

**Die Bedeutung von Angiogenesefaktoren und tumorinfiltrierenden
Immunzellen des mononukleären Phagozytensystems bei Patienten
mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas und distalem
Gallengangskarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Charlotte Christiane Pötner

geboren am: 17. Januar 1992 in Belzig

angefertigt an der: Universität Leipzig / Medizinische Fakultät
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-,
Thorax- und Gefäßchirurgie

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Gabriela Aust/ Dr. med. Georgi Atanasov

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrads vom: 23.Juni 2020

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einführung.....	1
1.1. Anatomie und Pathologie des hepatobiliär-pankreatischen Systems im Überblick ..	1
1.1.1. Das Pankreaskarzinom	1
1.1.2. Das Gallengangskarzinom	4
1.2. Tumorimmunologie.....	5
1.2.1. Das Immunsystem und dessen Einfluss auf die Tumorprogression.....	5
1.2.2. Neoangiogenese und deren Verbindung zur Tumorimmunologie	10
1.2.3. Aktueller Stand der Forschung	12
2. Aufgabenstellung.....	13
3. Material und Methoden.....	14
3.1. Patienten und Tumorresektate	14
3.2. Verbrauchsmaterialien	14
3.3. Geräte.....	15
3.4. Chemikalien	15
3.5. Antikörper.....	17
3.6. Immunhistochemie	18
3.6.1. Probenaufbereitung	18
3.6.2. Nachweismethoden der immunhistochemischen Färbung	18
3.6.3. Durchführung der Färbung	19
3.6.4. Immunhistochemische Auswertung und Bildung von Patientengruppen	21
3.7. Statistische Auswertung	24

4. Ergebnisse	25
4.1. Klinisch-pathohistologische Parameter der untersuchten Patientenpopulation	25
4.2. Makrophagensubtypen und Angiogenesefaktoren im Tumorgewebe	28
4.3. Einfluss von Makrophagen und Angiopoietine auf klinisch-pathologische Daten	31
4.3.1. Pankreaskarzinom	31
4.3.2. Gallengangskarzinom.....	35
4.4. Die Makrophagensubtypen und deren Einfluss auf das Überleben der Patienten...	36
4.4.1. Überlebensdaten von Patienten mit Pankreaskarzinom	36
4.4.2. Überlebensdaten von Patienten mit Gallengangskarzinom.....	38
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung	46
Literaturverzeichnis	49
Anlagen	57
Tabellenverzeichnis.....	63
Abbildungsverzeichnis.....	64
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	65

Abkürzungsverzeichnis

ANG	Angiopoietin
BMI	Body Mass Index
BRCA-2	<i>breast cancer 2 (engl.)</i>
CA 19-9	<i>carbohydrate antigene 19-9 (engl.)</i>
CD	<i>cluster of differentiation (engl.)</i>
CDKN 2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (engl.)</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CT	Computertomographie
CXCR12	CXC-Motiv Chemokinerezeptor 12
DAB	Diaminobenzidin
dCCA	distales Cholangiokarzinom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie
EUS	endosonographischer Ultraschall
FGF	<i>fibroblast growth factor (engl.)</i>
FOXP3+ Tregs	forkhead box p3 positive regulatorische T-Zellen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxilin-Eosin
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen DR
IHC	Immunhistochemie
IPMNs	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien
K-ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (engl.)</i>
LK	Lymphknoten
M1	Makrophagen vom Phänotyp 1
M2	Makrophagen vom Phänotyp 2
MCNs	muzinös-zystische Neoplasien
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
PanINs	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS-Lösung	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma (engl.)</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor (engl.)</i>

PPPD	pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion
PRSS-1	Cationic Trypsinogen
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
SMAD 4	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4 (engl.)</i>
SRCR-B	Cystein-reiches Scavenger Protein der Gruppe B
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS-Lösung	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	<i>Tumor central area</i> , Tumorzentrum
TEM	Tie2-exprimierende Makrophagen
Tie-2	Tyrosinkinase Rezeptor mit Immunglobulin und endothelialen Growth Factor homologe Domäne 2
TIF	<i>Tumor Invasion front</i> , Tumordinfiltrationsfront
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	<i>Union internationale contre le cancer (frz.)</i>
VEGF	vascular endothelial growth <i>factor (engl.)</i>

1. Einführung

1.1. Anatomie und Pathologie des hepatobiliär-pankreatischen Systems im Überblick

Das Pankreas und die Gallengänge sind als Teile des hepatobiliär-pankreatischen Systems wesentliche Strukturen des Verdauungssystems ¹. Während die Gallengänge die in der Leber produzierte Gallenflüssigkeit transportieren, bilden die exokrinen Drüsen des Pankreas Verdauungsenzyme zur Nahrungszersetzung und sezernieren diese in den Ductus pancreaticus ². Die gemeinsame Endstrecke beider Gangsysteme bildet die Papilla duodeni major im Duodenum ¹. Dort lokalisierte Stenosen führen zu einem Rückstau der Gallenflüssigkeit. Klinisch manifestieren sich dabei folgende Symptome: Oberbauchschmerzen, Ikterus, Juckreiz, Fettstühlen, sowie Übelkeit und Erbrechen ¹. Tumore der Gallengänge und/oder des Pankreas stellen neben Konkrementen innerhalb der Gallenwege, eine häufige Ursache dieser mechanisch-obstruktiven Cholestase außerhalb der Leber dar ³. Letztlich führt eine derartige Symptomatik häufig zur Diagnose einer meist bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankung ^{4,5}. Eine Differenzierung zwischen den Tumoren des pankreato-biliären Systems ist, insbesondere zwischen Tumoren des distalen Gallengangs und des Pankreaskopfkarcinoms, aufgrund der anatomischen Nähe und zahlreicher Gemeinsamkeiten im Hinblick auf Epidemiologie und klinischer Symptomatik häufig erschwert ^{5,6}. Sowohl Pankreas- als auch distale Gallengangstumore stellen Tumorentitäten mit schlechter Prognose dar ⁷. Jährlich erkranken deutschlandweit circa 20/100.000 Einwohner an Pankreaskarzinomen und ca. 6/100.000 Einwohner an Gallengangskarzinomen ^{8,9}. Weltweit lässt sich für beide Entitäten ein steigender Trend sowohl für Neuerkrankungen, als auch für die Sterberaten verzeichnen ⁷. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei ca. 9% für Pankreaskarzinome bzw. bei ca. 14% für Tumore der Gallenwege ⁷. Eine kurative Therapiemöglichkeit besteht zum Zeitpunkt der Diagnose eines Pankreaskarzinoms nur in 10 bis 20% der Fälle ¹⁰. Im nachfolgenden Abschnitt werden wesentliche Aspekte zur Pathogenese, Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten beider Tumorentitäten zusammengefasst.

1.1.1. Das Pankreaskarzinom

Pankreaskarzinome können aus dem endokrinen oder, wie es am häufigsten der Fall ist, dem exokrinen Teil des Pankreas entspringen ¹¹. Bei den endokrinen Tumoren handelt es sich um hormonproduzierende Zellen als Ursprungsgewebe der Tumore, worauf hier nicht

näher eingegangen werden soll. Nach derzeitigem Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass ca. 10% der Pankreastumore familiär vererbt werden ¹². Wesentliche Risikofaktoren für diese Erkrankung sind vor allem Zigarettenrauchen, Übergewicht, Diabetes mellitus und chronische Pankreatitis ^{3, 13}. Bei den Tumoren des exokrinen Pankreas handelt es sich in über 90% der Fälle um invasive schleimproduzierende Zellen ¹³. Die Tumorzellen entstehen aus nicht-invasiven Vorläuferläsionen, sogenannten intraepithelialen Neoplasien, welche die verschiedenen Typen des Adenokarzinoms determinieren: die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) als häufigste Form, die intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMNs) und die muzinös-zystischen Neoplasien (MCNs) ¹³. Die Entartung dieser Vorläuferläsionen bzw. der Dysplasiegrad dieser Zellen werden maßgeblich durch zahlreiche Mutationen getriggert (Abbildung 1) ¹². Die Komplexität der genetischen Veränderungen und die damit einhergehende Heterogenität der Tumore erschwert die Identifikation neuer therapeutischer Targets und stellt somit einen weiteren Grund für die nach wie vor schlechte Prognose der Pankreaskarzinome dar ¹².

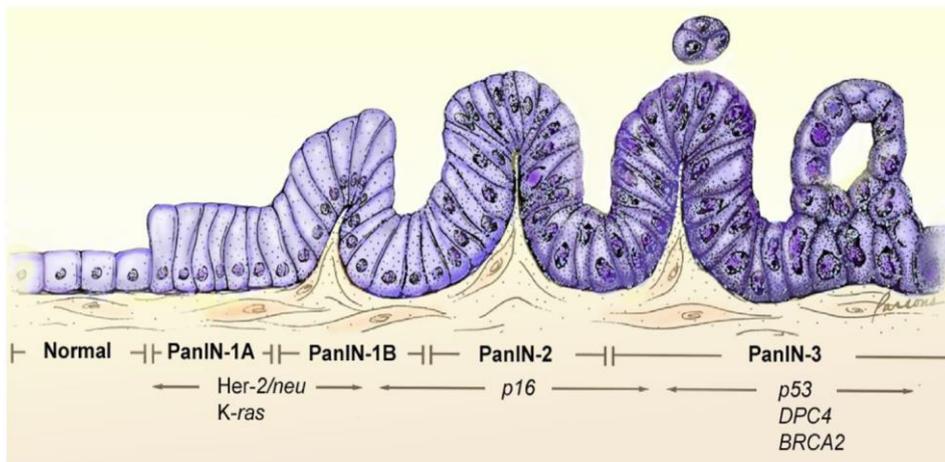


Abbildung 1: Entstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Die Entwicklung vom Normal- zum Tumorgewebe von duktales Adenokarzinomen erfolgt über intraepitheliale Neoplasien (PanIN), welche durch somatische und Keimbahnmutationen getriggert werden. Diese PanINs werden je nach pathomorphologischem Dysplasiegrad in PanIN 1A und 1B, PanIN-2 und PanIN-3 eingeteilt, wobei PanIN-3 bereits als Präkanzerose des Pankreaskarzinoms gilt. Während Mutationen des K-ras Gens häufig in *low grade* Präkursorläsionen nachgewiesen werden und somit früh stattfinden, konnten Mutationen von p53 und BRCA2 vor allem in *high-grade* Läsionen (PanIN-3) gezeigt werden und treten somit in der fortgeschrittenen Tumorgenese auf.

Muniraj, T., Jamidar, P. A. & Aslanian, H. R. Pancreatic cancer: a comprehensive review and update. Disease-a-month : DM 59, 368–402; 10.1016/j.disamonth.2013.08.001 (2013); Copyright-Lizenznummer: 443755144409

Das duktale Adenokarzinom ist die häufigste Variante der malignen exokrinen Pankreastumore und befindet sich zu ca. 80% der Fälle im Pankreaskopf, die übrigen 20% verteilen sich auf den Pankreaskorpus und den Caudabereich ¹¹. Wesentliche histologische Subtypen dieses Tumors sind das adenosquamöse, muzinös nicht zystische, und das anaplastische Karzinom ¹⁴. Die klinische und pathohistologische Evaluierung des Pankreaskarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (8. Auflage) und das Staging analog anhand der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC). Bei Verdacht auf raumfordernde Prozesse im Pankreas werden vorrangig bildgebende Verfahren genutzt. Untersuchungen mittels Oberbauchsonographie, endoskopischem Ultraschall, sowie Multidetektor-Computertomographie und Magnetresonanztomographien mit Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographien (MRT/MRCP), eignen sich zuverlässig zur Detektion maligner Prozessen im Pankreas ¹⁵. Die Durchführung endosonographisch gestützter Biopsien werden nur zur Differentialdiagnostik bei begründetem Verdacht oder vor dem Beginn eines palliativen Therapieregimes empfohlen ¹⁵. Bestätigt sich der Befund einer Raumforderung in der Bildgebung, empfiehlt sich die Bestimmung des Serummarkers CA 19-9 zur Verlaufskontrolle vor und nach Therapiebeginn. Derzeit ist die chirurgische Resektion im Gesunden (R0), die einzige verfügbare Therapie mit kurativem Ansatz. Je nach Tumorlokalisierung erfolgt eine partielle Duodenopankreatektomie (Kausch-Whipple-Operation) von Pankreaskopftumoren mit oder ohne Pyloruserhalt. Eine subtotale Pankreaslinksresektion oder totale Pankreatoduodenektomie wird bei Pankreaskörpertumoren durchgeführt, während eine Pankreaslinksresektion bei Tumoren im Caudabereich des Pankreas bevorzugt wird ¹⁵. In Abhängigkeit des Allgemeinzustandes des Patienten und nach Ausschluss von Kontraindikationen, wie Infektionen oder ausgeprägter Komorbiditäten, empfiehlt sich im Stadium UICC I-III eine adjuvante Chemotherapie über sechs Monate mit Gemcitabin oder 5-Floururacil/Folinsäure zur Risikoreduktion eines Lokalrezidivs ^{3,10,16}. Bei vorhandener Fernmetastasierung stehen nach der aktuellen S3-Leitlinie exokriner Pankreastumore palliative Chemotherapeutika, wie eine Kombination aus Gemcitabin und dem Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib, oder FOLFIRINOX (5-FU/Folsäure, Irinotecan, Oxaliplatin) zur Verfügung. Eine neoadjuvante Chemotherapie für resektable Tumore wird aktuell trotz vielversprechender Datenlage noch nicht empfohlen ¹⁵. Der Forschungsbedarf in diesem Bereich ist somit weiterhin groß.

