricht dafür, dass es im Rahmen der Entstehung des invasiven Pankreaskarzinoms zu einer T-Zell-Erschöpfung mit konsekutiver Apoptose (68) kommen könnte. Ebenso sind weitere CTL-supprimierende Mechanismen, beispielsweise durch Expression von PD-L1 in

Tumorzellen, bekannt (168). *Yamamoto et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass MHC-I-Komplexe im PDAC durch Autophagozytose degradiert werden (40). Gleichzeitig bieten sich durch diese Erkenntnisse über das Verhalten der zytotoxischen T-Zellen während der Karzinogenese Ansätze für Therapieregime, die die antitumorale Immunität bereits in Vorstufen des PDACs stärken könnten.

Zur Rolle von zytotoxischen T-Zellen in PanIN finden sich derzeit insgesamt nur wenige Daten. Während wir insbesondere in high grade PanIN hohe CD8+ T-Zellzahlen nachweisen konnten, zeigte eine ältere Studie von *Clark et al.* an einem Mausmodell hierzu konträre Ergebnisse (154). Dies könnte allerdings dadurch zu erklären sein, dass *Clark et al.* in ihrer Studie – im Gegensatz zu dieser Promotionsarbeit – nicht genauer zwischen low und high-grade PanIN Läsionen unterscheiden.

Die CD4+ T-Zellen fanden sich in unseren Ergebnissen insbesondere im Mikromilieu von ADM, PanIN, gastralen IPMN und invasivem Karzinom signifikant gesteigert im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe. Dies weist darauf hin, dass es bereits ab Beginn der Entstehung von metaplastischen Läsionen zu einer veränderten Immunantwort kommt. Interessanterweise fand sich auch eine signifikante Steigerung der FoxP3+ Zellen in den o.g. Vorläuferläsionen und Tumorgewebe. Die Entwicklung eines immunsuppressiven Milieus in der Karzinogenese des PDAC scheint also bereits sehr früh, auf der Ebene metaplastischer Veränderungen, in Gang gesetzt zu werden. Sowohl für ADM, als auch PanIN und gastrale IPMN können wir im eigenen Patient:innenkollektiv allerdings auch eine gesteigerte antitumorale Immunantwort durch CD8+ Zellen feststellen, sodass die immunologische Reaktion während der Tumorgenese des PDAC nicht linear in eine Richtung zu verlaufen scheint. Konkordant mit unseren Ergebnissen gibt es bereits vielfache Evidenz dafür, dass die Immunantwort im PDAC stark durch FoxP3+CD4+ Tregs geprägt ist. Diese Daten zeigen auch, dass es im Verlauf der Karzinogenese zu einer Zunahme der Tregs von low-grade zu high-grade Läsionen in PanIN und IPMN kommt (154,166,169). Letzteres konnten wir am eigenen Kollektiv - bei genauerer Differenzierung des Dysplasiegrades - mit einer signifikanten Zunahme der FoxP3+ Zellen verglichen mit Normalgewebe für PanIN high-grade nachweisen, während die FoxP3+ Zellen in low-grade PanIN nur in Tendenzen zunahmen. Signifikante Unterschiede zwischen low und high grade PanIN selbst fanden sich in unseren Daten allerdings nicht.

Weiterhin konnten wir vermehrt PD-1+ Zellen in ADM, PanIN, gastralen IPMN und PDAC finden. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von *Winograd et al.* (70), welche eine erhöhte Expression von PD-1 und PDL-1 in murinen PDACs nachweisen konnten. Zur Rolle

von Immune-Checkpoints in Vorläuferläsionen des PDAC ist hingegen insgesamt wenig bekannt. Allerdings sei zu erwähnen, dass der Einsatz von Immune-Checkpoint-Inhibitoren im PDAC im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten bislang kaum erfolgreich ist (170).

4.5 Unterschiede zwischen low- und high grade PanIN und IPMN Läsionen

Im Vergleich der einzelnen Vorläuferläsionen konnten wir interessanterweise tendenziell einen Abfall der Immuninfiltration im Gewebe von low-grade gastralen IPMN zu high-grade gastralen IPMN feststellen. So war zwar die Anzahl an B-Zellen und zytotoxischen T-Zellen in low-grade gastralen IPMN signifikant zu Normalgewebe erhöht, nicht aber in gastralen IPMN mit hochgradiger Dysplasie. Dies könnte darin begründet sein, dass hochgradig dysplastische IPMN ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen, in ein invasives Karzinom überzugehen (100) und daher bereits auf Ebene der high-grade gastralen IPMN vermehrt immunsuppressive Signalkaskaden ausgelöst werden, welche potentiell die spezifische Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen und B-Zellen hemmen könnten. Bekräftigt wird diese Hypothese auch durch die Ergebnisse von *Bernard et al.* (167). Es sei allerdings auch erwähnt, dass die Anzahl an high-grade gastralen IPMN (n=7) in diesem Patientenkollektiv im Vergleich zu low-grade gastralen IPMN (n=28) deutlich geringer war. Im direkten Vergleich fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen low - und high-grade IPMN.

Im Gegensatz dazu wiesen in PanIN überwiegend die Läsionen mit hochgradiger Dysplasie eine signifikant erhöhte Immunzellinfiltration verglichen mit Normalgewebe auf. Dabei handelte es sich einerseits um CD8+ zytotoxische T-Zellen, andererseits um CD68+ Makrophagen und FoxP3+ Tregs. Auch hier ist ein direkter Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Größe der betrachteten Gruppen (n=25 in low grade PanIN vs. n=7 in high grade PanIN) nur eingeschränkt möglich. Das Immunzellinfiltrat aus Makrophagen und Tregs in high-grade PanIN entspricht allerdings eher dem des PDACs. Dies erscheint in Anbetracht der Tatsache, dass high-grade PanIN in den allermeisten Fällen bereits in Verbindung mit einem invasiven Karzinom auftreten (105,108), als nachvollziehbar. Signifikante Unterschiede zwischen low – und high-grade Läsionen ließen sich im eigenen Kollektiv auch in PanIN nicht feststellen.

4.6 Heterogenität der Immunantwort in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms

Während in den vorherigen Abschnitten überwiegend die eher aktive Immunantwort in ADM, PanIN und gastralen IPMN diskutiert wurde, stellt sich die Frage nach dem immunologischen Verhalten zweier weiterer wichtiger Gruppen von Vorläuferläsionen des PDACs, den intestinalen IPMN und MCN. Hierbei konnten wir feststellen, dass diese beiden Neoplasien durch eine weniger ausgeprägte Immunantwort gekennzeichnet sind. Insgesamt gibt es kaum wissenschaftliche Daten zum immunologischen Mikromilieu von intestinalen IPMN und MCN.

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche immunologische Verhalten von gastralen und intestinalen IPMN liefert die Studie von *Liffers et al* (171). Sie konnten in ihrer Publikation anschaulich darstellen, dass diese beiden IPMN-Subtypen sich in vielerlei Hinsicht unterscheiden. So weisen gastrale und intestinale IPMN sehr heterogene molekulare Eigenschaften auf. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Notch-Signalweg zwar in der Entstehung von gastralen, nicht aber von intestinalen Vorläuferläsionen eine Rolle spielt. Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass (neben den bekannten molekulargenetischen Ereignissen) auch exogene Faktoren wie Gallereflux und ein verändertes Mikrobiom einen intestinalen Phänotyp begünstigen könnten, während gastrale IPMN primär durch endogene Einflüsse, wie Mutationen, entstehen. Dies lässt die Behauptung nachvollziehbar erscheinen, dass den unterschiedlichen Entstehungswegen der Vorläuferläsionen auch unterschiedliche Mikromilieus zugrunde liegen.

Das eher immun-inaktive Mikromilieu von MCN könnte ebenso in der Entstehungsweise dieser Vorläuferläsion begründet sein. Seit langem existiert die Theorie, dass MCN ursprünglich aus Keimstrang-Gewebe hervorgehen und durch hormonelle Dysbalancen aktiviert werden können (144,172–174). Diese hormonabhängige Entwicklung hat im Gegensatz zu den Entstehungsursachen anderer Vorläuferläsionen womöglich einen geringen Einfluss auf die Mobilisierung von Immunzellen.

4.7 Anwendbarkeit im klinischen Alltag

Das vorwiegende Therapieregime im PDAC besteht in fortgeschrittenen Stadien derzeit primär aus der Applikation von Chemotherapeutika oder - in spezifischen Fällen - einer kombinierten Radiochemotherapie, welche allerdings zumeist nur wenige Monate an Lebensverlängerung für die Patient:innen bieten (175–178). Obwohl die genetischen

Veränderungen im PDAC inzwischen gut charakterisiert werden konnten und multiple Ansätze zur molekularen Subtypisierung existieren (179–181), gibt es (abgesehen von dem Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitor Olaparib bei Keimbahn-BRCA-Mutationen im metastasierten PDAC (182) sowie Inhibitoren der im Pankreaskarzinom sehr seltenen *KRAS*-G12C-Mutation (183)) bislang keine zugelassenen Therapeutika, die erfolgreich gegen Pankreaskarzinom-typische Mutationen, wie beispielsweise in den Genen *KRAS*, *SMAD4*, *CDKN2A* und *TP53*, eingesetzt werden können (184–187). Dadurch sind in den letzten Jahren zunehmend auch Therapieansätze in den Fokus gerückt, welche auf das Tumormikromilieu des PDACs Einfluss nehmen. So gibt es beispielsweise Versuche, das Stroma, bzw. die ausgeprägte desmoplastische Reaktion als eines der großen Schlüsselereignisse in der Karzinogenese des PDAC, zum medikamentösen Angriffspunkt zu machen (149). Es wurden unter anderem MMP-Inhibitoren als potentielle Therapeutika getestet, welche allerdings in klinischen Studien keinen wesentlichen Überlebensvorteil für Patient:innen erbrachten (188–190). Auch spezifischere Ansätze, wie die Nutzung von rekombinanter Hyaluronidase zum Abbau von Hyaluronan als wichtigem Bestandteil der EZM, zeigte klinisch keine klaren Erfolge (191). Aufgrund des generell immunsuppressiven Milieus von Pankreaskarzinomen zeigen auch Therapien mit den mittlerweile in vielen anderen soliden Malignomen erfolgreich eingesetzten Immuncheckpoint-Inhibitoren in den meisten Pankreaskarzinomen keine überzeugende Wirkung (192).

Darüber hinaus werden auch zunehmend verschiedene Strategien verfolgt, die direkt die immunsuppressiven Zellen des TMEs in den Fokus nehmen (149). Unter anderem konnte festgestellt werden, dass Cyclophosphamid ein geeignetes Mittel darstellt, um Tregs zu unterdrücken (193). Versuche zur Eliminierung immunsuppressiver Zellen existieren auch zu TAMs. Dies funktioniert beispielsweise über den *Colony-stimulating factor 1 receptor* (CSF-1R), ein Rezeptorprotein, das von TAMs exprimiert wird und in diversen Tumorentitäten bei Vorhandensein CSF-1R+ Makrophagen mit einem schlechten Patient:innenüberleben assoziiert ist (194–196). In PDAC-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von CSF-1R die Effizienz von *Immune Checkpoint*-Inhibitoren verbessert (197).