1.1.2. Das Gallengangskarzinom

Bei Gallengangskarzinomen, auch Cholangiokarzinome genannt, handelt es sich um Adenokarzinome, die aus den Epithelzellen der großen und kleinen Gallenwege, analog zum Pankreaskarzinom, über eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz entstehen⁴. Chronische Entzündungsprozesse und Mutationen, vorallem im K-ras und p53-Gen spielen dabei als Triggerfaktoren eine wesentliche Rolle⁴. Je nach Lokalisation werden prinzipiell Tumore der intra- und extrahepatischen Gallenwege unterschieden^{17,18}. Die intrahepatischen Cholangiokarzinome folgen bezüglich der TNM-Klassifikation den Lebertumoren, während die extrahepatischen Formen eine eigene Stadiumeinteilung analog der UICC-Richtlinie (7. Auflage) besitzen¹⁹. Extrahepatische Tumore der Gallenwege unterteilen sich in perihiläre, nach dem Entdecker auch Klatskin-Tumore genannt, und distale Formen^{18,20}. Die Abgrenzung dieser beiden Formen ist im klinischen Alltag aufgrund der nahen anatomischen Lage meist schwierig, sodass im Hinblick auf epidemiologische und prognostische Aussagen häufig keine klare Differenzierung der beiden Tumorformen getroffen wird²⁰. Klatskin-Tumore stellen die häufigste Form dar, während distale Gallengangstumore 20-30% der Tumore ausmachen^{18,20}. Die distalen Cholangiokarzinome werden weiterhin in diffus infiltrierende und polypös wachsende Tumore unterschieden. Gemischte Formen sind möglich⁴.

Als ein wesentlicher Risikofaktor für ein frühes Erkrankungsalter gilt die primär sklerosierende Cholangitis (PSC)^{18,20}. Die mit dieser Erkrankung vergesellschaftete permanente Inflammationsaktivität fördert maligne Umbauprozesse im Epithel und bedingt ein Lebenszeitrisko zur Entwicklung eines Karzinoms zwischen 7 und 20%¹⁸. Weitere Risikofaktoren sind Übergewicht, Rauchen, Choledochuszysten, und Wurmerkrankungen (*Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*)²¹. Die bildgebenden Verfahren zur Diagnosestellung von distalen Cholangiokarzinomen umfassen vorrangig Multidetektor-CT, MRT/MRCP, die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) und den endosonographischen Ultraschall (EUS). Zur pathohistologischen Diagnosesicherung werden ultraschallgestützte Punktionen der Gallenwege durchgeführt²⁰. Bei perihilären und distal gelegenen Tumoren ermöglicht die Bürstenzytologie zudem molekulargenetische Untersuchungen²⁰. Aufgrund des verstärkten desmoplastischen Gewebes (große Anzahl von Stromazellen) ist die zytologische bzw. histologische Diagnosesicherung vor allem in fortgeschrittenen Stadien häufig erschwert. Therapeutisch ist, ebenso wie beim Pankreaskarzinom, eine chirurgischen R0-Resektion der einzige kurative Ansatz. Um dies zu erreichen, ist häufig eine radikale Resektion der gesamten Gallenwege, sowie Teile der

Leber und des Pankreas, nötig ²². Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weisen nur ca. 35% der Patienten ein Krankheitsstadium auf, indem eine R0-Resektion noch möglich ist ²⁰. Den Goldstandard zur Operation des distalen Gallengangskarzinoms bildet die Pankreatoduodenektomie (Whipple-OP) ²⁰. Handelt es sich um nicht resezierbare Tumore von Patienten mit gutem Allgemeinzustand, erfolgt eine palliative Chemotherapie aus einer Kombination von Gemcitabin und Cisplatin. Derzeit liegen nur wenige Studien vor, die einen Nutzen von neoadjuvanten und adjuvanten Chemoradiotherapien bei chirurgisch resektablen Tumoren belegen ^{23,24}. Insgesamt ist die Studienlage zu neuen Therapieansätzen weiterhin unzureichend.

1.2. Tumorimmunologie

Die Prognose und der Verlauf einer Tumorerkrankung hängen im Wesentlichen von der Interaktion zwischen biologischen Prozessen im Tumorgewebe und dem Immunsystem des Patienten ab ^{25,26}. *Tumor-Escape-Mechanismen* und Veränderungen des *Microenvironment* spielen insbesondere bei Tumoren mit einer schlechten Prognose eine entscheidende Rolle ²⁷. Im Folgenden sollen die wesentlichen Mechanismen der Tumorimmunologie erörtert und mit Pankreas- und Gallengangskarzinomen, als Kernstück dieser Arbeit, in einen Kontext gesetzt werden.

1.2.1. Das Immunsystem und dessen Einfluss auf die Tumorprogression

Im Jahr 2000 wurde von der Arbeitsgruppe Hanahan und Weinberg et al. der Begriff „*Hallmarks of Cancer*“ geprägt ²⁸. Dieser beinhaltet zehn Mechanismen, welche zum grundlegenden Verständnis des Tumorwachstums beitragen ²⁸. Darunter zählen unter anderem die Vermeidung von Immunreaktionen (*avoiding immune destruction*) und die stimulierende Entzündung (*tumor promoting inflammation*) ²⁸. Insgesamt können sie unter dem Begriff *Tumor-Escape Mechanismen* zusammen gefasst werden. Dieser impliziert die gezielte Umgehung körpereigener Abwehrmechanismen als wesentlichen Aspekt der Tumorprogression ²⁷. Wie diese Abwehrmechanismen zur lokalen und systemischen Kontrolle von Wachstumsprozessen körperfremder Zellen zusammenwirken, ist hinreichend bekannt: B- und T-Lymphozyten, als zelluläre Bestandteile des adaptiven Immunsystems, besitzen die Fähigkeit spezifische körperfremde Moleküle, wie Bestandteile von Erregern oder Tumorzellen, mithilfe antigenpräsentierender Zellen zu erkennen, und sich abhängig

von bestimmten Interleukinen und Zytokinen zu differenzieren²⁹. Aktivierte B- und T-Zellen leiten anschließend die Inaktivierung und/oder Eliminierung dieser Zellen durch Entzündungsreaktionen und apoptotische Prozesse ein²⁹. Von B-Zellen produzierte Antikörper, als humoraler Bestandteil des adaptiven Immunsystems, ermöglichen vereinfacht wiederum eine schnelle Abwehrreaktion bei erneutem Antigenkontakt³⁰.

Makrophagen und deren Vorläuferzellen (Monozyten) werden zum mononukleären Phagozytensystems gezählt und sind Bestandteil des nativen Immunsystems³¹. Sie entstehen, getriggert durch Progenitorfaktoren, aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und sind mithilfe von zahlreichen Zyto- und Chemokinen in der Lage eine unspezifische Immunantwort auszulösen³¹. Dazu werden Monozyten aus dem Knochenmark rekrutiert, gelangen ins Blut und anschließend als gewebständige Makrophagen ins betreffende Zielgewebe, um dort Entzündungsreaktionen in Gang zu setzen, oder sich an hämostatischen Vorgängen zu beteiligen³¹.

Mechanismen, welche Tumorzellen dazu befähigen, körpereigenen Abwehrstrategien zu entkommen bzw. eben diese für eigene Wachstumsprozesse zu nutzen, werden in der Tumorimmunologie unter der Bezeichnung *Immunoediting* zusammengefasst^{27,30,32}. Vereinfachend beschreibt dieser Begriff, dass die Immunantwort des Körpers in Abhängigkeit des umgebenden Mikromilieus (*Microenvironment*) entweder zur Tumorprogression, oder aber zur Kontrolle des Tumorwachstums führen kann²⁷. Prinzipiell werden drei Phasen des *Immunoediting* unterschieden: Elimination, Equilibrium und Escape. Die erste Phase wird vor allem durch die zuvor beschriebene adäquate Immunreaktion des Körpers gekennzeichnet. In kolorektalen Karzinomen konnte eindrücklich gezeigt werden, dass ein vermehrtes Vorkommen der zytotoxischen CD8+T-Zellen, als Bestandteile des adaptiven Immunsystems, zu einem besseren Überleben der Patienten führte, indem sie über die Freisetzung von Zytokinen und inflammatorischen Pathomechanismen für eine Eliminierung maligner Zellen sorgen^{33 34}. Erfolgt diese Eliminierung der körperfremden oder transformierten Zellen unvollständig, treten die persistierenden Zellen in die zweite Phase, das Equilibrium, ein. Dabei ist der Körper mithilfe immunpotenter Zellen und zahlreicher Zytokine und Interferone, trotz ausbleibender Eliminierung dieser fremdartigen Zellen, noch in der Lage, eine Proliferation dieser zu unterdrücken. Versagen auch diese Mechanismen, kommt es zum Escape, in der die bösartigen Zellen der Immunabwehr entkommen und zum Wachstum angeregt werden (siehe Abbildung 2)²⁷.

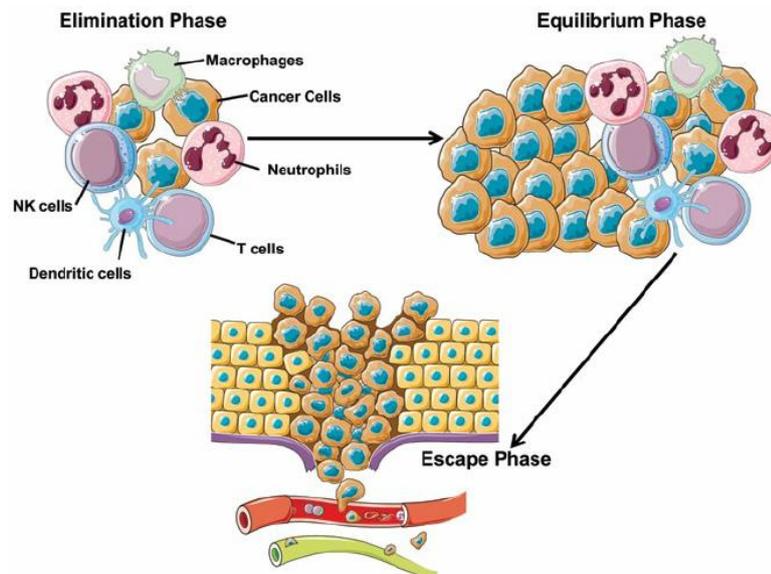


Abbildung 2: Phasen des Immunoediting von Tumorzellen

Zellen des innaten Immunsystems, wie natürliche Killerzellen (NK Zellen), dendritische Zellen und Makrophagen wirken als antigenpräsentierende Zellen und induzieren zusammen mit Zellen des adaptiven Immunsystems proinflammatorische und apoptotische Prozesse, um die Tumorzellen zu eliminieren. In der Phase des Equilibriums entkommen die Tumorzellen diesen Abwehrmechanismen. Dabei sind die Immunzellen noch in der Lage die Tumorzellenproliferation auf der lokalen Ebene zu begrenzen. Versagt auch dieser Mechanismus, kommt es zur Escapephase, in der die Migration und Invasion der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße erfolgt.

Garg, A. D., Krysko, D. V., Golab, J., Vandenabeele, P. & Agostinis, P. in Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease, edited by P. Agostinis & S. Afshin (Springer Netherlands, Dordrecht, 2012), pp. 413–428.; Copyright-Lizenznummer: 4437550660591

Aufgrund dieser Theorie und der bahnbrechenden Ergebnisse verschiedener Forschungsarbeiten, leisten immuntherapeutische Ansätze zur Bekämpfung dieser Tumor-Escape-Mechanismen einen wesentlichen Beitrag zur modernen Antitumortherapie ³⁶. Gegenstand aktueller Forschung ist es demnach den Einfluss tumor-infiltrierender Immunzellen innerhalb von soliden Tumorgeweben verschiedener Entitäten zu erforschen, und gezielte Immun-Checkpoint Inhibitoren zu entwerfen. Es zeigt sich jedoch schon jetzt, dass die einzelnen Funktionen der Immunzellen innerhalb verschiedener Tumorentitäten erheblich variieren und maßgeblich vom Microenvironment abhängig sind.

1.2.1.1. Tumor-infiltrierende Makrophagen

Ein zentraler Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von tumor-infiltrierenden Makrophagen (TAMs) und deren Bedeutung für die Progression von Pankreas- und distalen Gallengangskarzinomen.

TAMs weisen abhängig vom umgebenden Mikromilieu eine starke Heterogenität auf. Das Glykoprotein CD68 gilt dabei als ein Oberflächen-Panmarker für Makrophagen und dient zur Identifikation tumor-assoziiertes Makrophagen ^{16,37,38}. Weitere Oberflächenmoleküle ermöglichen eine immunhistologische Subdifferenzierung unterschiedlicher Makrophagensubtypen. Während M1-Makrophagen (z.B. HLA-DR+Makrophagen) proinflammatorische und zytotoxische Eigenschaften besitzen, supprimieren die tumorfördernden M2-Makrophagen das adaptive Immunsystem und sezernieren Wachstumsfaktoren zur Angiogenese (siehe Abbildung 3) ^{16,39,40}.

CD163 gehört zur Gruppe der cystein-reichen Scavenger Rezeptoren der Gruppe B (SRCR-B) und gilt als spezifischer Oberflächenmarker von reifen gewebsständigen Makrophagen, insbesondere mit M2-phänotypischer Ausprägung ⁴¹. Welcher Makrophagensubtyp im Gewebe dominiert, ist abhängig vom umgebenden *Tumor-Microenvironment*. Während unter anderem Interleukin-1 (IL-1), IL-12 und der Tumornekrosefaktor (TNF) mit der Ausprägung von M1-Makrophagen assoziiert sind, werden M2-Makrophagen vorrangig durch IL-4, IL-10, IL-13 und apoptotischen Zellen aktiviert ^{39,40}. Wichtig ist dabei, dass ein Übergang von einem in den anderen Makrophagen-Phänotyp jederzeit möglich ist, und es sich somit um ein dynamisches Konstrukt handelt, welches auch *reprogramming* genannt wird ³⁹.

Diese Zuordnung der distinkten Funktionen spiegelt sich in der Rolle tumor-assoziiertes Makrophagen wieder. Dabei werden vorwiegend M2-phänotypische Makrophagen mit tumorprogressiven Eigenschaften und einem daraus resultierenden negativen Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten in Verbindung gebracht ⁴². So konnte unter anderem innerhalb der Tumorgewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinomen eine erhöhte Expression der M2-Makrophagen (CD163+TAMs) mit einem schlechteren klinischen Outcome korreliert werden ⁴⁰. Auch im Gewebe von Patienten mit invasivem Mammakarzinom und Hodgkin-Lymphomen konnte dies bestätigt werden ^{43,44}. Im Gegensatz dazu wies eine Arbeit von Ohri et al. ⁴⁵ im Gewebe von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen nach, dass Patienten mit einem längeren Gesamtüberleben, eine stärkere Ausprägung von M1- als M2-phänotypischen TAMs in Nachbarschaft der Tumorzellen zeigten. Dabei gehen sie davon aus, dass dies insbesondere auf den zytotoxischen Effekt dieser Zellen zurückzuführen ist. Trotz zahlreicher experimenteller Arbeit auf diesem Gebiet, ist für Tumore der distalen Gallengänge dahingehend noch wenig bekannt ⁴⁶. Der negative Einfluss

von Tumor-assoziierten Makrophagen auf das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden ^{47,48}.

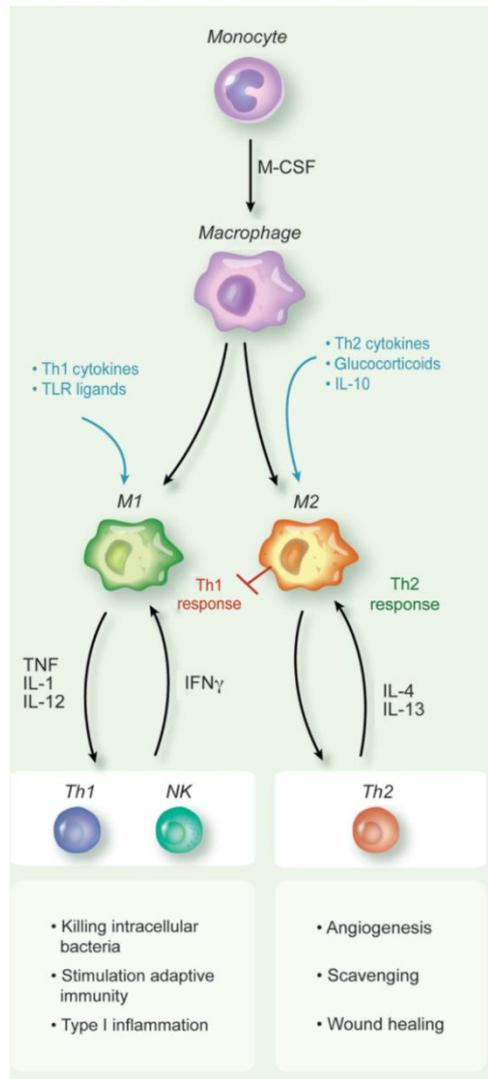


Abbildung 3: Differenzierung und Funktion von Makrophagen-Subtypen

Monozyten sind in der Lage sich mithilfe des Monozytenkolonien-stimulierenden Faktors (M-CSF) zu gewebständigen Makrophagen zu entwickeln. Abhängig von bestimmten Zytokinen, sowie Glukokortikoiden und Interleukinen (z.B. IL-10) bilden diese anschließend den M1 oder M2 Phänotypen aus. Aufgrund der Aktivierung verschiedener Interleukine und Interferone (z.B. IFN gamma) und dem Tumornekrosefaktor (TNF) sind beide Phänotypen in der Lage, unterschiedliche Funktionen auszuüben. Während M1-Makrophagen zytotoxische Th1-Reaktionen und antigenpräsentierende Zellen (z.B. NK-Zellen) aktivieren und damit vor allem Entzündungsreaktionen und Zelltod initiieren, sorgen M2-Makrophagen mithilfe von anderen Immunzellen für Wundheilung und Angiogenese.

Allavena, P. & Mantovani, A. *Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. Clinical and experimental immunology* **167**, 195–205; 10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x (2012), Copyright-Lizenznummer: 4437551064375

1.2.1.2. Der Begriff Immune contexture

Die Funktionen und der Einfluss von Immunzellen auf die Progression einer Tumorerkrankung ist zentraler Bestandteil aktueller Forschung. Fridman und Galon prägten ergänzend dazu den Begriff des *Immune contexture* ⁴⁹. Sie gingen davon aus, dass eine differenzierte Untersuchung eben nicht nur der Zellarten und deren Funktionszuständen in Abhängigkeit des umgebenden *Microenvironments*, sondern auch die Lokalisation der Immunzellen innerhalb des Tumorgewebes maßgeblichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung hat. So können sich Makrophagen im Bereich des Tumorzentrums (*Tumorcore*, TCA), also im Stromabereich des Tumors befinden, oder aber innerhalb der Tumordinfiltrationsfront (TIF), also dem Bereich, in dem Tumorgewebe an Normalgewebe grenzt ⁴⁹. Für die Untersuchung des Einflusses tumor-infiltrierender Lymphozyten und tumor-assoziierten Makrophagen in beispielsweise kolorektalen Karzinomen wurde dies bereits angewandt ^{50,51}. Dabei konnte gezeigt werden, dass das vermehrte Auftreten der Immunzellen im Bereich der Tumordinfiltrationszone einen positiven Effekt auf das Überleben der Patienten besitzt. Bedenkt man nun, dass die Datenlage bezüglich des tumorsuppressiven oder –progressiven Einflusses von Makrophagen auf Tumore nicht einheitlich ist, liegt der Verdacht nahe, dass die zusätzliche Einbeziehung der Lokalisation dieser Zellen bei der immunhistologischen Evaluierung von Tumorgewebe differenziertere Betrachtungen dahingehend ermöglicht. Im Rahmen dieses Projektes soll dies für verschiedene Makrophagensubtypen in Pankreas- und distalen Gallengangskarzinomen erstmals erfolgen.

1.2.2. Neoangiogenese und deren Verbindung zur Tumorummunologie

Die Neoangiogenese (auch *inducing angiogenesis*), als ein weiterer *Hallmark of Cancer*, spielt neben der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem ebenfalls eine wesentliche Rolle für das Tumorwachstum ²⁸. Um die Vaskularisierung und Angiogenese von Geweben zu regulieren, gibt es pro- und anti-angiogenetische Signalwege, welche sich im gesunden Zustand im Gleichgewicht befinden ²⁸. So sorgen proangiogenetische Faktoren, wie der *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A), *fibroblast growth factor 1 und 2*

(FGF-1 und -2), *platelet-derived growth factor B und C* (PDGF-B und -C) und die Angiopoietine 1 und 2 (ANG 1 und 2) für die Aktivierung von Endothelzellen und die Bildung neuer Blutgefäße⁵². Inhibitoren, wie Thrombospondin-1, Interferon alpha und beta, hemmen diese Prozesse und verhindern so eine Hypervaskularisierung des Gewebes⁵². Tumorzellen sind in der Lage dieses Gleichgewicht zugunsten der proangiogenetischen Faktoren insbesondere über die Bildung von ANG 1 und 2- zu verschieben⁵³. Dies resultiert in einer suffizienten Blut- bzw. Sauerstoffzufuhr der Zellen und fördert die Tumorprogression⁵⁴. Dieser Prozess wird auch *Angiogenetic switch* genannt⁵⁴. Die Ausschüttung dieser Faktoren kann einerseits direkt von Tumorzellen, oder aber von im *Microenvironment* befindlichen Zellen, wie Fibroblasten, oder Immunzellen erfolgen⁵². Die Immunzellen, die diese angiogenese-fördernden Eigenschaften besitzen, sind Monozyten und Makrophagen. Monozyten unterscheidet man prinzipiell zwischen klassischen und nicht-klassischen Monozyten sowie einer Intermediärform, je nach Ausprägung der Oberflächenmarker CD14 und CD16⁵⁵. Nach einer Studie von Matsubara et al exprimieren ca. 20% der Monozyten und dabei insbesondere die Intermediärform dieser (CD14⁺⁺/CD16⁺) den Tyrosinkinase-Rezeptor mit Ig und EGF-Domäne 2 (Tie-2)⁵⁵. Dieser Rezeptor ist ein auch auf Endothelzellen und Tumorzellen exprimierter Membranrezeptor, dessen natürliche Liganden Angiopoietin 1 (ANG 1) und 2 (ANG 2) sind. ANG 1 wird insbesondere von perivaskulären Zellen, wie Perizyten und glatten Muskelzellen sezerniert und sorgt für die Ausreifung von Endothelzellen⁵⁶. ANG 2 gilt als Antagonist von ANG 1, indem es vor allem von Endothelzellen im aktivierten Zustand freigesetzt wird und dabei zusammen mit anderen Mediatoren, wie VEGF eine wichtige Rolle in tumorpromovierenden Prozessen spielt⁵⁶. In experimentellen Arbeiten konnte bereits eine Überexpression von ANG 2 und eine verstärkte Interaktion mit Tie-2, verglichen mit der von ANG 1 und seinem Rezeptor, in Tumorgewebe nachgewiesen werden⁵⁶. In Ergänzung dazu, konnte im Gewebe von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom eine Korrelation zwischen Tie2-exprimierenden Monozyten/Makrophagen (TEMs) und einer erhöhten Dichte an Blutgefäßen gezeigt werden⁵⁵. Ein Marker zur Quantifizierung dieser Dichte ist CD 31, welcher insbesondere auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Demnach wird aktuell davon ausgegangen, dass die vermehrte Sekretion von ANG 2 aus aktivierten Endothelzellen innerhalb des Tumors zur Stimulation von TEMs führt und so über deren proangiogenetische Funktionen die Tumorprogression fördert^{56,57}. Dahingehende Erkenntnisse zum Pankreas- und Gallengangskarzinome, sind bis dato noch ausstehend.