Um die Effektivität solcher zielgerichteter Immuntherapeutika zu steigern, könnte es in Anbetracht des derzeit schlechten klinischen Outcomes des PDACs durchaus sinnvoll sein, bei Hochrisikokonstellationen bereits bei der Entstehung von Vorläuferläsionen zu agieren und das zunehmend immunsuppressive Mikromilieu früher zu modulieren. Ein Problem stellt hierbei allerdings immer noch die fehlende Möglichkeit rechtzeitiger diagnostischer

Verfahren zur Erkennung von Vorläuferläsionen dar. IPMN können zwar mittels Schnittbildgebung diagnostiziert werden (106) und endoskopische Ansätze zur Früherkennung auch von PanIN haben sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt, sind aber noch lange nicht ausgereift (198). Die primäre Schwierigkeit ergibt sich allerdings dadurch, dass die Entstehung von PanIN - und häufig auch IPMN - klinisch inapparent verläuft (106), sodass zystische Pankreasläsionen wie IPMN in der Schnittbildgebung oft lediglich Zufallsbefunde darstellen. Nichtsdestotrotz lassen *radiomics* – und *liquid biopsy* basierte Ansätze die Hoffnung zu, dass eine Früherkennung in Zukunft möglich sein könnte (199–202).

4.8 Technische Herausforderungen und Limitationen der Arbeit

Die für diese Promotionsarbeit gewählte Methode zur Analyse des Immunmikromilieus ist die TSA-basierte Multiplex-Immunhistochemie. Im Vergleich zur konventionellen IHC bietet die mIHC einige Vorteile. So kann durch die parallele Färbung mehrerer Marker an einem Objektträger Gewebe eingespart werden. Dies kann bei selten vorkommenden Läsionen, an welchen ggf. verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden sollen (wie z.B. in unserem Fall pankreatobiliäre IPMN oder IOPN), essenziell sein. Auch bietet die mIHC die Möglichkeit für Co-Lokalisationsanalysen, um Zelltypen genauer charakterisieren zu können. Andererseits existieren bei der mIHC auch einige technische Herausforderungen gegenüber der klassischen IHC. So kommt es durch längere Bestrahlung eines Fluorophors mit dem Anregungslicht zu einem Verlust der Fluoreszenz (sog. *Photobleaching*) (203). Fluoreszenzgefärbte Präparate verlieren somit über die Zeit an Qualität und eignen sich in der Regel nicht für Langzeitlagerungen. Auch eine Autofluoreszenz von Gewebe kann die genaue Analyse und Auswertung behindern. Weiterhin können *bleedthrough* - bzw. *crossstalk*-Phänomene in der mIHC auftreten. Dabei werden Signale in benachbarten Farbkanälen sichtbar, wenn die verwendeten Fluorophore sich in ihrer Anregungs- oder Emissionswellenlänge ähneln (204). Außerdem sind zur Visualisierung und Detektion mehrerer Fluorophore spezialisierte Fluoreszenzmikroskope notwendig, die die genaue Anpassung von Filtersets auf die jeweiligen Fluorophore zulassen. Wie auch *Gorris et al.* in ihrer Studie beschreiben, ist ein weiterer potentiell limitierender Faktor für die Validität von Multiplex-Färbungen die Reihenfolge der Primär-Antikörper, da diese Einfluss auf die Signalintensität der einzelnen Marker nehmen kann (205).

Eine Limitation der Arbeit stellt die statische Analyse dar, da die Gewebeproben alle an einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurden. Andererseits lässt die Untersuchung von

low- und high-grade Vorläuferläsionen durchaus eine dynamische Beurteilung der Karzinogenese zu.

Eine weitere methodische Schwierigkeit bestand in dieser Promotionsarbeit in der komplexen Auswertung der Datensätze. Dies erfolgte mit automatisierten Makros, welche individuell für jeden Marker codiert wurden. Die Notwendigkeit der Individualisierung ergibt sich dadurch, dass die Intensität der Färbungen sowie die Größe und Morphologie der jeweils angefärbten Zellen unterschiedlich ist. Diese Automatisierung bietet zwar einerseits eine Objektivierbarkeit und Zeitersparnis in der Auswertung, andererseits ist ein gewisser Verlust der Genauigkeit nicht zu vermeiden.

Statt ganzen Gewebeschnitten wurden in dieser Arbeit TMAs verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass zeit – und kosteneffektive Analysen unter gleichen Färbebedingungen möglich sind, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verbessert. Die Größe der Stanzten wurde dabei so gewählt, dass ein möglichst repräsentativer Bereich der untersuchten Läsion und deren Mikroumgebung zur Verfügung steht. Nichtsdestotrotz entsteht dadurch das Risiko, dass Informationen über das TME durch die bloße Betrachtung eines kleinen Ausschnitts aufgrund der räumlichen Heterogenität des Immunzellverhaltens verloren gehen (206).

Einschränkungen ergeben sich auch durch die Kollektivgröße. Seltener Läsionen, wie pankreatobiliäre IPMN und IOPN, waren im Kollektiv nur einmal vorhanden und wurden trotz begrenzter Aussagefähigkeit der Vollständigkeit halber aufgeführt. Gleichzeitig sind sie klinisch aber aufgrund ihrer Seltenheit auch von geringerer Relevanz. Die größten Gruppen des Kollektivs stellten in dieser Arbeit PanIN und gastrale IPMN dar, welche auch zu den häufigsten intraduktalen Pankreasneoplasien zählen (106). Dennoch wäre in Zukunft die Untersuchung größerer Kollektive und auch insbesondere größerer Zahlen anderer IPMN-Subgruppen und MCN wünschenswert.

Der Fokus wurde in dieser Promotionsarbeit auf die größten und wichtigsten Gruppen der Immunzellen gesetzt. So wurden unter anderen M2-Makrophagen, B-Lymphozyten, Zytotoxische T-Zellen und TH-Zellen untersucht. Wie in den Abschnitten 4.1 bis 4.6 deutlich wurde, ist die Immunlandschaft im TME des PDAC aber deutlich komplexer. Die einzelnen Zellen können in Abhängigkeit der ausgelösten Signalkaskaden unterschiedliche pro– als auch antitumorigene Eigenschaften aufweisen (71,207,208), so dass eine detaillierte Subcharakterisierung der Zelltypen zur genaueren Klassifizierung zukünftig sinnvoll wäre.

4.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Teile des Immunmikromilieus verschiedener Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms untersucht und mit Normalgewebe und PDAC verglichen. Zusammenfassend konnten wir folgende Feststellungen machen:

1. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort ist in allen untersuchten Läsionen prädominant.
2. Das PDAC ist durch ein immunsuppressives Mikromilieu, geprägt durch CD4+/FoxP3+ T-Zellen und CD163+/CD68+ Makrophagen, gekennzeichnet.
3. Bereits zum Zeitpunkt des Auftretens von Metaplasien ist eine große Dynamik in der Immunzelllandschaft erkennbar.
4. Gastrale IPMN, ADM und PanIN sind reich an CD3+/CD8+ Zellen.
5. MCN und intestinale IPMN gehören zu den weniger immunaktiven Läsionen.
6. Das sowohl zeitlich als auch räumlich heterogene Immuninfiltrat in PDAC-Vorläuferläsionen und dem PDAC gibt Hinweise auf eine dynamische Beziehung zwischen dem Immunmikromilieu und epithelialen Zellen während der Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms.

In Zukunft wären Untersuchungen zu weiteren Immunzellen, wie beispielsweise den neutrophilen Granulozyten und myeloiden Suppressorzellen, von Relevanz. Auch eine detailliertere Kenntnis über Immun-Checkpoints in Vorläuferläsionen des PDAC wäre wünschenswert. Darüber hinaus ist für ein tiefergehendes Verständnis der durch diese Arbeit erlangten Ergebnisse eine weitere Subtypisierung der B-Zellen und CD4+/CD8+ T-Lymphozyten notwendig, um die jeweilige Rolle der einzelnen Zellpopulationen genauer differenzieren zu können.

Um auch die Interaktionen zwischen den Immunzellen und den Stromazellen in den Vorläuferläsionen des PDACs besser zu verstehen, sollten die bisherigen Ergebnisse zukünftig auch um Marker für Krebs-assoziierte Fibroblasten und pankreatische Stellatumzellen ergänzt werden.

Ein weiterer Aspekt wäre, neben der quantitativen Analyse auch qualitative Analysen zur Interaktion, Distribution und Funktionalität der Zellen des Mikromilieus durchzuführen, um die genauen Mechanismen hinter der Dynamik des Immunzellverhaltens besser begreifen zu können.

Ein potentieller Ansatzpunkt wäre außerdem, an größeren Kohorten das Vorhandensein von Subtypen innerhalb der Vorläuferläsionen zu evaluieren, wie sie unter anderem *Bailey*

et al. (180) und *Collisson et al.* (181) auch für das PDAC identifizieren konnten. Ebenso sinnvoll wäre eine Korrelation der Ergebnisse mit molekularen Erkenntnissen zu den Vorläuferläsionen des PDACs.

Zukünftig ist auch ein Vergleich mit internen Daten zu murinen Vorläuferläsionen vorgesehen, um die eigenen Ergebnisse zu bestätigen und auf die bisherigen Erkenntnisse aufzubauen.

5 Literatur – und Quellenverzeichnis

1. Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor Microenvironment and Progression. *J Surg Oncol*. 1. Mai 2011;103(6):468–74.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4. März 2011;144(5):646–74.
3. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res*. 15. September 2019;79(18):4557–66.
4. Walker C, Mojares E, del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 4. Oktober 2018;19(10):3028.
5. Chen Y, McAndrews KM, Kalluri R. Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol*. Dezember 2021;18(12):792–804.
6. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):329–60.
7. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 1. Mai 2007;117(5):1175–83.
8. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 19. März 2010;140(6):883–99.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, u. a. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
10. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7–33.
11. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res*. 29. Mai 2014;74(11):2913–21.
12. Wang YT, Gou YW, Jin WW, Xiao M, Fang HY. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose–response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*. 12. März 2016;16:212.
13. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, u. a. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control

Consortium (Panc4). *Ann Oncol*. Juli 2012;23(7):1880–8.

14. de Gonzalez AB, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 4. August 2003;89(3):519–23.

15. Stolzenberg-Solomon RZ, Cross AJ, Silverman DT, Schairer C, Thompson FE, Kipnis V, u. a. Meat and Meat-Mutagen Intake and Pancreatic Cancer Risk in the NIH-AARP Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17. Dezember 2007;16(12):2664–75.

16. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol*. Februar 2019;10(1):10–27.

17. Noone AM, Howlander N, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/. [zitiert 28. März 2022]. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Verfügbar unter: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/index.html

18. Batabyal P, Vander Hoorn S, Christophi C, Nikfarjam M. Association of Diabetes Mellitus and Pancreatic Adenocarcinoma: A Meta-Analysis of 88 Studies. *Ann Surg Oncol*. 1. Juli 2014;21(7):2453–62.

19. Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJA, u. a. Prospective Risk of Pancreatic Cancer in Familial Pancreatic Cancer Kindreds. *Cancer Res*. 1. April 2004;64(7):2634–8.

20. Bartsch DK, Gress TM, Langer P. Familial pancreatic cancer—current knowledge. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. August 2012;9(8):445–53.

21. Ghiorzo P. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World J Gastroenterol WJG*. 21. August 2014;20(31):10778–89.

22. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 1. Juni 2010;24(3):349–58.

23. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet Lond Engl*. 13. August 2011;378(9791):607–20.

24. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*. 21. November 2018;24(43):4846–61.

25. Hidalgo M. Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 29. April 2010;362(17):1605–17.

26. Unger K, Mehta KY, Kaur P, Wang Y, Menon SS, Jain SK, u. a. Metabolomics based predictive classifier for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 1. Mai 2018;9(33):23078–90.
27. Shin EJ, Canto MI. Pancreatic Cancer Screening. *Gastroenterol Clin North Am*. März 2012;41(1):143–57.
28. Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K, u. a. Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: Final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today*. 1. November 2008;38(11):1021–8.
29. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, u. a. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 20. Dezember 2018;379(25):2395–406.
30. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, u. a. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 11. März 2017;389(10073):1011–24.
31. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, u. a. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 8. September 2010;304(10):1073–81.
32. Ren B, Cui M, Yang G, Wang H, Feng M, You L, u. a. Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 30. Juli 2018;17:108.
33. Cortesi M, Zanoni M, Pirini F, Tumedei MM, Ravaioli S, Rapposelli IG, u. a. Pancreatic Cancer and Cellular Senescence: Tumor Microenvironment under the Spotlight. *Int J Mol Sci*. 27. Dezember 2021;23(1):254.
34. Opitz FV, Haeberle L, Daum A, Esposito I. Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancers*. 8. Dezember 2021;13(24):6188.
35. Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, u. a. Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 2. August 2015;21(15):3561–8.
36. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol*. 28. August 2012;3:344.
37. Incio J, Liu H, Suboj P, Chin SM, Chen IX, Pinter M, u. a. Obesity-induced inflammation and desmoplasia promote pancreatic cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Discov*. August 2016;6(8):852–69.

38. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, u. a. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 16. Juni 2014;25(6):735–47.
39. Ryschich E, Nötzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I, u. a. Control of T-Cell–Mediated Immune Response by HLA Class I in Human Pancreatic Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 8. Februar 2005;11(2):498–504.
40. Yamamoto K, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, u. a. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*. Mai 2020;581(7806):100–5.
41. Carstens JL, Correa de Sampaio P, Yang D, Barua S, Wang H, Rao A, u. a. Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat Commun*. 27. April 2017;8:15095.
42. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Mol Cancer Res MCR*. November 2012;10(11):1403–18.
43. Miyai Y, Esaki N, Takahashi M, Enomoto A. Cancer-associated fibroblasts that restrain cancer progression: Hypotheses and perspectives. *Cancer Sci*. April 2020;111(4):1047–57.
44. Togo S, Polanska UM, Horimoto Y, Orimo A. Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Promising Therapeutic Target. *Cancers*. 31. Januar 2013;5(1):149–69.
45. De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, u. a. Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol*. September 2008;130(3):481–94.
46. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2. Januar 2007;117(1):50–9.
47. Ferdek PE, Jakubowska MA. Biology of pancreatic stellate cells—more than just pancreatic cancer. *Pflugers Arch*. 2017;469(9):1039–50.
48. Fu Y, Liu S, Zeng S, Shen H. The critical roles of activated stellate cells-mediated paracrine signaling, metabolism and onco-immunology in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 19. Februar 2018;17:62.
49. Ene-Obong A, Clear AJ, Watt J, Wang J, Fatah R, Riches JC, u. a. Activated Pancreatic Stellate Cells Sequester CD8+ T-Cells to Reduce Their Infiltration of the Juxtatumoral Compartment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. November 2013;145(5):1121–32.
50. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*. Januar 2017;5(1):3–

8.

51. Markowitz J, Brooks TR, Duggan MC, Paul BK, Pan X, Wei L, u. a. Patients with pancreatic adenocarcinoma exhibit elevated levels of myeloid-derived suppressor cells upon progression of disease. *Cancer Immunol Immunother* CII. Februar 2015;64(2):149–59.
52. Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression. *Front Immunol*. 30. Oktober 2018;9:2499.
53. Pinton L, Solito S, Damuzzo V, Francescato S, Pozzuoli A, Berizzi A, u. a. Activated T cells sustain myeloid-derived suppressor cell-mediated immune suppression. *Oncotarget*. 18. Dezember 2015;7(2):1168–84.
54. Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*. November 2014;262(1):36–55.
55. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. Dezember 2005;5(12):953–64.
56. Santoni M, Bracarda S, Nabissi M, Massari F, Conti A, Bria E, u. a. CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors. *BioMed Res Int*. 2014;2014:768758.
57. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim KW, Knolhoff BL, Zuo C, u. a. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*. 15. August 2017;47(2):323–338.e6.
58. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, u. a. Arginase I Production in the Tumor Microenvironment by Mature Myeloid Cells Inhibits T-Cell Receptor Expression and Antigen-Specific T-Cell Responses. *Cancer Res*. 16. August 2004;64(16):5839–49.
59. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol*. 1. April 2015;36(4):229–39.
60. Hu H, Hang JJ, Han T, Zhuo M, Jiao F, Wang LW. The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumor Biol*. 1. Juli 2016;37(7):8657–64.
61. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. B Cells and Antibodies. *Mol Biol Cell* 4th Ed [Internet]. 2002 [zitiert 3. Mai 2022]; Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26884/>
62. Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil AM. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol*. Juli 2013;13(7):475–86.

63. Michaud D, Steward CR, Mirlekar B, Pylayeva-Gupta Y. Regulatory B cells in cancer. *Immunol Rev.* Januar 2021;299(1):74–92.
64. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221–41.
65. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, u. a. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 20. März 2014;507(7492):366–70.
66. Wang RX, Yu CR, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska M, Sergeev YV, u. a. Interleukin-35 Induces Regulatory B Cells that Suppress CNS Autoimmune Disease. *Nat Med.* Juni 2014;20(6):633–41.
67. Pylayeva-Gupta Y, Das S, Handler JS, Hajdu CH, Coffre M, Koralov SB, u. a. IL-35 producing B cells promote the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Discov.* März 2016;6(3):247–55.
68. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 19. Januar 2021;124(2):359–67.
69. Kallies A, Zehn D, Utzschneider DT. Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nat Rev Immunol.* Februar 2020;20(2):128–36.
70. Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer ARL, Bajor DL, u. a. Induction of T-cell immunity overcomes complete resistance to PD-1 and CTLA-4 blockade and improves survival in pancreatic carcinoma. *Cancer Immunol Res.* April 2015;3(4):399–411.
71. Zhu J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Oktober 2018;10(10):a030338.
72. Huber M, Brehm CU, Gress TM, Buchholz M, Alashkar Alhamwe B, Pogge von Strandmann E, u. a. The Immune Microenvironment in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 3. Oktober 2020;21(19):7307.
73. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, u. a. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 21. Februar 2011;208(3):469–78.
74. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, u. a. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* November 2005;6(11):1133–41.
75. He S, Fei M, Wu Y, Zheng D, Wan D, Wang L, u. a. Distribution and Clinical Significance of

Th17 Cells in the Tumor Microenvironment and Peripheral Blood of Pancreatic Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. November 2011;12(11):7424–37.

76. Sakaguchi S. Naturally Arising CD4⁺ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):531–62.

77. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531–64.

78. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A Unique Subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*. 1. August 2007;13(15):4345–54.

79. Tang Y, Xu X, Guo S, Zhang C, Tang Y, Tian Y, u. a. An Increased Abundance of Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells Is Correlated with the Progression and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS ONE*. 17. März 2014;9(3):e91551.

80. Bradding. Allergen immunotherapy and mast cells. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(11):1445–8.

81. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [zitiert 3. Januar 2023];6. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00620>

82. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. Oktober 2004;4(10):787–99.

83. Hempel HA, Cuka NS, Kulac I, Barber JR, Cornish TC, Platz EA, u. a. Low Intratumoral Mast Cells Are Associated With a Higher Risk of Prostate Cancer Recurrence. *The Prostate*. 2017;77(4):412–24.

84. Komi DEA, Redegeld FA. Role of Mast Cells in Shaping the Tumor Microenvironment. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(3):313–25.

85. Chang DZ. Mast cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 1. August 2012;1(5):754–5.

86. Ma Y, Hwang RF, Logsdon CD, Ullrich SE. Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1. Juli 2013;73(13):3927–37.

87. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 15. Dezember 2010;123(24):4195–200.

88. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv*

Drug Deliv Rev. 1. Februar 2016;97:4–27.

89. Linder S, Castaños-Velez E, von Rosen A, Biberfeld P. Immunohistochemical expression of extracellular matrix proteins and adhesion molecules in pancreatic carcinoma. *Hepatogastroenterology*. Oktober 2001;48(41):1321–7.
90. Olivares O, Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, u. a. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat Commun*. 7. Juli 2017;8:16031.
91. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol*. August 2008;18(4):288–95.
92. Kultti A, Zhao C, Singha NC, Zimmerman S, Osgood RJ, Symons R, u. a. Accumulation of Extracellular Hyaluronan by Hyaluronan Synthase 3 Promotes Tumor Growth and Modulates the Pancreatic Cancer Microenvironment. *BioMed Res Int*. 2014;2014:817613.
93. Hessmann E, Buchholz SM, Demir IE, Singh SK, Gress TM, Ellenrieder V, u. a. Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol Rev*. Oktober 2020;100(4):1707–51.
94. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*. 18. November 1971;285(21):1182–6.
95. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(9):1745–70.
96. Wei D, Le X, Zheng L, Wang L, Frey JA, Gao AC, u. a. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*. Januar 2003;22(3):319–29.
97. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Takao S, Yonezawa S. MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene*. September 2013;32(39):4614–21.
98. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, u. a. Gemcitabine Plus Bevacizumab Compared With Gemcitabine Plus Placebo in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: Phase III Trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol*. August 2010;28(22):3617–22.
99. Kindler HL, Ioka T, Richel DJ, Bennouna J, Létourneau R, Okusaka T, u. a. Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study. *Lancet Oncol*. 1. März 2011;12(3):256–62.