1.2.3. Aktueller Stand der Forschung

Aktuelle Studien von Patienten mit Adenokarzinomen des Pankreas (PDAC) deuten an, dass eine verstärkte Präsenz von M2- Makrophagen einen negativen prognostischen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben besitzt ^{46,47,48,58}. Inwieweit TEMs im Tumor von duktalem Adenokarzinomen vorhanden sind, und welche prognostische Bedeutung diese Zellen und Angiopoietine haben, ist im Gegensatz zur Rolle der TAMs noch wenig erforscht. Aufgrund wissenschaftlicher Arbeiten mit orthotopen PDAC-Xenograft-Modellen liegt derzeit die Vermutung nahe, dass eine Korrelation zwischen der Expressionsrate von Angiopoietinen und der Gefäßneubildung, sowie der lymphogenen Metastasierung im Tumor besteht ⁵⁹. Eine Untersuchung dieses potentiellen Zusammenhangs in humanen PDAC-Gewebeproben wurde unserer Kenntnis nach bisher nicht durchgeführt. Zu klären bleibt außerdem, ob eine Abhängigkeit zwischen der Dichte der M2-Makrophagen und dem Vorhandensein von TEMs besteht.

Die Datenlage zur Untersuchung des prognostischen Einflusses der Makrophagendichte und deren Lokalisation im Tumor in distalen Cholangiokarzinomen (dCCA) ist bislang noch ungeklärt ^{46,60}. Im Gewebe von intrahepatischen und extrahepatischen Cholangiokarzinomen zeigten Patienten mit einer hohen M2-Makrophagendichte ein kürzeres rezidivfreies und Gesamtüberleben ^{46,61}. Es ist anzunehmen, dass TAMs das Tumor *Microenvironment* zugunsten der Tumorprogression verändern, und so zu einer erhöhten Metastasierungsrate beitragen ²¹. Unterschiede im Hinblick auf die Lokalisation der Immunzellen wurden dabei nicht untersucht. Im Gegensatz dazu wurde in Gewebeproben von perihilären Cholangiokarzinomen ein positiver Effekt einer erhöhten TEM-Dichte auf das rezidivfreie Überleben nachgewiesen ⁶². Die Autoren nahmen an, dass dies vor allem auf die Assoziation mit der durch ANG 1 getriggerten Gefäßstabilisierung und der damit reduzierten Metastasierungsrate innerhalb der untersuchten Population zurückzuführen ist ⁶². Weitere Untersuchungen sind demnach zur Klärung der Rolle dieser Makrophagensubtypen im Gewebe von Pankreas- und Gallengangskarzinom nötig.

2. Aufgabenstellung

Ziel des vorliegenden Projektes ist es, die prognostische Bedeutung von Angiopoietinen und tumorinfiltrierenden Zellen des mononukleären Phagozytensystems bei insgesamt 149 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas bzw. distalem Gallengangskarzinom anhand immunhistochemischer Charakterisierung zu untersuchen. Dabei soll geklärt werden, inwieweit die Lokalisation dieser Zellen in den Tumorresektaten einen möglichen Einfluss auf klinisch-pathohistologische Parameter, wie das Patientenüberleben, Tumorstadium, Metastasierung und Rezidivraten hat.

Folgende Fragen sollen für das untersuchte Patientenkollektiv beantwortet werden:

- Welche Bedeutung hat die Präsenz der M2-Makrophagen, CD68-positiven Tumor-assoziierten Makrophagen (CD68+TAMs) und Tie-2-exprimierenden Makrophagen (TEMs) im Tumor auf das Gesamt- und rezidivfreie Überleben der Patienten mit Pankreas- bzw. Gallengangskarzinom?
- Besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten dieser Makrophagensubtypen und der Metastasierungsrate der Tumore?
- Inwieweit lässt sich zwischen der Ausprägung von Tie-2-exprimierenden Makrophagen und Angiopoietinen ein Zusammenhang mit der Tumorprogression und der Angiogenese in den beiden Entitäten feststellen?
- Hat die unterschiedliche Lokalisation dieser Zellen innerhalb des Tumors (im Tumorzentrum oder innerhalb der Tumorinvasionsfront) eine Relevanz für das klinische Outcome der Patienten?

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Tumorresektate

Die vorliegende Studie umfasste Tumorgewebebeurteilungen von 149 Patienten. 106 dieser Patienten wiesen ein histologisch gesichertes duktales Adenokarzinom des Pankreas auf, während 43 Patienten ein distales Cholangiokarzinom präsentierten. Die Verwendung der histologischen Proben und die Erfassung der zugehörigen Daten der Patienten, wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät an der Universität Leipzig genehmigt (AZ: 234-14-14072014). Die chirurgische Resektion des Tumorgewebes erfolgte zwischen 2001 und 2013 in der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie im Universitätsklinikum Leipzig. Die in Paraffin gebetteten Tumorproben wurden vom Institut für Pathologie der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. Der Prozess der Beurteilung der verwendeten Tumorresektate wurde durch einen unabhängigen Pathologen, ohne Kenntnisse klinischer Parameter, supervidiert. Die klinischen Daten wurden aus den Patientenakten des Universitätsklinikums rekrutiert und in einer Datenbank erfasst. Endpunkt der Datenerfassung war der 31. September 2015.

3.2. Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien waren zur Bearbeitung des Untersuchungsguts notwendig:

Bezeichnung	Quelle
Glasküvetten	NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Glasspatel	Bochem, Weilburg, Deutschland
Kunststoff-Inkubationskammer	BraPlast, Bergheim, Deutschland
Messzylinder, diverse Größen	Steiner GmbH, Siegen Eiserfeld, Deutschland
Mikrotommesser MX 35 Premier	ThermoScientific, Massachusetts, USA
Objekträger/ Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Objekträgerhalter	NeoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Pinzette	Bochem, Weilburg, Deutschland
Pipette, diverse Größen	Gilson, Wisconsin, USA
Pipettenspitze, diverse Größen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, diverse Größen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien

3.3. Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen der Arbeit genutzt:

Bezeichnung	Quelle
Kühlschrank (+4 und -24°C)	
Lichtmikroskop (Axio Imager.A1)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer (0302849)	Variomag, Florida, USA
Mikrotom (HM 355S)	ThermoScientific, Massachusetts, USA
pH-Meter (pH Level 1)	InoLab, Weilheim, Deutschland
Schnellkochtopf (Stainless 18-10)	Fissler, Idar-Oberstein, Deutschland
Vortex (98368)	UniEquip, Planegg, Deutschland
Wärmebad (Typ 1052)	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wärmeschrank (bis 65°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 2 Verwendete Geräte

3.4. Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Reagenzien sowie Chemikalien-Zusammensetzungen verwendet:

Chemikalien	Hersteller
Ethanol 100%	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, DE
Eosin 1% wässrig	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, DE
Hämalaun	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, DE
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mountex, Eindeckelmedium	Mediate, Orlando, Florida, USA
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, PA, USA
PBS-Lösung:	
Aqua dest, 2 l	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-heptahydrat, 23,1 g	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumchlorid, 4 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, 3,8 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid, 160 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TBS-Lösung:	
Aqua dest, 2 l	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid, 4 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, 160g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 60,6 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citratpufferlösung (pH 6,0)	
Aqua dest, 1 l	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat, 14,7 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure,, 9,6 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris/EDTA Pufferlösung (pH 9,0)	
Aqua dest, 1 l	B. Braun, Melsungen, Deutschland
EDTA, 3,72 g	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 12,11 g	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Weitere Reagenzien:	
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Levamisol (SP-5000)	Vector Lab., Eching, Deutschland
Biotin Blocking System (X0590)	Dako, Glostrup Dänemark
ImmPACT DAB Peroxidase Substrat (K3468)	Dako, Glostrup, Dänemark
Vector Red Alkaline Phosphatase Substrat (SK-5100)	Vector Lab., Eching, Deutschland

Tabelle 3 Verwendete Chemikalien

3.5. Antikörper

Antikörper	Klon	Spezies	Bestellnr.	Quelle	Verdünnung	Substrat	Sekundärantikörper	Bestellnr.	Quelle
ANG-1	N-18	Ziege	sc-6319	Santa Cruz, Dallas, USA	1:50	DAB	Polyclonal Rabbit Anti-Goat-Ig (1:400)	E046601	Dako, Golstrup
							Streptavidinperoxidase -HRP	K0675	Dako, Golstrup
ANG-2	N-18	Ziege	sc-7016	Santa Cruz, Dallas, USA	1:100	DAB	Polyclonal Rabbit Anti-Goat-Ig (1:400)	E046601	Dako, Golstrup
							Streptavidinperoxidase -HRP	K0675	Dako, Golstrup
CD14		Kaninchen	HPA0018 87 100UL	Sigma Aldrich, Steinheim	1:200	Vector Red AP	Anti-Rabbit-Ig Reagent AP	VEC- MP5401	Vector Lab.Eching
CD31	JC70 A	Maus	IR61061	Dako, Glostrup, Dänemark	1:2	DAB	Anti-Mouse-Ig Reagent Peroxidase	VEC- MP7402- 50	Vector Lab.Eching
CD68	PG- M1	Maus	M0876	Dako, Glostrup, Dänemark	1:100	DAB	Anti-Mouse-Ig Reagent Peroxidase	VEC- MP7402- 50	Vector Lab.Eching
CD163	10D6	Maus	NCL-L- CD163	Leica Biosystems , Nussloch	1:200	DAB	Anti-Mouse-Ig Reagent Peroxidase	VEC- MP7402- 50	Vector Lab.Eching
Tie-2		Ziege	AF313	R&D Sys, Minneapolis, USA	1:160	DAB	Anti-Goat-Ig Reagent Peroxidase	VEC- MP7405- 50	Vector Lab.,Eching

Tabelle 4 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und deren Charakteristika

3.6. Immunhistochemie

3.6.1. Probenaufbereitung

Die immunhistochemische Färbung (IHC) dient zur Detektion bestimmter Zell- und Gewebeanlagen durch die Bildung von Antigen-Primärantikörper-Komplexen. Nach Erfassung aller relevanten klinisch-pathologischen Daten des Patientenkollektivs wurden die mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbten Schnitte der in Paraffin gebetteten Tumorresektate aus dem Sektionsarchiv zusammengestellt. In freundlicher Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie lichtmikroskopisch wurde die Schnitte auf gute Darstellbarkeit der Tumorphistologie und das Vorhandensein einer Tumordinfiltrationszone untersucht. Mithilfe eines Schlittenmikrotoms (HM 355S, ThermoScientific) wurden pro Gewebekblock jeweils 21 Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und in einem Wärmebad (GFL, Typ 1052) mit destilliertem Wasser bei 50°C gestreckt. Jeder Schnitt wurde auf einem Objektträger (ThermoScientific Superfrost+) fixiert, beschriftet und anschließend für 24 Stunden im Wärmeschrank (Heraeus Instruments) bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde das die Gewebeprobe umgebende Paraffin bei 65°C für 10 Minuten geschmolzen. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte mit Xylol, während die absteigende Alkoholreihe daraufhin zur Rehydrierung des Gewebes diente. Zur immunhistochemischen Charakterisierung der Gewebeprobe wurden die PAP/APAAP- und LSAB-Methode verwendet, welche im Folgenden erläutert werden.

3.6.2. Nachweismethoden der immunhistochemischen Färbung

Bei der PAP/APAAP-Methode bindet ein enzym-gekoppelter Sekundärantikörper an den Antigen-Antikörper-Komplex. Voraussetzung dafür ist, dass Primär- und Sekundärantikörper derselben Spezies entstammen. Bei dem Enzym-Polymer handelt es sich entweder um eine Merrettich-Peroxidase (PAP-Methode) oder der Alkalischen Phosphatase (APAAP-Methode). Durch Zugabe einer chromogenen Komponente, wie beispielsweise 3'3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) wird diese Enzym-Substrat-Reaktion anhand eines Farbumschlags dargestellt und somit die Primärantikörperbindung am Zielgewebe indirekt visualisiert ⁶³. Um zwei Zellantigene in einem Gewebeschnitt darstellen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit beide Enzym-Polymere mit zwei verschiedenen Detektionssystemen verwendet, DAB und Vector® Red.

Die Labelled (Strep-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB) basiert auf einer spezifischen und irreversiblen Bindung zwischen dem tetrameren Protein Streptavidin und Biotin. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet auch hier an dem Antigen-Antikörper-Komplex. Das Streptavidin ist an der Merrettich-Peroxidase gekoppelt und dient so bei Zugabe des Chromogens zur indirekten Visualisierung des Zellantigens. Durch die starke Interaktion des nicht-glykolysierten Streptavidins mit Biotin wird bei einem neutralen pH-Wert eine geringere Hintergrundfärbung und somit eine bessere Sichtbarmachung des Zielantigens in einer Gewebeprobe gewährleistet⁶³.

3.6.3. Durchführung der Färbung

Zur Unterscheidung der Makrophagenpopulationen wurden spezifische Oberflächenproteine anhand der Färbungen mit den Primärantikörpern CD68, CD163 nach der PAP-, sowie CD14 und Tie-2 nach der APAAP-Methode visualisiert. Die Antigen-Demaskierung der Schnitte erfolgte in einer Inkubationskammer mit vorgewärmter Citratpuffer- (pH 6,0) oder Tris/EDTA-Lösung (pH 9,0) bei 120°C im Schnellkochtopf (SKT). Das anschließende Waschen der abgekühlten Gewebeproben vermied unspezifische Hintergrundfärbungen. Zudem wurde die endogene Peroxidase durch Hinzufügen von 3%iger H₂O₂-Lösung und Inkubation bei 4°C blockiert. Die Beimpfung der Gewebeproben mit einem Ready-to-Use 2,5%igem Normal Horse Serum bei Raumtemperatur diente zur Ergänzung dieser Blockierung. Der spezifische Primärantikörper wurde daraufhin mit einer zuvor optimierten Verdünnung (siehe Tabelle 6) auf die Gewebeproben pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Entfernung der überschüssigen Lösung erfolgte durch mehrere Waschdurchgänge. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden anhand des Polymer gekoppelten spezifischen Sekundärantikörper markiert und nach erneutem Waschen durch Zugabe des chromogenen Substrats mithilfe einer enzymatisch vermittelten Farbreaktion visualisiert. Unter lichtmikroskopischer Sichtkontrolle wurde diese Reaktion nach Ausprägung einer optimalen Farbintensität (meist nach ca. 1 Minute) in destilliertem Wasser gestoppt. Die Schnitte wurden mit der Mayerschen Hämalaun-Lösung gegengefärbt, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit dem Eindeckmedium (Mountex, Medite) abgedeckt. Bei sämtlichen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen der Gewebeproben wurden stets Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Die folgende Tabelle soll eine Übersicht über das Durchführungsprotokoll mit den entsprechenden Zeiten geben, wie es für die Färbungen mit CD68, CD163, und CD31 angewendet wurde.

Arbeitsschritt	Inkubationszeit
1. Antigen-Demaskierung im SKT + Abkühlen	10 min + 45 min
2. Waschen mit PBS-Tween20 (0,05%)-Lösung	3 x 2,5 min
3. Peroxidase-Reaktion mit 3%iger H ₂ O ₂ -Lösung	20 min
4. Waschen mit PBS-Tween20 (0,05%)-Lösung	3 x 2,5 min
5. 2,5% Normal Horse Serum	20 min
6. Primärantikörper (siehe Tabelle 1.5.)	12 Stunden
7. Waschen mit PBS-Tween20 (0,05%)-Lösung	3 x 2,5 min
8. Polymer gekoppelter Sekundärantikörper	30 min
9. Waschen mit PBS-Lösung	3 x 2,5 min
10. Substrat-Chromogen-Lösung	Unter Sicht 1-5 min
11. Stoppen der enzymatischen Reaktion in Aqua	2 x 2 min
12. Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung	6 min
13. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol	6 x 3 min
14. Eindecken mit Mountex	

Tabelle 5 Durchführungsprotokoll der Färbung mit PAP-Methode

Die immunhistochemische Doppelfärbung mit CD14 und dem endothelialen Membranrezeptor Tie-2 erfolgte im Wesentlichen wie im oben beschriebenen Durchführungsprotokoll dargestellt. Um beide Antigene in einer Gewebeprobe zu markieren, schloss sich nach der Zugabe des Substrat-Chromogens (DAB) und dem Stoppen der enzymatischen Reaktion ein erneuter Färbedurchgang, der mit der Blockierung der unspezifischen Bindungen durch das 2,5%ige Normal Horse Serum erfolgte, an. In diesem zweiten Durchgang ist der Sekundärantikörper an eine alkalische Phosphatase (APAAP-Methode) gebunden. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch das Vector Red Alkaline Phosphatase Substrat Kit (SK-5100) visualisiert und wies so einen magenta-roten Farbniederschlag auf. Aufgrund der starken Autofluoreszenz des Tumorgewebes in den Patientenproben ließ sich diese Doppelmarkierung in der Immunfluoreszenz nicht darstellen, weshalb wir auch diese Färbung immunhistochemisch durchführten. Aufgrund der Anwendung eines Avidin-Biotin-IHC-Verfahrens zur Sichtbarmachung von ANG 1 und ANG

2, musste nach dem Peroxidase-Block auch die Blockierung des ubiquitär vorhandenen endogenen Biotins durchgeführt werden. Dies erfolgte mittels des Biotin Blocking Systems gemäß der Anwendungsempfehlung des Herstellers. Die Schnitte wurden zunächst für 10 Minuten mit Avidin inkubiert, welches die Bindungsstellen an endogenem Biotin besetzt und somit die Avidinbindungsaktivität unterdrückt. Durch die Zugabe von unkonjugiertem Biotin für weitere 10 Minuten wurde eine noch vorhandene Restaktivität blockiert. Nach einem Waschschrift erfolgte dann die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen und der polyklonale biotinylierte Kaninchen Anti-Ziege auf die Gewebeprobe für 1 Stunde inkubiert und ermöglichte so als Brückenantikörper nach einer Inkubation von 20 Minuten die Bindung der Streptavidinkonjugierten Merrettich-Peroxidase an das jeweilige Angiopoietin. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

3.6.4. Immunhistochemische Auswertung und Bildung von Patientengruppen

Eine immunhistochemische Evaluierung aller Gewebeproben erfolgte im Hinblick auf die Expression von CD68, CD163, CD14/Tie-2, ANG 1, ANG 2 und CD31 als spezifische Zellmarker. Auf diese Weise konnten spezifische Makrophagenpopulationen und Angiogenesefaktoren innerhalb der Tumorsektate detektiert und deren Expressionsrate und Lokalisation untersucht werden. Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte im Anschluss semiquantitativ ⁴⁰. In Zusammenschau mit den Hämatoxilin-Eosin-Übersichtsfärbungen wurden, wie bereits zuvor etabliert ^{37,40}, lichtmikroskopisch 3 Hotspots, also Bereiche mit einer erhöhten Farbintensität, ausgewählt. Der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an den Tumor-Stromazellen wurde in der 200fachen Vergrößerung im Anschluss unabhängig voneinander, sowohl im Bereich des Tumorzentrums, als auch innerhalb der Tumordinfiltrationszone, also dem Bereich in dem gesundes Gewebe an infiltratives Tumorgewebe angrenzt, geschätzt und der Mittelwert gebildet. Die ermittelten Werte der immunhistochemischen Färbung wurden zur statistischen Auswertung in zwei Gruppen unterteilt, wobei der Cut-Off-Wert bei 5% lag: Gewebeproben mit mehr als 5% gefärbten Zellen im Gesichtsfeld, zeigten ein starkes Vorhandensein von TAMs (CD163+), CD68+ Makrophagen, TEMs (CD14/Tie-2 +), sowie von Angiopoietinen. Demnach wurden je Stärke der Ausprägung in der Färbung folgende Patientengruppen unterschieden: CD163+TAMs⁺/CD163+TAMs⁻, CD68+TAMs⁺/CD68+TAMs⁻, TEMs⁺/TEMs⁻ und ANG 1,2^{HIGH} /ANG 1,2^{LOW} (siehe Tabelle 6).

Eine weitere Differenzierung erfolgte nach der Lokalisation dieser Expression, im Tumorzentrum oder innerhalb der Tumorinvasionsfront. Zu beachten ist hierbei, dass nur in 82 von 106 PDAC-Resektaten bzw in 35 von 43 dCCA-Resektaten Normalgewebe angeschnitten war und so nicht für alle Patienten eine Evaluierung der Tumorinvasionsfront erfolgen konnte (siehe Tabelle 6 und 7). Bei jedem Färbegang wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Sobald diese unspezifische Färbungen zeigten, wurde der Färbegang wiederholt. Die Auswertung der Doppelmarkierung (CD14 und Tie-2) erfolgte bei 400facher Vergrößerung. Die intratumorale Gefäßdichte in CD31-positiv gefärbten Schnitten wurde, wie bereits in vorherigen Arbeiten etabliert, in 10 mikroskopischen Gesichtsfeldern bei einer 200fachen Vergrößerung bestimmt ⁶⁴⁻⁶⁶. In dem Areal mit der höchsten Dichte wurden anschließend die positiv gefärbten Gefäße gezählt. Als Gefäß wurden alle gefärbten Zellverbände mit einem Lumen definiert ⁶⁴⁻⁶⁶. Bei einer Gefäßanzahl über 50 in einem mikroskopischen Gesichtsfeld, wurde von einer hohen Gefäßdichte (MVD^{HIGH}) ausgegangen (siehe Tabelle 6). Während der Auswertung hatten die Untersucher keinerlei Kenntnis zu den pathohistologischen Daten der Patienten.

Antigen	Funktion	Lokalisation im Tumor	Zuteilung Patientengruppen nach der immunhistochemischen Expressionsrate (Cut-Off bei 5%; für CD31 bei 50%)	
			PDAC n=106; (für TIF n=82)	
Angiopietin 1	Angiogenesefaktor in Tumorzellen	Tumorzentrum (TCA)	ANG 1 ^{HIGH} n= 39	ANG 1 ^{LOW} n= 67
Angiopietin 2	Angiogenesefaktor in Tumorzellen	Tumorzentrum (TCA)	ANG 2 ^{HIGH} n= 26	ANG 2 ^{LOW} n= 80
CD14/Tie-2	Detektion Tie-2-exprimierender Makrophagen im Tumorgewebe	Tumorzentrum (TCA)	Präsenz TEMs (TEMs ⁺) n= 99	Präsenz TEMs (TEMs ⁻) n= 7
CD 31	Quantifizierung der Gefäßdichte	Gesichtsfeld mit stärkster Gefäßinfiltration	MVD ^{HIGH} n= 69	MVD ^{LOW} n= 37
CD 68	Detektion Tumor-assoziiierter Makrophagen	Tumorinvasionsfront (TIF)	CD68+TAMs ⁺ n= 73	CD68+TAMs ⁻ n= 9
CD 163	Detektion M2-phänotypischer Makrophagen	Tumorinvasionsfront (TIF)	CD163+TAMs ⁺ n= 23	CD163+TAMs ⁻ n=59

Tabelle 6 Einteilung der Patientengruppen mit Pankreaskarzinom (PDAC)

Atanasov, G., Pötner, C. et al. TIE2-expressing monocytes and M2-polarized macrophages impact survival and correlate with angiogenesis in adenocarcinoma of the pancreas. *Oncotarget* **9**, 29715–29726; 10.18632/oncotarget.25690 (2018).