100. Basturk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, u. a. A REVISED CLASSIFICATION SYSTEM AND RECOMMENDATIONS FROM THE BALTIMORE CONSENSUS MEETING FOR NEOPLASTIC PRECURSOR LESIONS IN THE PANCREAS. *Am J Surg Pathol*. Dezember 2015;39(12):1730–41.
101. Liou GY, Döppler H, Braun UB, Panayiotou R, Buzhardt MS, Radisky DC, u. a. Protein kinase D1 drives pancreatic acinar cell reprogramming and progression to intraepithelial neoplasia. *Nat Commun*. 20. Februar 2015;6:6200.
102. Esposito I, Haeberle L. Acinar: Ductal Metaplasia. In: van Krieken JHJM, Herausgeber. *Encyclopedia of Pathology* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2020 [zitiert 10. Juli 2022]. S. 1–4. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-319-28845-1_5522-1
103. Aichler M, Seiler C, Tost M, Siveke J, Mazur PK, Da Silva-Buttkus P, u. a. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*. 2012;226(5):723–34.
104. Shi G, DiRenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF. Maintenance of Acinar Cell Organization is Critical to Preventing Kras-Induced Acinar-Ductal Metaplasia. *Oncogene*. 11. April 2013;32(15):1950–8.
105. Esposito I, Seiler C, Bergmann F, Kleeff J, Friess H, Schirmacher P. Hypothetical Progression Model of Pancreatic Cancer With Origin in the Centroacinar-Acinar Compartment. *Pancreas*. Oktober 2007;35(3):212–7.
106. Esposito I, Häberle L, Yavas A, Kraft A, Gaida MM. Intraduktale Pankreasneoplasien. *Pathol*. 1. September 2021;42(5):472–83.
107. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, u. a. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. Mai 2001;25(5):579–86.
108. Andea A, Sarkar F, Adsay VN. Clinicopathological Correlates of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: A Comparative Analysis of 82 Cases With and 152 Cases Without Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Mod Pathol*. Oktober 2003;16(10):996–1006.
109. Lüttges J, Reinecke-Lüthge A, Möllmann B, Menke MAOH, Clemens A, Klimpfinger M, u. a. Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch*. 1. November 1999;435(5):461–8.
110. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, u. a. An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Am J Surg Pathol*. August 2004;28(8):977–87.

111. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, u. a. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science*. 26. September 2008;321(5897):1801–6.
112. Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, u. a. Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology*. April 2012;142(4):730-733.e9.
113. Hosoda W, Chianchiano P, Griffin JF, Pittman ME, Brosens LA, Noë M, u. a. Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J Pathol*. Mai 2017;242(1):16–23.
114. Matthaei H, Hong SM, Mayo SC, Molin M dal, Olino K, Venkat R, u. a. Presence of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia in the Pancreatic Transection Margin does not Influence Outcome in Patients with R0 Resected Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol*. November 2011;18(12):3493–9.
115. Konstantinidis IT, Vinuela EF, Tang LH, Klimstra DS, D'Angelica MI, DeMatteo RP, u. a. Incidentally Discovered Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: What Is Its Clinical Significance? *Ann Surg Oncol*. 1. Oktober 2013;20(11):3643–7.
116. Gaujoux S, Brennan MF, Gonen M, D'Angelica MI, DeMatteo R, Fong Y, u. a. Cystic Lesions of the Pancreas: Changes in the Presentation and Management of 1,424 Patients at a Single Institution over a 15-year Time Period. *J Am Coll Surg*. April 2011;212(4):10.1016/j.jamcollsurg.2011.01.016.
117. Kleeff J, Michalski C, Kong B, Erkan M, Roth S, Siveke J, u. a. Surgery for Cystic Pancreatic Lesions in the Post-Sendai Era: A Single Institution Experience. *HPB Surg*. 2015;2015:847837.
118. Valsangkar NP, Morales-Oyarvide V, Thayer SP, Ferrone CR, Wargo JA, Warshaw AL, u. a. 851 resected cystic tumors of the pancreas: A 33-year experience at the Massachusetts General Hospital. *Surgery*. September 2012;152(3 0 1):S4-12.
119. Klöppel G, Basturk O, Schlitter AM, Konukiewicz B, Esposito I. Intraductal neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol*. November 2014;31(6):452–66.
120. Esposito I, Schlitter AM, Sipos B, Klöppel G. Klassifikation und malignes Potenzial der zystischen Pankreastumoren. *Pathol*. 1. Februar 2015;36(1):99–114.
121. Basturk O, Coban I, Adsay NV. Pancreatic Cysts: Pathologic Classification, Differential Diagnosis, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*. 1. März 2009;133(3):423–38.
122. Marchegiani G, Mino-Kenudson M, Ferrone CR, Morales-Oyarvide V, Warshaw AL, Lillemoe KD, u. a. Patterns of Recurrence After Resection of IPMN: Who, When, and How? *Ann Surg*.

Dezember 2015;262(6):1108–14.

123. Marchegiani G, Mino-Kenudson M, Sahara K, Morales-Oyarvide V, Thayer S, Ferrone C, u. a. IPMN Involving the Main Pancreatic Duct. *Ann Surg*. Mai 2015;261(5):976–83.

124. Oyama H, Tada M, Takagi K, Tateishi K, Hamada T, Nakai Y, u. a. Long-term Risk of Malignancy in Branch-Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Gastroenterology*. 1. Januar 2020;158(1):226-237.e5.

125. Lim J, Allen PJ. The diagnosis and management of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: has progress been made? *Updat Surg*. 1. Juni 2019;71(2):209–16.

126. Board WC of TE. Digestive System Tumours [Internet]. [zitiert 16. Juni 2022]. Verfügbar unter: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Digestive-System-Tumours-2019>

127. Tan MC, Basturk O, Brannon AR, Bhanot U, Scott SN, Bouvier N, u. a. GNAS and KRAS Mutations Define Separate Progression Pathways in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm-Associated Carcinoma. *J Am Coll Surg*. Mai 2015;220(5):845-854.e1.

128. Ideno N, Ohtsuka T, Kono H, Fujiwara K, Oda Y, Aishima S, u. a. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas with distinct pancreatic ductal adenocarcinomas are frequently of gastric subtype. *Ann Surg*. Juli 2013;258(1):141–51.

129. Yamaguchi K, Kanemitsu S, Hatori T, Maguchi H, Shimizu Y, Tada M, u. a. Pancreatic ductal adenocarcinoma derived from IPMN and pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with IPMN. *Pancreas*. Mai 2011;40(4):571–80.

130. Furukawa T, Klöppel G, Volkan Adsay N, Albores-Saavedra J, Fukushima N, Horii A, u. a. Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Arch*. 1. November 2005;447(5):794–9.

131. Dal Molin M, Matthaei H, Wu J, Blackford A, Debeljak M, Rezaee N, u. a. Clinicopathological Correlates of Activating GNAS Mutations in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) of the Pancreas. *Ann Surg Oncol*. 1. November 2013;20(12):3802–8.

132. Esposito I, Segler A, Steiger K, Klöppel G. Pathology, genetics and precursors of human and experimental pancreatic neoplasms: An update. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol IAP AI*. Dezember 2015;15(6):598–610.

133. Wood LD, Hruban RH. Pathology and Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms. *Cancer J Sudbury Mass*. 2012;18(6):492–501.

134. Shimizu T, Akita M, Sofue K, Toyama H, Itoh T, Fukumoto T, u. a. Pancreatobiliary-type

intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas may have 2 subtypes with distinct clinicopathologic and genetic features. *Hum Pathol.* 1. September 2019;91:26–35.

135. Adsay NV, Merati K, Basturk O, Iacobuzio-Donahue C, Levi E, Cheng JD, u. a. Pathologically and biologically distinct types of epithelium in intraductal papillary mucinous neoplasms: delineation of an „intestinal“ pathway of carcinogenesis in the pancreas. *Am J Surg Pathol.* Juli 2004;28(7):839–48.

136. Amato E, Molin M dal, Mafficini A, Yu J, Malleo G, Rusev B, u. a. Targeted next-generation sequencing of cancer genes dissects the molecular profiles of intraductal papillary neoplasms of the pancreas. *J Pathol.* Juli 2014;233(3):217–27.

137. Mino-Kenudson M, Castillo CF del, Baba Y, Valsangkar NP, Liss AS, Hsu M, u. a. Prognosis of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm depends on histological and precursor epithelial subtypes. *Gut.* Dezember 2011;60(12):1712–20.

138. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, u. a. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology.* 2020;76(2):182–8.

139. Wang YZ, Lu J, Jiang BL, Guo JC. Intraductal oncocytic papillary neoplasm of the pancreas: A systematic review. *Pancreatology.* 1. September 2019;19(6):858–65.

140. Wang T, Askan G, Adsay V, Allen P, Jarnagin WR, Memis B, u. a. INTRADUCTAL ONCOCYTIC PAPILLARY NEOPLASMS: CLINICAL-PATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF 24 CASES, WITH AN EMPHASIS ON ASSOCIATED INVASIVE CARCINOMAS. *Am J Surg Pathol.* Mai 2019;43(5):656–61.

141. Adsay NV, Adair CF, Heffess CS, Klimstra DS. Intraductal oncocytic papillary neoplasms of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* August 1996;20(8):980–94.

142. Crippa S, Salvia R, Warshaw AL, Domínguez I, Bassi C, Falconi M, u. a. Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas is Not an Aggressive Entity. *Ann Surg.* April 2008;247(4):571–9.

143. Basturk O, Chung SM, Hruban RH, Adsay NV, Askan G, Iacobuzio-Donahue C, u. a. Distinct Pathways of Pathogenesis of Intraductal Oncocytic Papillary Neoplasms and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Virchows Arch Int J Pathol.* November 2016;469(5):523–32.

144. Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, Iacono C, Bassi C, Talamini G, u. a. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol.* April 1999;23(4):410–22.

145. Kosmahl M, Pauser U, Peters K, Sipos B, Lüttges J, Kremer B, u. a. Cystic neoplasms of the pancreas and tumor-like lesions with cystic features: a review of 418 cases and a classification proposal. *Virchows Arch.* 1. August 2004;445(2):168–78.

146. Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. März 2011;8(3):141–50.
147. Reid MD, Saka B, Balci S, Goldblum AS, Adsay NV. Molecular genetics of pancreatic neoplasms and their morphologic correlates: an update on recent advances and potential diagnostic applications. *Am J Clin Pathol*. Februar 2014;141(2):168–80.
148. Tanaka M, Fernández-del Castillo C, Adsay V, Chari S, Falconi M, Jang JY, u. a. International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas. *Pancreatology*. 1. Mai 2012;12(3):183–97.
149. Ho WJ, Jaffee EM, Zheng L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. September 2020;17(9):527–40.
150. Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman RM, Endo I. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Ann Gastroenterol Surg*. 4. Januar 2019;3(2):130–7.
151. Liou GY, Döppler H, Necela B, Krishna M, Crawford HC, Raimondo M, u. a. Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- κ B and MMPs. *J Cell Biol*. 5. August 2013;202(3):563–77.
152. Liou GY, Döppler H, Necela B, Edenfield B, Zhang L, Dawson DW, u. a. Mutant Kras-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions. *Cancer Discov*. Januar 2015;5(1):52–63.
153. Liou GY, Bastea L, Fleming A, Döppler H, Edenfield BH, Dawson DW, u. a. Presence of Interleukin-13 at pancreatic ADM/PanIN lesions alters macrophage populations and mediates pancreatic tumorigenesis. *Cell Rep*. 16. Mai 2017;19(7):1322–33.
154. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer Res*. 1. Oktober 2007;67(19):9518–27.
155. Bastea LI, Liou GY, Pandey V, Fleming AK, von Roemeling CA, Doeppler H, u. a. Pomalidomide Alters Pancreatic Macrophage Populations to Generate an Immune-Responsive Environment at Precancerous and Cancerous Lesions. *Cancer Res*. 1. April 2019;79(7):1535–48.
156. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, u. a. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 5. März 2013;108(4):914–23.
157. Chang DZ, Ma Y, Ji B, Wang H, Deng D, Liu Y, u. a. Mast Cells in Tumor Microenvironment Promotes the in vivo Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15. November 2011;17(22):7015–23.

158. Esposito I, Friess H, Kappeler A, Shrikhande S, Kleeff J, Ramesh H, u. a. Mast cell distribution and activation in chronic pancreatitis. *Hum Pathol*. November 2001;32(11):1174–83.
159. Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, u. a. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. Juni 2004;57(6):630–6.
160. Esposito I, Kleeff J, Bischoff SC, Fischer L, Collecchi P, Iorio M, u. a. The stem cell factor-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. November 2002;82(11):1481–92.
161. Strouch MJ, Cheon EC, Salabat MR, Krantz SB, Gounaris E, Melstrom LG, u. a. Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15. April 2010;16(8):2257–65.
162. Porcelli L, Iacobazzi RM, Di Fonte R, Serrati S, Intini A, Solimando AG, u. a. CAFs and TGF- β Signaling Activation by Mast Cells Contribute to Resistance to Gemcitabine/Nabpaclitaxel in Pancreatic Cancer. *Cancers*. 7. März 2019;11(3):330.
163. Tewari N, Zaitoun AM, Arora A, Madhusudan S, Ilyas M, Lobo DN. The presence of tumour-associated lymphocytes confers a good prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma: an immunohistochemical study of tissue microarrays. *BMC Cancer*. 24. September 2013;13:436.
164. Minici C, Testoni S, Della-Torre E. B-Lymphocytes in the Pathophysiology of Pancreatic Adenocarcinoma. *Front Immunol*. 14. März 2022;13:867902.
165. Sadozai H, Acharjee A, Eppenberger-Castori S, Gloor B, Gruber T, Schenk M, u. a. Distinct Stromal and Immune Features Collectively Contribute to Long-Term Survival in Pancreatic Cancer. *Front Immunol*. 19. Februar 2021;12:643529.
166. Roth S, Zamzow K, Gaida MM, Heikenwälder M, Tjaden C, Hinz U, u. a. Evolution of the immune landscape during progression of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms to invasive cancer. *EBioMedicine* [Internet]. April 2020 [zitiert 3. Januar 2023];54. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7132171/>
167. Bernard V, Semaan A, Huang J, San Lucas FA, Mulu FC, Stephens BM, u. a. Single Cell Transcriptomics of Pancreatic Cancer Precursors Demonstrates Epithelial and Microenvironmental Heterogeneity as an Early Event in Neoplastic Progression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1. April 2019;25(7):2194–205.
168. Zhang Y, Velez-Delgado A, Mathew E, Li D, Mendez FM, Flannagan K, u. a. Myeloid cells are required for PD-1/PD-L1 checkpoint activation and the establishment of an immunosuppressive environment in pancreatic cancer. *Gut*. Januar 2017;66(1):124–36.

169. 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.* 25. September 2006;12(18):5423–34.
170. O'Reilly EM, Oh DY, Dhani N, Renouf DJ, Lee MA, Sun W, u. a. Durvalumab With or Without Tremelimumab for Patients With Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol.* Oktober 2019;5(10):1431–8.
171. Liffers ST, Godfrey L, Frohn L, Haeberle L, Yavas A, Vesce R, u. a. Molecular heterogeneity and commonalities in pancreatic cancer precursors with gastric and intestinal phenotype. *Gut.* März 2023;72(3):522–34.
172. Erdogan D, Lamers WH, Offerhaus GJA, Busch ORC, Gouma DJ, van Gulik TM. Cystadenomas with ovarian stroma in liver and pancreas: an evolving concept. *Dig Surg.* 2006;23(3):186–91.
173. Naveed S, Qari H, Banday T, Altaf A, Para M. Mucinous Cystic Neoplasms of Pancreas. *Gastroenterol Res.* April 2014;7(2):44–50.
174. Chen W, Ahmed N, Krishna SG. Pancreatic Cystic Lesions: A Focused Review on Cyst Clinicopathological Features and Advanced Diagnostics. *Diagnostics.* 26. Dezember 2022;13(1):65.
175. Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB, Goldstein D. Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 19. Juli 2006;(3):CD002093.
176. Sohal DPS, Mangu PB, Khorana AA, Shah MA, Philip PA, O'Reilly EM, u. a. Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10. August 2016;34(23):2784–96.
177. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, u. a. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med.* 31. Oktober 2013;369(18):1691–703.
178. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, u. a. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med.* 12. Mai 2011;364(19):1817–25.
179. Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, u. a. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet.* Oktober 2015;47(10):1168–78.
180. Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, u. a. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature.* März 2016;531(7592):47–52.

181. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, u. a. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*. April 2011;17(4):500–3.
182. Park W, Chawla A, O'Reilly EM. Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*. 7. September 2021;326(9):851–62.
183. Tang D, Kroemer G, Kang R. Oncogenic KRAS blockade therapy: renewed enthusiasm and persistent challenges. *Mol Cancer*. 4. Oktober 2021;20:128.
184. Zeitouni D, Pylayeva-Gupta Y, Der CJ, Bryant KL. KRAS Mutant Pancreatic Cancer: No Lone Path to an Effective Treatment. *Cancers*. 18. April 2016;8(4):45.
185. Ahmed S, Bradshaw AD, Gera S, Dewan MZ, Xu R. The TGF- β /Smad4 Signaling Pathway in Pancreatic Carcinogenesis and Its Clinical Significance. *J Clin Med*. Januar 2017;6(1):5.
186. Takai E, Yachida S. Genomic alterations in pancreatic cancer and their relevance to therapy. *World J Gastrointest Oncol*. 15. Oktober 2015;7(10):250–8.
187. Qian Y, Gong Y, Fan Z, Luo G, Huang Q, Deng S, u. a. Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2. Oktober 2020;13:130.
188. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JAC. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 15. Juli 2002;87(2):161–7.
189. Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA, Marimastat Pancreatic Cancer Study Group. Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1. August 2001;19(15):3447–55.
190. Moore MJ, Hamm J, Dancey J, Eisenberg PD, Dagenais M, Fields A, u. a. Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1. September 2003;21(17):3296–302.
191. Phase 3 trial of pancreatic cancer therapy misses primary endpoint [Internet]. [zitiert 8. Januar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.healio.com/news/hematology-oncology/20191104/phase-3-trial-of-pancreatic-cancer-therapy-misses-primary-endpoint>
192. Pancreatic cancer and immune checkpoint inhibitors—still a long way to go - PMC [Internet]. [zitiert 12. März 2023]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7724172/>

193. Le DT, Jaffee EM. Regulatory T Cell Modulation Using Cyclophosphamide in Vaccine Approaches: A Current Perspective. *Cancer Res.* 15. Juli 2012;72(14):3439–44.
194. Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH, Rüttinger D. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer.* 18. Juli 2017;5:53.
195. Espinosa I, Edris B, Lee CH, Cheng HW, Gilks CB, Wang Y, u. a. CSF1 Expression in Nongynecological Leiomyosarcoma Is Associated with Increased Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol.* Oktober 2011;179(4):2100–7.
196. Zhang Q wen, Liu L, Gong C yang, Shi H shan, Zeng Y hui, Wang X ze, u. a. Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophages in Solid Tumor: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS ONE.* 28. Dezember 2012;7(12):e50946.
197. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, u. a. CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T Cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models. *Cancer Res.* 15. September 2014;74(18):5057–69.
198. Hanada K, Shimizu A, Kurihara K, Ikeda M, Yamamoto T, Okuda Y, u. a. Endoscopic approach in the diagnosis of high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia. *Dig Endosc.* 2022;34(5):927–37.
199. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *Cancer J Sudbury Mass.* 2017;23(6):333–42.
200. Gonoï W, Hayashi TY, Okuma H, Akahane M, Nakai Y, Mizuno S, u. a. Development of pancreatic cancer is predictable well in advance using contrast-enhanced CT: a case-cohort study. *Eur Radiol.* Dezember 2017;27(12):4941–50.
201. Permuth JB, Choi J, Balarunathan Y, Kim J, Chen DT, Chen L, u. a. Combining radiomic features with a miRNA classifier may improve prediction of malignant pathology for pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms. *Oncotarget.* 31. August 2016;7(52):85785–97.
202. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, u. a. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19. September 2017;114(38):10202–7.
203. Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J.* Juni 1995;68(6):2588–600.
204. Taube JM, Akturk G, Angelo M, Engle EL, Gnjjatic S, Greenbaum S, u. a. The Society for Immunotherapy in Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer.* 15. Mai 2020;8(1):e000155.