Antigen	Funktion	Lokalisation im Tumor	Zuteilung Patientengruppen nach der immunhistochemischen Expressionsrate (Cut-Off bei 5% und für CD31 bei 50%)	
dCCA n=43; (für TIF n=35)				
Angiopoietin 1	Angiogenesefaktor in Tumorzellen	Tumorzentrum (TCA)	ANG 1 ^{HIGH} n= 16	ANG 1 ^{LOW} n= 27
Angiopoietin 2	Angiogenesefaktor in Tumorzellen	Tumorzentrum (TCA)	ANG 2 ^{HIGH} n= 22	ANG 2 ^{LOW} n= 21
CD14/Tie-2	Detektion Tie-2-exprimierender Makrophagen im Tumorgewebe	Tumorzentrum (TCA)	Präsenz TEMs (TEMs ⁺) n= 18	Präsenz TEMs (TEMs ⁻) n= 25
CD 31	Quantifizierung der Gefäßdichte (=MVD)	Gesichtsfeld mit stärkster Gefäßinfiltration	MVD ^{HIGH} n= 21	MVD ^{LOW} n= 22
CD 68	Detektion Tumor-assoziiertes Makrophagen (TAM)	Tumorinvasionsfront (TIF)	CD68+TAMs ⁺ n= 26	CD68+TAMs ⁻ n= 9
CD 163	Detektion M2-phänotypischer Makrophagen (TAM)	Tumorinvasionsfront (TIF)	CD163+TAMs ⁺ n= 10	CD163+TAMs ⁻ n= 25

Tabelle 7 Einteilung der Patientengruppen mit Gallengangskarzinom (dCCA)

3.7. Statistische Auswertung

Überlebensanalysen, Kaplan-Meier-Kurven und univariate Analysen zur statistischen Auswertung der Arbeiten wurden mittels SPSS (Version 23.0.0.0/ 2015) durchgeführt. Zum Vergleich einzelner Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test bzw. Wilcoxon-Test und Fisher's exact Test genutzt, während Überlebensdaten anhand von Kaplan-Meier-Kurven verglichen wurden. Variablen mit einem signifikanten Einfluss auf das Überleben der Patienten wurden in der Multivarianzanalyse weiterführend untersucht. Von signifikanten Ergebnissen wurde bei einem Niveau von $p=0,05$ ausgegangen.

4. Ergebnisse

4.1. Klinisch-pathohistologische Parameter der untersuchten Patientenpopulation

Die Tumorresektate von distalen Gallengangskarzinomen und Pankreaskarzinomen des untersuchten Patientenkollektivs zeigten in der Mehrheit der Fälle ein T3N1M0-Stadium (59,8% für PDAC bzw. 44,2% für dCCA). In der aktuellen TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms (7. Auflage) entspricht dies folgender Beschreibung: Tumorgröße von über 4 cm in der größten Ausdehnung mit einem Tumorbefall von 1 bis 3 Lymphknoten und einer fehlenden Fernmetastasierung.

Für das distale Gallengangskarzinom beschreibt das T3N1M0-Stadium eine Infiltration der Leber, Gallenblase und/oder Pankreas, aber nicht der umliegenden Gefäße, einen regionalen Lymphknotenbefall und fehlender Fernmetastasierung.

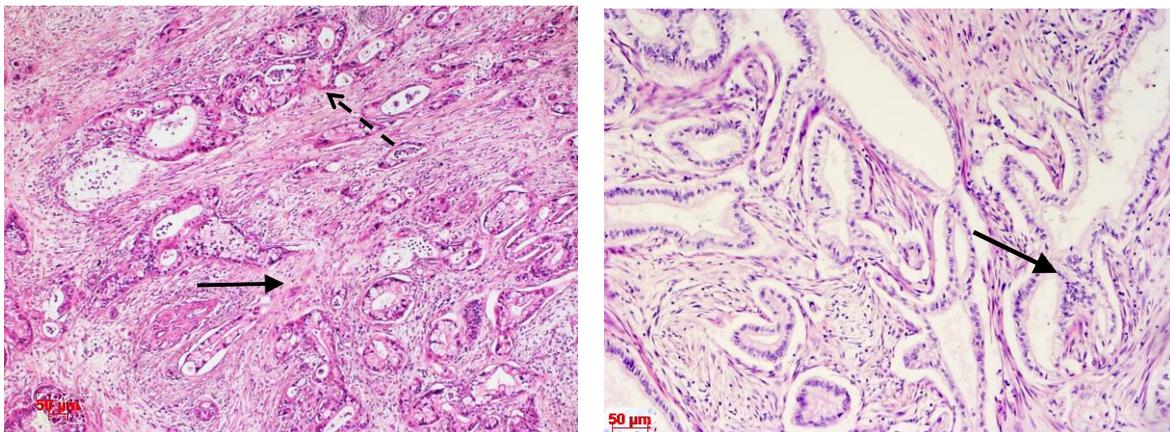


Abbildung 4 Darstellung der Histomorphologie vom Pankreas- und Gallengangskarzinom

Das typische histologische Bild beider Entitäten wird in Abbildung 4 dargestellt.

Links: Gewebeprobe einer PDAC-Patientin, Zustand nach Kausch-Whipple-OP bei T3N1M0-Stadium
Es zeigt sich die typische Histologie eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms mit gangartigen Formationen und atypischen Epithelien (gestrichelter Pfeil), sowie vermehrtem desmoplastischem Stroma (durchgängiger Pfeil)

Rechts: Gewebeprobe eines dCCA-Patienten, Zustand nach pyloruserhaltender partieller Duodenopankreatektomie bei T3N1M0-Stadium

Zu sehen ist die typische Histologie eines mäßig differenzierten Gallengangskarzinoms mit ausgeprägten Zellatypien im Bereich des erweiterten Gallengangsystems (Pfeilspitze)

Bei Patienten mit Pankreaskarzinom betrug die mediane Gesamtüberlebenszeit 39,6 Monate (26,3 -52,9 Monate), während die mediane rezidivfreie Überlebenszeit von PDAC-Patienten in dieser Kohorte 37,3 Monate (0-107,2 Monate) betrug. Die 1-, 3-, und 5-Jahresüberlebenszeit der Patienten lagen bei 81,2%, 44,9% und 41,8%.

64 der 106 Patienten (60,4%) verstarben innerhalb der Follow-Up-Zeit. Bei 52 Patienten des untersuchten PDAC-Kollektivs (49,1%) trat ein Fernrezidiv auf. Insgesamt verstarben 37,7% der Patienten an einem Tumorrezidiv. Bei 17,9% der Patienten (19/106) konnte keine durch die Tumorerkrankung bedingte Todesursache festgestellt werden.

Weiterhin konnte in den Überlebenszeitanalysen für Patienten mit distalem Gallengangskarzinom eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 26,2 Monaten (12,1-40,3 Monate) ermittelt werden. Das mediane rezidivfreie Überleben betrug 42 Monate (21,6-62,4 Monate).

Die 1-, 3-, und 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten mit dCCA fiel mit 57,1%, 14% und 7% in unserer Studie deutlich schlechter aus, als die der Patienten mit PDAC. Ein Patient erlitt während des Follow-Up-Intervalls ein Fernrezidiv, während bei 34,9% (15/43) ein Lokalrezidiv auftraten. Fernmetastasen konnten bei 11 Patienten festgestellt werden, wobei es sich in 36,3% der Fälle um Peritonealkarzinosen handelte.

In der nachfolgenden Tabelle werden wesentliche klinisch-pathologische Charakteristika der von uns untersuchten Patienten mit Pankreas- (PDAC) und distalem Gallengangskarzinom (dCCA) dargestellt.

Charakteristika	Pankreaskarzinom	Gallengangskarzinom
Anzahl Patienten	n=106 (100%)*	n=43 (100%)*
Geschlecht		
Weiblich	41 (38,7)	15 (34,9)
Männlich	65 (61,3)	28 (65,1)
Alter		
≤60 Jahre	55 (51,9)	15 (34,9)
>60 Jahre	51 (48,1)	28 (65,1)
Tumorgröße **		
T1/T2	22 (20,8)	10 (23,3)
T3/T4	84 (79,2)	33 (76,7)
Lymphknotenbefall		
Vorhanden	32 (30,2)	24 (55,8)
Nicht vorhanden	74 (69,8)	18 (41,9)
Fernmetastase		

Vorhanden	47 (44,3)	11 (25,6)
Nicht vorhanden	59 (55,7)	32 (74,4)
Lebermetastase		
Vorhanden	27 (25,5)	3 (9,1)
Nicht vorhanden	79 (74,5)	30 (90,9)
Infiltration von Lymphgefäßen		
Vorhanden	23 (21,7)	39 (90,1)
Nicht Vorhanden	83 (78,3)	3 (7,0)
Infiltration venöser Gefäße		
Vorhanden	29 (74,5)	14 (32,6)
Nicht Vorhanden	27 (25,5)	28 (65,1)
Infiltration der Perineuralscheiden		
Vorhanden	35 (33,0)	30 (69,8)
Nicht Vorhanden	71 (67,0)	5 (11,6)
R-Stadium ***		
R0	82 (77,4)	39 (90,1)
R1/R2	24 (22,6)	4 (9,3)
Grading		
Gut	4 (3,8)	0 (0,0)
Moderat/schlecht	102 (96,2)	40 (93,0)
Lokalrezidiv		
Vorhanden	20 (18,9)	15 (34,9)
Nicht vorhanden	86 (81,1)	19 (44,2)
Fernrezidiv		
Vorhanden	52 (49,1)	1 (2,3)
Nicht vorhanden	54 (50,9)	42 (97,7)

Tabelle 8 Übersicht zu klinisch-pathologischen Parametern der untersuchten Patienten

*Abweichungen von 100% sind durch fehlende Angaben in den pathohistologischen Befunden bedingt

**Beurteilung der Tumorgöße: T1= Tumorgöße bis zu 2 cm, T2= Tumorgöße >2 cm ≤ 4cm, T3= Tumorgöße >4 cm in der größten Ausdehnung, T4= Tumor infiltriert Truncus coeliacus, die Arteria mesenterica superior und/oder Arteria hepatica

***Beurteilung des operativen Resektionsrandes: R0= Entfernung des Tumors im Gesunden, R1= Residualtumor histologisch nachweisbar, R2= makroskopischer Residualtumor nachweisbar

4.2. Makrophagensubtypen und Angiogenesefaktoren im Tumorgewebe

Zur Beurteilung des „*Immune contexture*“ (siehe Abschnitt 1.2.1.2) wurde die Präsenz der Makrophagensubtypen im Bereich der Tumorinvasionsfront (TIF) und des Tumorzentrums (TCA) untersucht (siehe Abbildung 5). Die immunhistochemische Evaluierung der M2-phänotypischen Makrophagen (CD163+) und der CD68+Makrophagen zeigte insgesamt eine homogene Verteilung innerhalb des Tumorzentrums (TCA) und der Tumorinvasionsfront (TIF) beider Tumorentitäten. Lediglich drei Patienten mit PDAC präsentierten eine fehlende Ausprägung von CD163+Makrophagen im Bereich der Tumorinvasionsfront.

Bei den Tie-2-exprimierenden Makrophagen (TEMs) handelt es sich um einen besonderen Subtyp, der bisher nur in wenigen Tumorentitäten beschrieben wurde. Insgesamt konnte im Rahmen dieses Projekts festgestellt werden, dass TEMs sowohl im Pankreas-, als auch im Gallengangskarzinom vorhanden sind. Von den 149 untersuchten Tumorresektaten blieb ein immunhistochemischer Nachweis dieser Zellen bei 15,6% der PDAC-Patienten und bei 7,0% der dCCA-Patienten aus. Im Gewebe von Pankreaskarzinomen verteilten sich die TEMs gleichmäßig, demnach ohne Präferenz auf das Tumorzentrum und die Tumorinvasionsfront (75,5% in TCA vs. 68,3% in TIF). Interessanterweise zeigte sich allerdings eine vermehrte Ansammlung der TEMs⁺ insbesondere in perivaskulären Bereichen des PDAC-Resektats (siehe Abbildung 6).

Das Gewebe von Gallengangskarzinomen präsentierte insgesamt eine niedrigere Dichte von TEMs. Bei der mikroskopischen Auswertung der Schnitte fiel auf, dass sich die Zellen vor allem in Clustern organisierten und sich auch hier homogen innerhalb der beiden genannten Tumorareale verteilten (83,3% in TCA vs. 70,6% in TIF).

Wie in Abschnitt 1.2.2. bereits dargestellt, wird Tie-2 zu einem großen Anteil auch auf Endothel- und Tumorzellen exprimiert und ist maßgeblich an der Gefäßbildung im Gewebe beteiligt. Zur Quantifizierung der Neoangiogenese im Tumor erfolgte die Bestimmung der Gefäßdichte. Obwohl es sich sowohl bei Pankreas-, als auch bei Gallengangskarzinomen insgesamt um eher schlecht vaskularisierte Tumoren handelt, wiesen 65,1 % der PDAC-Resektate und 48,8% der dCCA-Resektate eine verstärkte Ausprägung von CD31 und damit einen hohen Vaskularisierungsgrad (MVD^{HIGH}) auf. In Analogie zu den TEMs, zeigte sich auch für die Angiopoietine 1 und 2 eine homogene Verteilung innerhalb der Tumorresektate beider Entitäten (siehe Abbildung 6).

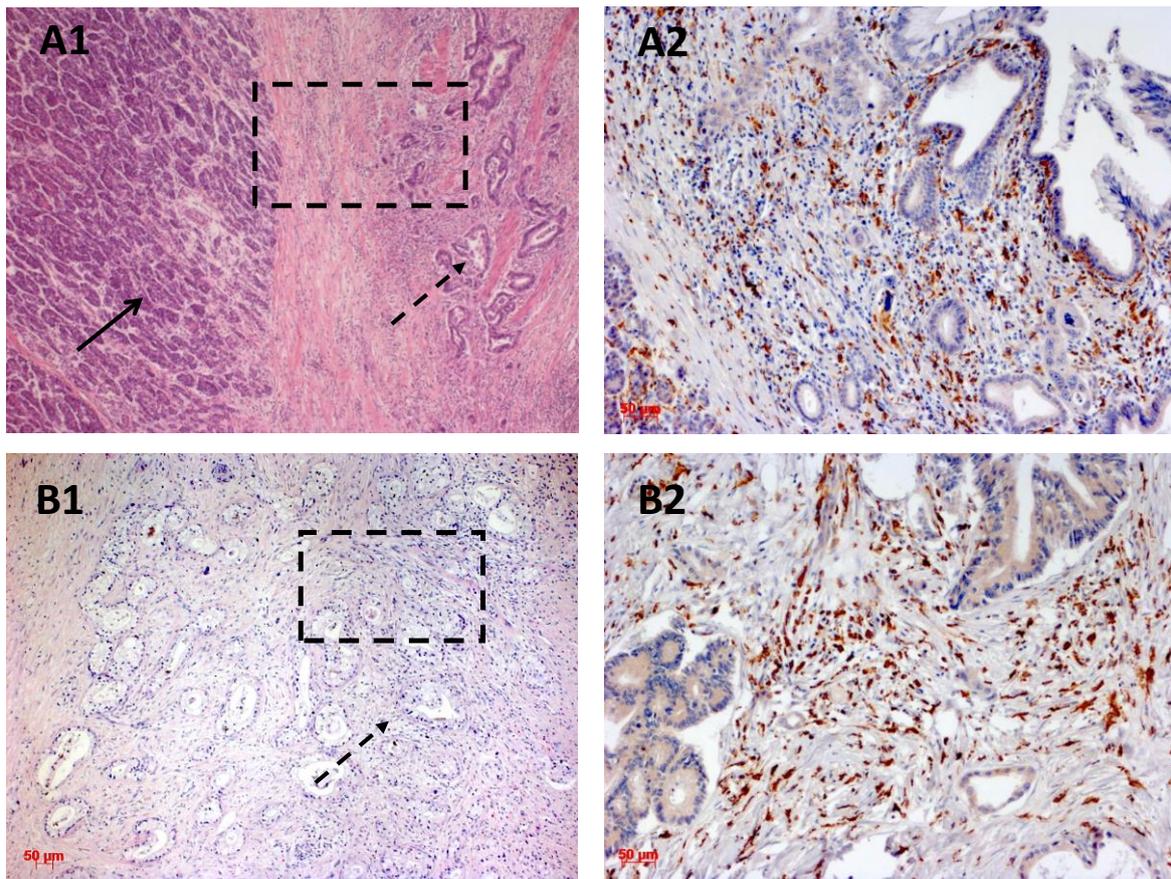


Abbildung 5: Darstellung der Tumordinvasionsfront und des Tumorzentrums im Pankreaskarzinom (PDAC)

A1: Im Tumorresektat grenzen das Normalgewebe (dicker Pfeil) und das Tumorgewebe (gestrichelter Pfeil) aneinander. Im Zwischenraum (Kästchen) befindet sich die Tumordinvasionsfront (TIF)

A2: Vergrößerter Ausschnitt der Tumordinvasionsfront im PDAC mit der Präsenz von M2-Makrophagen (CD163+TAMs +)

B1: Es zeigt sich ein Ausschnitt des Tumorzentrums (Kästchen) mit den typischen drüsenartigen Gängen (gestrichelter Pfeil) und dem umliegenden Stroma.

B2: Auch in diesem vergrößerten Bereich des Tumorzentrums (TCA) zeigen sich in der Färbung zahlreiche M2-Makrophagen

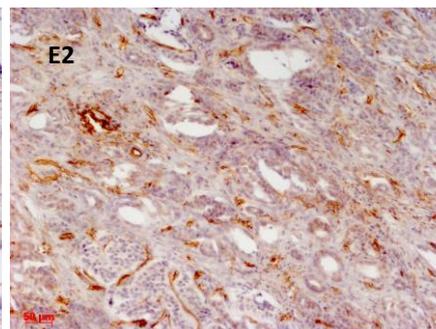
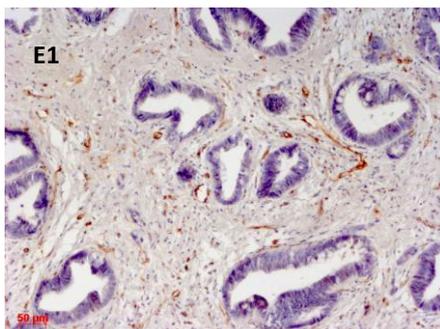
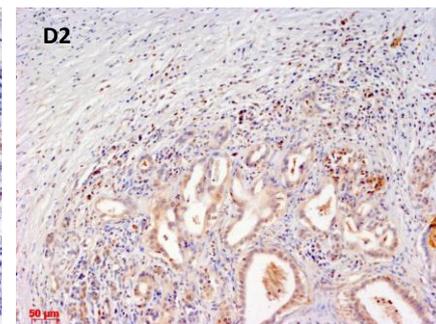
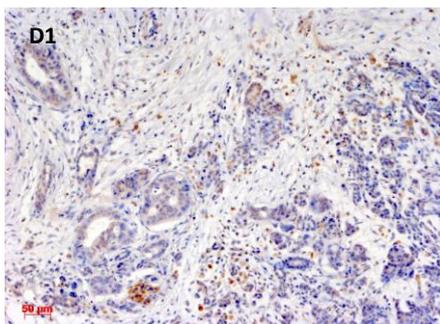
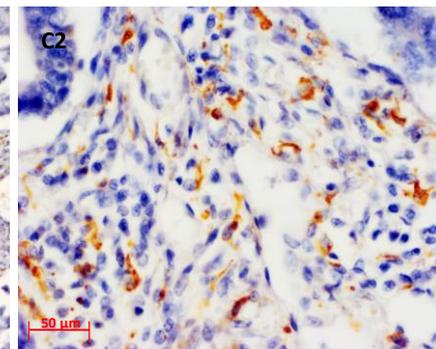
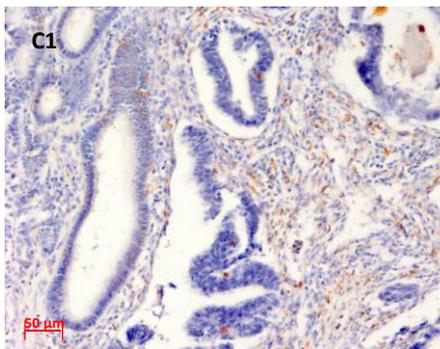
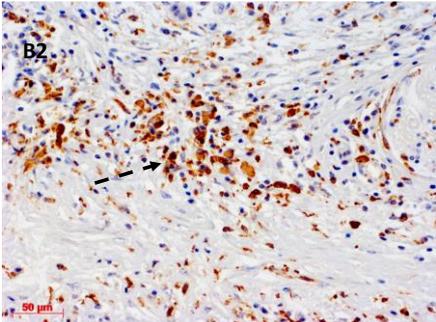
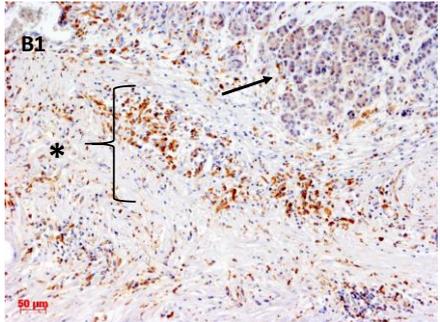
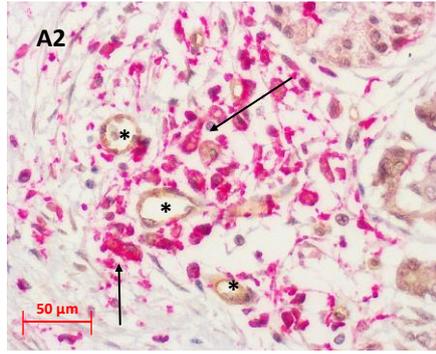
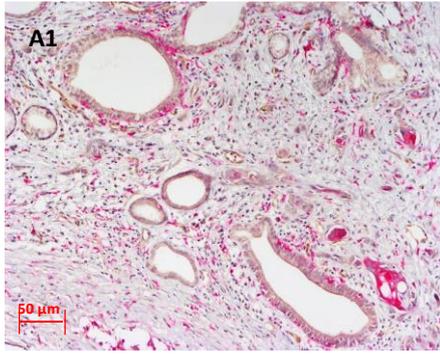


Abbildung 6: Immunhistologische Färbungen im Pankreas- (PDAC) und Gallengangskarzinom (dCCA)

(A) 1: Tie-2-exprimierende Makrophagen im Tumorzentrum von PDAC. In der Vergrößerung A2 stellt sich ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen (Pfeile) in perivaskulären Bereichen des Tumors (Gefäße mit * markiert) dar.

(B) CD163+Makrophagen in der Tumordinvasionsfront von PDAC. In der TIF (Klammer mit *) grenzt das Tumor- an das Normalgewebe (Pfeil). Im vergrößerten Ausschnitt B2 sind vermehrt M2-Makrophagen (CD163+TAMs) mit einer Expression von $\geq 5\%$ zu finden (gestrichelter Pfeil).

(C) CD68+Makrophagen im Tumorzentrum von dCCAEs zeigt sich in beiden Vergrößerungen eine homogene Verteilung der Makrophagen im umgebenden Tumorgewebe.

(D) Angiopoietin 1 und 2 PDAC. Abbildung D1 zeigt eine Übersicht von ANG 1 in der Tumordinvasionsfront. In D2 ist die Expression von ANG 2 im Tumorzentrum dargestellt. Beide Angiopoietine verteilen sich homogen mit einer Expression von $\geq 5\%$.

(E) Gefäßdichte im Gallengangskarzinom. Abbildung E1 zeigt ein Tumorresektat mit einer Gefäßdichte von $<50\%$ (=MVD^{LOW}). Vergleichend dazu stellt E2 ein dCCA-Resektat mit MVD^{HIGH} dar.

4.3. Einfluss von Makrophagen und Angiopoietine auf klinisch-pathologische Daten

4.3.1. Pankreaskarzinom

Im Rahmen der Untersuchungen der pankreatischen Tumorresektate konnte eine Assoziation zwischen den verschiedenen Makrophagensubtypen und deren Lokalisation im Tumor beobachtet werden: Tumore mit einem vermehrten Auftreten von M2-Makrophagen innerhalb der Tumordinvasionsfront wiesen eine ausgeprägte Dichte von TEMs⁺ im Tumorzentrum auf (22,7% der CD163+TAMs⁺ vs. 1,8% der CD163+TAMs⁻ ; p=0,002).