205. Gorris MAJ, Halilovic A, Rabold K, van Duffelen A, Wickramasinghe IN, Verweij D, u. a. Eight-Color Multiplex Immunohistochemistry for Simultaneous Detection of Multiple Immune Checkpoint Molecules within the Tumor Microenvironment. *J Immunol.* 1. Januar 2018;200(1):347–54.
206. Yuan Y. Spatial Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb Perspect Med.* August 2016;6(8):a026583.
207. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature.* 25. April 2013;496(7446):445–55.
208. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, u. a. Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells. *Front Immunol.* 29. April 2021;12:611795.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	mIHC-Protokoll Panel 1.....	24
Tabelle 2:	mIHC-Protokoll Panel 2.....	25
Tabelle 3:	Opal Fluorophore und ihre Wellenlängen	25
Tabelle 4:	Deskriptive Analyse nach Patient:innen. Aufgelistet ist die Anzahl der Patient:innen mit Alter und Geschlecht. Die Altersangaben beziehen sich auf das Alter bei Diagnosestellung in Jahren.....	31
Tabelle 5:	Deskriptive Analyse nach Diagnosen. Aufgelistet ist die Anzahl der verschiedenen diagnostizierten Vorläuferläsionen sowie Normalgewebe und PDAC (= Tumor zentral und Tumor peripher) mit Alter und Geschlecht der Patient:innen. Die Altersangaben beziehen sich auf das Alter bei Diagnosestellung in Jahren.....	31
Tabelle 6:	Test auf Normalverteilung	32

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Molekulargenetische, zelluläre und immunologische Ereignisse während der Karzinogenese des PDAC	8
Abbildung 2:	Azinär-Duktale Metaplasie (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)	9
Abbildung 3:	PanIN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung) Abb. 3A: PanIN low grade Abb. 3B: PanIN high grade.....	10
Abbildung 4:	IPMN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung) Abb. 4A: Gastrale IPMN, low grade Abb. 4B: Gastrale IPMN, high grade Abb. 4C: Intestinale IPMN, high grade Abb. 4D: Pankreatobiliäre IPMN, high-grade.....	12
Abbildung 5:	IOPN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)	14
Abbildung 6:	MCN (HE-Färbung, 20x Vergrößerung)	15
Abbildung 7:	Tissue Microarrays Abb. 7A: Paraffinblock mit Gewebestanden Abb. 7B: HE-Färbung von Tissue Microarrays	22
Abbildung 8:	Grundprinzip der TSA-basierten Fluoreszenz-mIHC Der Sekundärantikörper bindet zunächst an den mit dem Antigen gebundenen Primärantikörper. Anschließend erfolgt die Aktivierung und kovalente Bindung des Tyramide-Fluorophors an die Tyrosinbindungsstellen des Antigens. Unter Hitzeinduktion werden der Primär – und Sekundärantikörper abgelöst, das Fluoreszenzsignal verbleibt am Antigen. (Modifiziert nach <i>Cell Signaling Technology</i> , 2016)	23
Abbildung 9:	Multiplex-Fluoreszenzfärbung Abb. 9A: Multiplex-Bild einer PanIN-Läsion Abb. 9B: Multiplex-Bild einer intestinalen IPMN high grade Läsion	25
Abbildung 10:	Auswertung mit Leica LAS X und ImageJ Abb. 10A: Fluoreszenzgefärbtes Bild nach Erfassung mit der Leica LAS X Software Abb. 10B: Erkennung der einzelnen Zellen (rot umrandet) nach Bildanalyse mit ImageJ Abb. 10C: Exemplarischer Ausschnitt eines Makros für den Marker CD3	27
Abbildung 11:	Immunhistochemische Etablierung der Marker an Tonsillengewebe. Zeiss Axioskop 2 plus. Vergrößerung: 20x	29
Abbildung 12:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der einzelnen Marker an Tonsillengewebe. Leica TCS SP8 Mikroskop, Vergrößerung: 20x	30
Abbildung 13:	Vergleich der Tryptase+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	33

Abbildung 14: Vergleich der CD68+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	34
Abbildung 15: Vergleich der CD163+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	35
Abbildung 16: Vergleich der CD68+ (hellblau) und CD163+ Zellen (dunkelblau) zwischen Normalgewebe, zentralen und peripheren Tumorseiten. Die CD68+ und CD163+ Zellen sind im Tumorgewebe signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe.	36
Abbildung 17: CD68+ Zellen (pink) und CD163+ Zellen (lila) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Normalgewebe und PDAC zentral und peripher. Repräsentative Abbildung. Es finden sich mehr CD68+ und CD163+ Zellen im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Graufärbung: DAPI. Vergrößerung: 20x.....	36
Abbildung 18: Median der CD3+ Zellen (dunkelblau) im Vergleich zu CD20+ Zellen (hellblau). Graphische Darstellung der Mediane im gruppierten Balkendiagramm. Über alle dargestellten Vorläuferläsionen hinweg sowie im Normalgewebe und dem Tumorgewebe ist der Median der CD20+ Zellen gegenüber den CD3+ Zellen deutlich geringer.	37
Abbildung 19: Vergleich der CD20+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	38
Abbildung 20: Vergleich der CD3+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	39

Abbildung 21: CD3+ Zellen (gelb) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Normalgewebe, ADM, PanIN high grade sowie gastralen IPMN low und high grade. Repräsentative Abbildung. Es finden sich mehr CD3+ Zellen in den aufgeführten Vorläuferläsionen als im Normalgewebe. Graufärbung: DAPI. Vergrößerung: 20x.....	40
Abbildung 22: Vergleich der CD8+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	41
Abbildung 23: Vergleich der CD3+ (hellblau) und CD8+ Zellen (dunkelblau) zwischen Normalgewebe, ADM und PanIN high grade. Die CD3+ und CD8+ Zellen sind in ADM und PanIN high grade signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe.	42
Abbildung 24: Vergleich der CD3+ (hellblau) und CD8+ Zellen (dunkelblau) zwischen Normalgewebe, gastralen IPMN low grade und high grade. Die CD3+ und CD8+ Zellen sind in low grade gastralen IPMN signifikant erhöht im Vergleich zu Normalgewebe. Für gastrale IPMN high grade ergeben sich im Vergleich keine signifikanten Zellzahlveränderungen.	42
Abbildung 25: CD8+ Zellen (pink) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie im Vergleich zwischen Normalgewebe, ADM, PanIN high grade sowie gastralen IPMN low und high grade. Repräsentative Abbildung. Es finden sich mehr CD8+ Zellen in den aufgeführten Vorläuferläsionen als im Normalgewebe. Graufärbung: DAPI. Vergrößerung: 20x.....	43
Abbildung 26: Vergleich der CD4+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	44
Abbildung 27: Vergleich der FoxP3+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$	45

Abbildung 28: Vergleich der PD-1+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor ohne Berücksichtigung des Dysplasiegrades. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind graphisch als Boxplots dargestellt (Median, 25. Und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

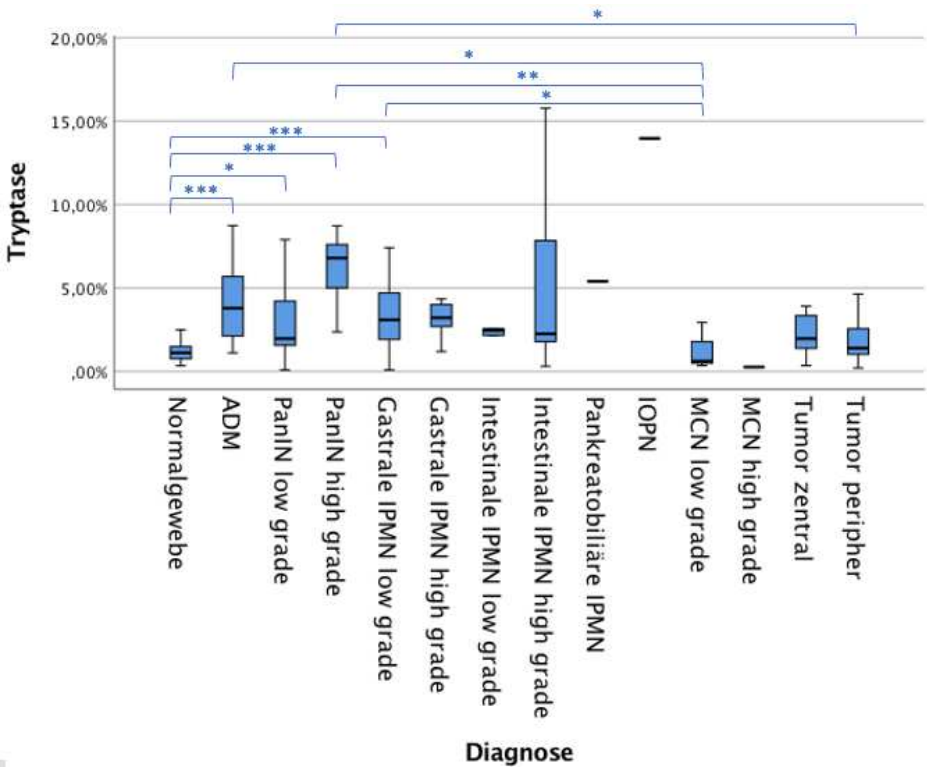
..... 46

8 Anhang

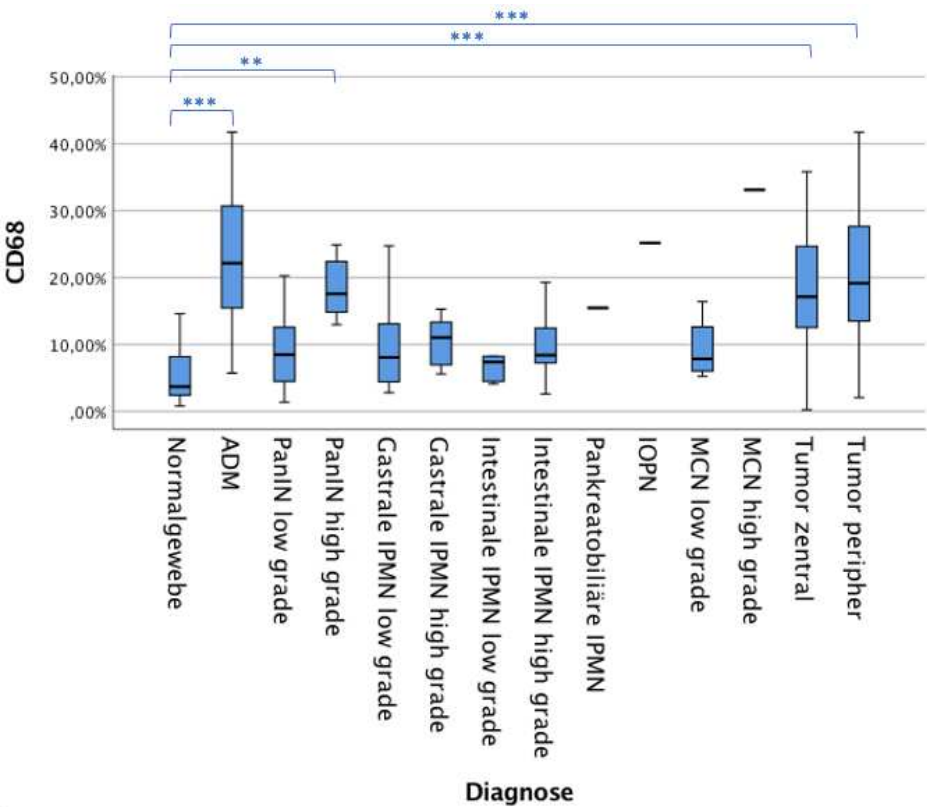
Anhang 1: Opal Multiplex-Immunhistochemie Protokoll

Preparation: Bake Slides at 65°C for 1 h or o.n.			
1. Deparaffinization	Xylol	3x 10min	Day 1
2. Descending alcohol series	Ethanol 100%, 95%, Rinse in 70% and then Aqua dest	10 min each	
3. Fix	10% Neutral buffered Formalin	20 min	
4. Wash	Aqua dest	rinse	
5. Antigen demasking	AR buffer	15 min, let cool 15-30 min	
6. Wash	Aqua dest, TBS-T	rinse	
7. Peroxidase Block	3% H2O2 in PBS	10 min	
8. Wash	TBS-T	6 min	
9. Blocking	Blocking buffer	10 min at RT	
10. Prim. antibody	in Prim. AB Working Solution	1 h at RT	
11. Wash	TBS-T	6 min	Day 2
12. Scd. antibody	Polymer HRP Ms + Rb	10 min at RT	
13. Wash	TBS-T	6 min	
14. Signal generation	Opal Fluorophore Working Solution	10 min at RT	
15. Wash	TBS-T	6 min	
16. MWT/AB-Stripping	AR buffer	15 min, let cool 15-30 min	
17. Detection of next target	Restart Protocol at Step 8	continue with step 18 after detection of all targets	
18. Counterstaining	DAPI Working Solution	5 min at RT	
19. Wash	TBST, Water	2 min each	
20. Mounting	Coverslip slides		

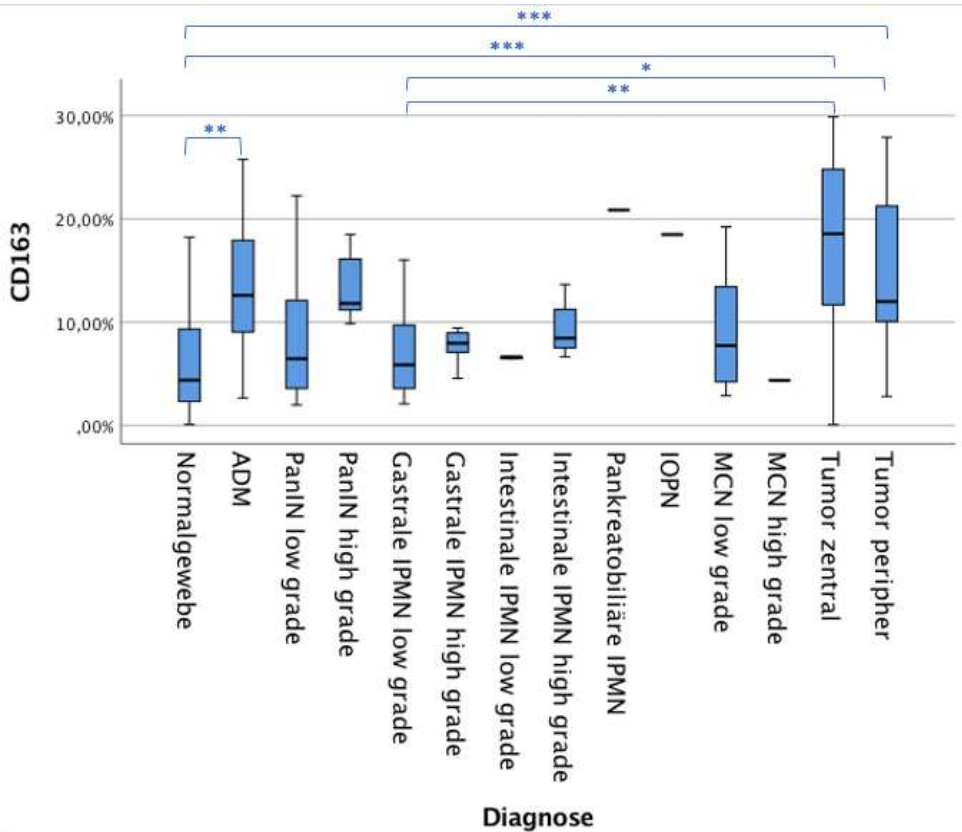
Anhang 2: Vergleich der Tryptase+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



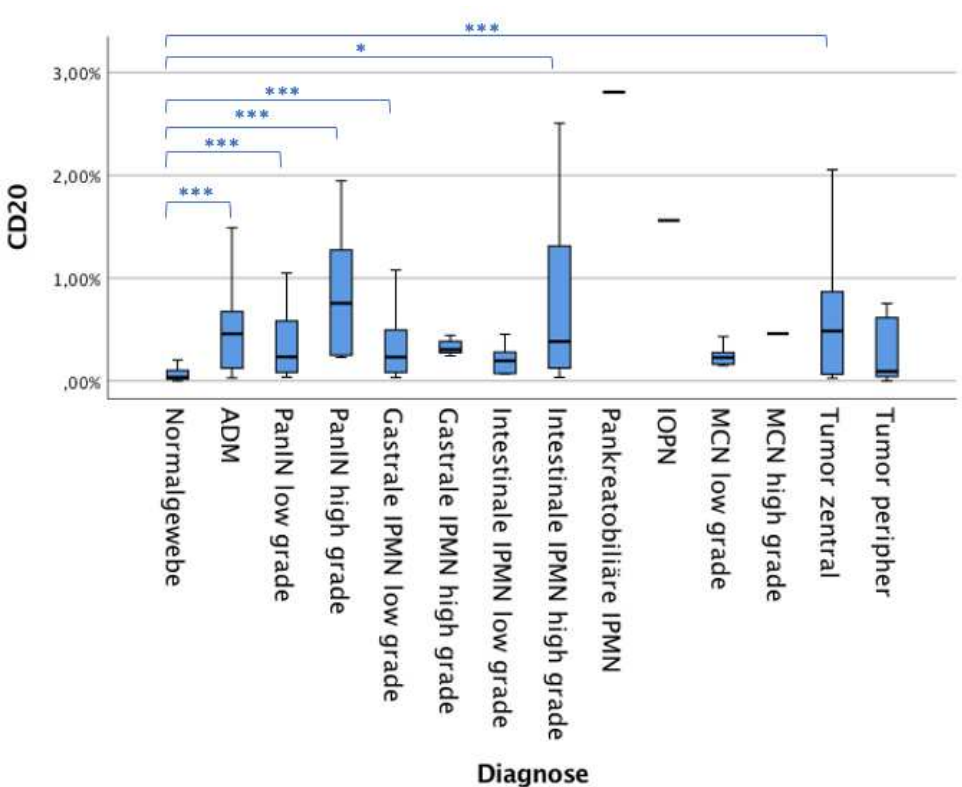
Anhang 3: Vergleich der CD68+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



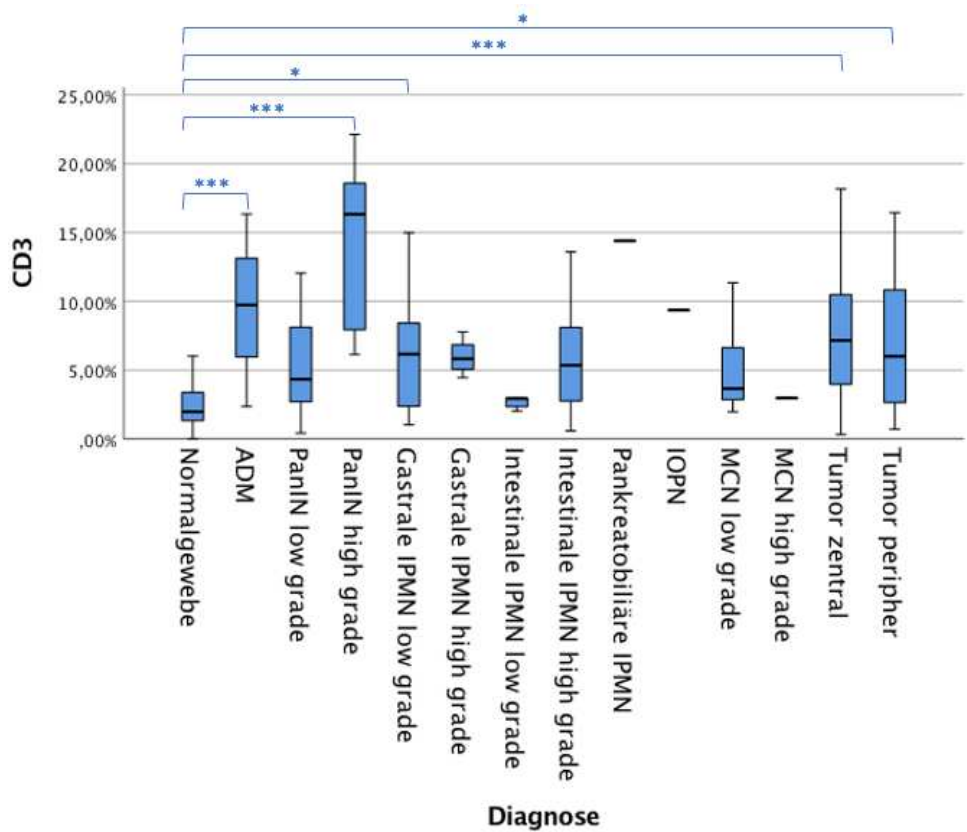
Anhang 4: Vergleich der CD163+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



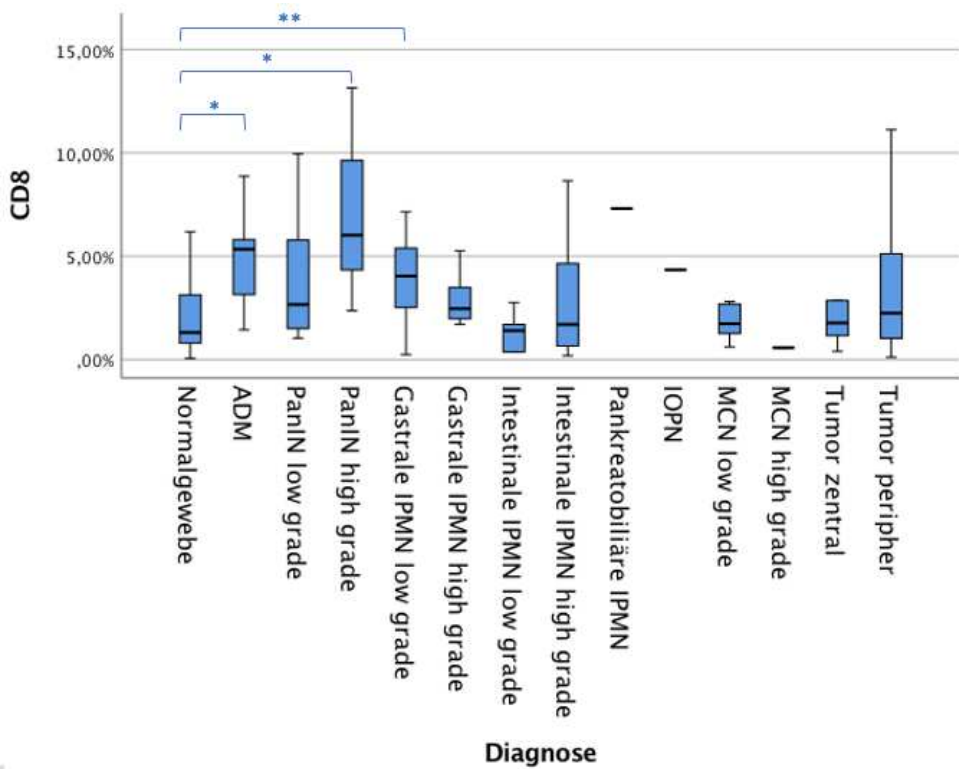
Anhang 5: Vergleich der CD20+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



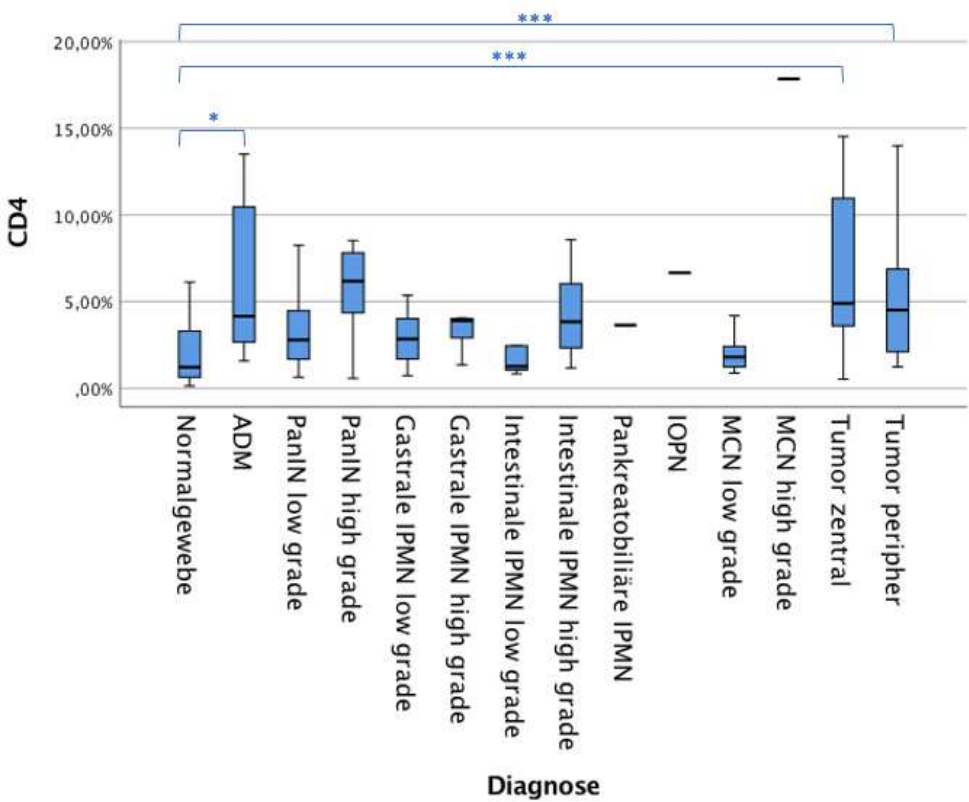
Anhang 6: Vergleich der CD3+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



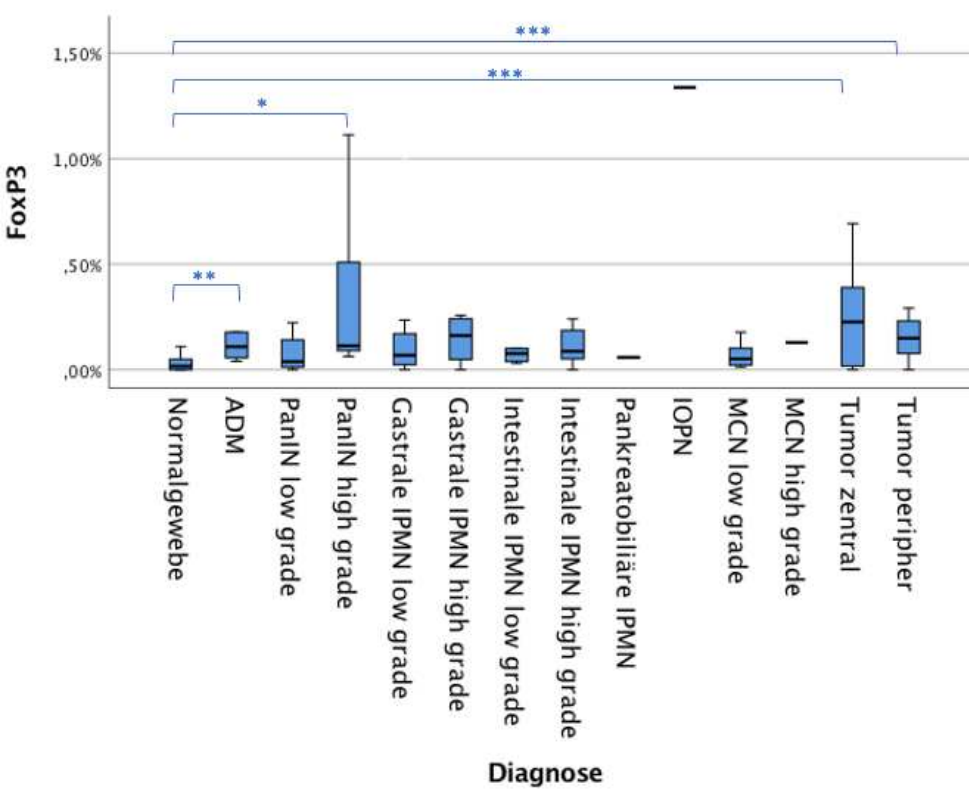
Anhang 7: Vergleich der CD8+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



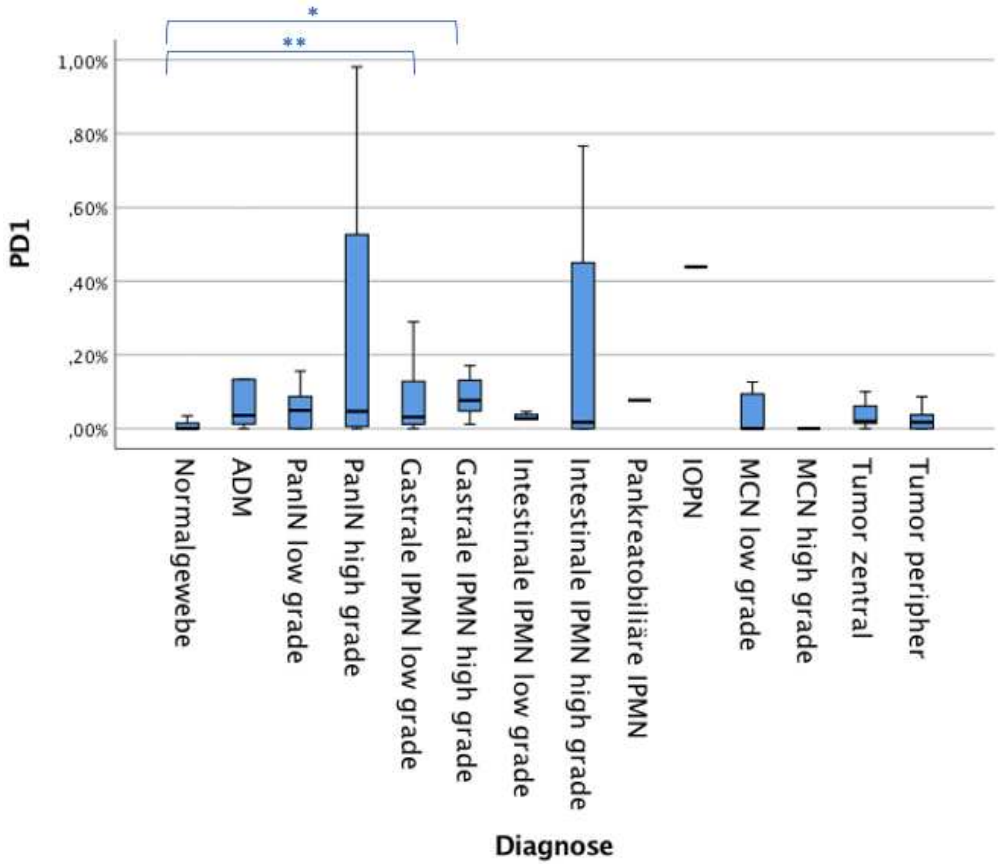
Anhang 8: Vergleich der CD4+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



Anhang 9: Vergleich der FoxP3+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



Anhang 10: Vergleich der PD1+ Zellen zwischen Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumor unter Berücksichtigung des Dysplasiegrades.



Danksagung

Zuerst möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Irene Esposito dafür danken, dass ich ein Promotionsprojekt zu einem solch spannenden und aktuellen Thema unter ihrer Supervision durchführen konnte. Frau Prof. Esposito hat mir durch ihre Zielstrebigkeit und ihr Engagement immer wieder geholfen, über mich hinauszuwachsen. Auch die Möglichkeit, meine Arbeit im Rahmen zweier Kongresse als Präsentation vorstellen zu dürfen, war für mich eine besondere Erfahrung.

Weiterhin möchte ich meinen herzlichsten Dank an Frau Dr. Lena Häberle aussprechen, die mir zu fast jeder Tages- und Nachtzeit als Mentorin und Freundin zur Seite stand und mich durch ihre zugewandte und professionelle Art über viele Hürden geführt hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Martin Schlenz, insbesondere für die Einarbeitung und die weitere Unterstützung im Verlauf des Projekts. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Frederike Opitz für ihr Engagement. Auch beim restlichen Laborteam bedanke ich mich herzlich.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Jelle Postma und Herrn Dr. Sebastian Hänsch aus dem *Center for Advanced Imaging* für die Einführung in das SP8-Mikroskop und Unterstützung beim Kodieren der Makros meinen Dank aussprechen.

Bei der *Düsseldorf School of Oncology* möchte ich mich herzlich für das gewährte Stipendium und die damit einhergehende finanzielle Unterstützung sowie den wissenschaftlichen Input bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Carolin Müller für die gegenseitige Hilfestellung und Freundschaft sowie an Johanna, Kathi und Caro für die tolle gemeinsame Zeit. Ohne euch wären die Monate im Labor nicht dieselben gewesen.

Schließlich bedanke ich mich von Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für die positiven Worte und die Unterstützung über all die Jahre. Ein ganz besonderer Dank geht an Klaus, ohne den ich die ganzen Excel-Rohdaten niemals bewältigen hätte können, sowie an meine Mama, die mir dieses Studium erst ermöglicht hat.

Ich bin sehr stolz und dankbar, für mein Forschungsprojekt den Promotionspreis der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 2021 erhalten zu haben.