Interessant ist weiterhin, dass auch der Vaskularisierungsgrad der PDAC-Resektate mit den M2-Makrophagen korrelierte: 82,6% der Tumoren mit CD163+TAMs⁺ in der TIF zeigten im Vergleich zu 59,3% der Tumore mit CD163+TAMs⁻ eine erhöhte Gefäßdichte (p=0,046) (Tabelle 9). Ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von TEMs und der Expressionsrate von Angiopoietinen bzw. der Gefäßdichte der Tumore zeigte sich allerdings nicht.

Anders hingegen verhält es sich mit der Metastasierungsrate der PDAC-Tumore: Innerhalb des Tumorzentrums korrelierte die Präsenz von TEMs mit dem Auftreten von hepatischen Metastasen (p=0,047). Insgesamt wiesen 85,7% der Tumore mit TEMs⁺ im Bereich des Tumorzentrums eine Fernmetastasierung auf, während es für Tumore mit TEMs⁻ in diesem

Bereich 41,4% waren ($p=0,023$) (siehe Tabelle 10). In Ergänzung dazu zeigte sich, dass Tumorresektate mit TEMs⁺ - im Vergleich zu solchen mit TEMs⁻ - ein signifikant häufigeres Vorkommen von Fernrezidive präsentierten ($p=0,045$).

Im Gegensatz zu den TEMs, konnte für die Expression von CD68+Makrophagen und der Dichte von Angiopoietin 2 im PDAC ein Zusammenhang festgestellt werden ($p=0,040$). Dabei ergab sich eine negative Korrelation beider Parameter: 75% der Tumore mit einer niedrigen Dichte der CD68+TAMs (CD68+TAMs⁻) zeigten eine starke Expression von ANG2, während nur 21,2% der Tumore mit CD68+TAMs⁺ ähnlich hohe ANG 2-Werte erreichten.

Weiterhin fiel auf, dass die Dichte von Angiopoietinen im Tumorzentrum mit der Infiltration von Perineuralscheiden und Lymphgefäßen korrelierte ($p=0,004$ bzw $p=0,046$) (Anlage 1).

Klinisch-pathohistologische Daten	CD163+TAMs positiv	CD163+TAMs negativ	Signifikanz p
Anzahl Patienten	n=23	n=59	
Geschlecht			0,127
Weiblich	12 (52,2%)	20 (33,9%)	
Männlich	11 (47,8%)	39 (66,1%)	
Alter			0,817
≤60 Jahre	13 (56,5%)	35 (59,3%)	
>60 Jahre	10 (43,5%)	24 (40,7%)	
Tumorgröße			0,254
T1/T2	6 (26,1%)	9 (15,3%)	
T3/T4	17 (73,9%)	50 (84,7%)	
Lymphknotenbefall			0,495
Vorhanden	6 (26,1%)	20 (33,9%)	
Nicht vorhanden	17 (73,9%)	39 (66,1%)	
Infiltration von Lymphgefäßen			0,284
Vorhanden	3 (13,0%)	14 (23,7%)	
Nicht Vorhanden	20 (87,0%)	45 (76,3%)	
Infiltration venöser Gefäße			0,123
Vorhanden	21 (91,3%)	45 (76,3%)	
Nicht Vorhanden	2 (8,7%)	14 (23,7%)	
Infiltration Perineuralscheiden			0,178
Vorhanden	5 (21,7%)	22 (37,3%)	

Nicht Vorhanden	18 (78,3%)	37 (62,7%)	
R-Stadium			0,641
R0	19 (82,6%)	46 (78,0%)	
R1/R2	4 (17,4%)	13 (22,0%)	
Grading			0,271
Gut	0 (0,0%)	3 (5,1%)	
Moderat/schlecht	23 (100,0%)	56 (94,9%)	
Fernmetastase			0,074
Vorhanden	14 (60,9%)	23 (39,0%)	
Nicht vorhanden	9 (39,1%)	36 (61,0%)	
Lebermetastase			0,052
Vorhanden	9 (39,1%)	11 (18,6%)	
Nicht vorhanden	14 (60,9%)	48 (81,4%)	
Fernrezidiv			0,085
Vorhanden	15 (65,2%)	26 (44,1%)	
Nicht vorhanden	8 (34,8%)	33 (55,9%)	
Lokalrezidiv			0,977
Vorhanden	5 (21,7%)	13 (22,0%)	
Nicht vorhanden	18 (78,3%)	46 (78,0%)	
MVD			0,046
Stark	4 (17,4%)	24 (40,7%)	
Gering	19 (82,6%)	35 (59,3%)	
CD 68+ TAMs in TCA			0,480
Positiv	15 (65,2%)	41 (71,9%)	
Negativ	8 (34,8%)	16 (28,1%)	
TEMs in TCA			0,002
Positiv	5 (22,7%)	1 (1,8%)	
Negativ	17 (77,3%)	56 (98,2%)	

Tabelle 9 Darstellung von Korrelationen zwischen M2-Makrophagen in der Tumorinvasionsfront und klinisch-pathohistologischen Parametern von Patienten mit Pankreaskarzinom

TAMs= Tumor-assoziierte Makrophagen; MVD= Micro vessel Density; TCA= Tumor Core Area, TEMs= Tumor-exprimierende Makrophagen

Atanasov, G., Pötner, C. et al. TIE2-expressing monocytes and M2-polarized macrophages impact survival and correlate with angiogenesis in adenocarcinoma of the pancreas. Oncotarget 9, 29715–29726; 10.18632/oncotarget.25690 (2018)

Klinisch-pathohistologische Daten	TEMs positiv	TEMs negativ	Signifikanz p
Anzahl Patienten	n=7	n=99	
Geschlecht			0,570
Weiblich	2 (21,6%)	39 (39,4%)	
Männlich	5 (71,4%)	60 (60,6%)	
Alter			0,621
≤60 Jahre	3 (42,9%)	52 (52,2%)	
>60 Jahre	4 (57,1%)	47 (47,5%)	
Tumorgröße			0,662
T1/T2	1 (14,3%)	21 (21,2%)	
T3/T4	6 (85,7%)	78 (78,8%)	
Lymphknotenbefall			0,072
Vorhanden	0 (0,0%)	32 (32,3%)	
Nicht vorhanden	7 (100,0%)	67 (67,7%)	
Infiltration von Lymphgefäßen			0,150
Vorhanden	0 (0,0%)	23 (23,2%)	
Nicht Vorhanden	7 (100,0%)	76 (76,8%)	
Infiltration venöser Gefäße			0,482
Vorhanden	6 (85,7%)	73 (73,7%)	
Nicht Vorhanden	1 (14,3%)	26 (26,3%)	
Infiltration Perineuralscheiden			0,796
Vorhanden	2 (28,6%)	33 (33,3%)	
Nicht Vorhanden	5 (71,4%)	66 (66,7%)	
R-Stadium			0,585
R0	6 (85,7%)	76 (76,8%)	
R1/R2	1 (14,3%)	23 (23,2%)	
Grading			0,588
Gut	0 (0,0%)	4 (4,0%)	
Moderat/schlecht	7 (100,0%)	95 (96,0%)	
Fernmetastase			0,023
Vorhanden	6 (85,7%)	41 (41,4%)	
Nicht vorhanden	1 (14,3%)	58 (58,6%)	
Lebermetastase			0,047
Vorhanden	4 (57,1%)	23 (23,2%)	
Nicht vorhanden	3 (42,9%)	76 (76,8%)	
Fernrezidiv			0,045

Vorhanden	6 (85,7%)	46 (46,5%)	
Nicht vorhanden	1 (14,3%)	53 (53,5%)	
Lokalrezidiv			0,093
Vorhanden	3 (42,9%)	17 (17,2%)	
Nicht vorhanden	4 (57,1%)	82 (82,8%)	
MVD			0,255
Stark	6 (85,7%)	64 (64,6%)	
Gering	1 (14,3%)	35 (35,4%)	
CD 68+TAMs in TCA			0,480
Positiv	4 (57,1%)	43 (43,4%)	
Negativ	3 (42,9%)	56 (56,6%)	

Tabelle 10 Korrelationen von Tie-2-exprimierenden Makrophagen im Tumorzentrum und klinisch-pathohistologischen Parametern im Pankreaskarzinom

Atanasov, G., Pötner C. et al. *TIE2-expressing monocytes and M2-polarized macrophages impact survival and correlate with angiogenesis in adenocarcinoma of the pancreas. Oncotarget* **9**, 29715–29726; 10.18632/oncotarget.25690 (2018)

4.3.2. Gallengangskarzinom

Im distalen Gallengangskarzinom ergab sich interessanterweise im Gegensatz zum PDAC durchaus eine Assoziation zwischen den TEMs und der Neovaskularisierung im Tumor: Im Bereich des Tumorzentrums wiesen 64% der TEMs⁺-Tumore eine starke Gefäßdichte auf. Bei den TEMs⁻-Tumoren lag dies nur bei 29,4% der Resektate vor (p=0,028).

Eine Korrelation zu den Angiopoietinen, der Metastasierungsrate und weiteren Makrophagensubtypen zeigten sich allerdings nicht (siehe Anlage 3).

Im Hinblick auf die M2-Makrophagen, konnte eine Korrelation zwischen diesen und den CD68+Makrophagen im Bereich der Tumorinvasionsfront festgestellt werden (p=0,030) (Anlage 2).

Weitere Zusammenhänge der untersuchten Makrophagensubtypen unter einander, sowie mit Angiogenesefaktoren und anderen klinisch-pathohistologischen Parametern wurden nicht gefunden (siehe Anlage 2).

4.4. Die Makrophagensubtypen und deren Einfluss auf das Überleben der Patienten

4.4.1. Überlebensdaten von Patienten mit Pankreaskarzinom

Im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von M2-Makrophagen im Tumorgewebe und dem Überleben der Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas besteht.

Sowohl im Bereich der Tumorinvasionsfront, als auch im Tumorzentrum von PDAC-Resektaten, führte eine vermehrte Dichte der M2-Makrophagen (CD163+TAMs⁺) zu einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben.

Patienten mit einer verstärkten Expression von M2-Makrophagen innerhalb der Tumorinvasionsfront präsentierten ein medianes Gesamtüberleben von 22,3 Monaten (95% Konfidenzintervall: 18,6-26,0 Monate). Vergleichend dazu konnte für Patienten mit einer verminderten oder fehlenden Expression dieser Zellen (CD163+TAMs⁻) mit 45 Monaten (95% Konfidenzintervall: 21,2-68,8 Monate) ein längeres Gesamtüberleben festgestellt werden ($p=0,021$). Das 1-, 3-, und 5-Jahresüberleben der Patienten der CD163+TAMs⁺-Gruppe lag bei 81,1%, 33,5% und 27,9%, während Patienten der CD163+TAMs⁻-Gruppe Überlebenszeiten von 82,9%, 59,7% und 47,1% aufwiesen (siehe Abbildung 7).

Darüberhinaus zeigte sich auch für das rezidivfreie Überleben der PDAC-Patienten eine Assoziation mit den M2-Makrophagen (CD163+TAMs⁺). Das 1-, 3- und 5-Jahresüberleben der Patienten mit einer starken Präsenz der M2-Makrophagen in der TIF war niedriger (58.1, 43.7, und 37.6 %), als das der Patienten mit fehlender Expression dieser Zellen (82.4, 53.2, und 53.2%). Dieser Unterschied zeigte sich mit $p=0,022$ statistisch signifikant.

Weiterführende Untersuchungen ergaben zudem eine Korrelation zwischen der Präsenz von TEMs und dem rezidivfreien Überleben der PDAC-Patienten. Patienten der TEMs⁺-Gruppe im Bereich des Tumorzentrums präsentierten mit 9,6 Monaten ein signifikant kürzeres rezidivfreies Überleben, als Patienten ohne TEMs mit 69,7 Monaten ($p=0,012$).

Das Auftreten von CD68+Makrophagen zeigte keine Relevanz im Hinblick auf das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom.

Neben dem Auftreten von Makrophagen und Angiopoietinen, wurden weitere wesentliche klinisch-pathohistologische Parameter und deren Bedeutung für das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom untersucht (siehe Anlage 4). Dabei waren das Auftreten von Metastasen, Lokalrezidiv, die Infiltration von Perineuralscheiden, sowie von Lymph- und Blutgefäßen signifikante Korrelationsgrößen für das Gesamtüberleben von PDAC-Patienten.

In der Multivarianzanalyse konnte das Fernrezidiv als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben ($p < 0,001$) und der Lymphknotenbefall für das rezidivfreie Überleben ($p = 0,001$) festgestellt werden.

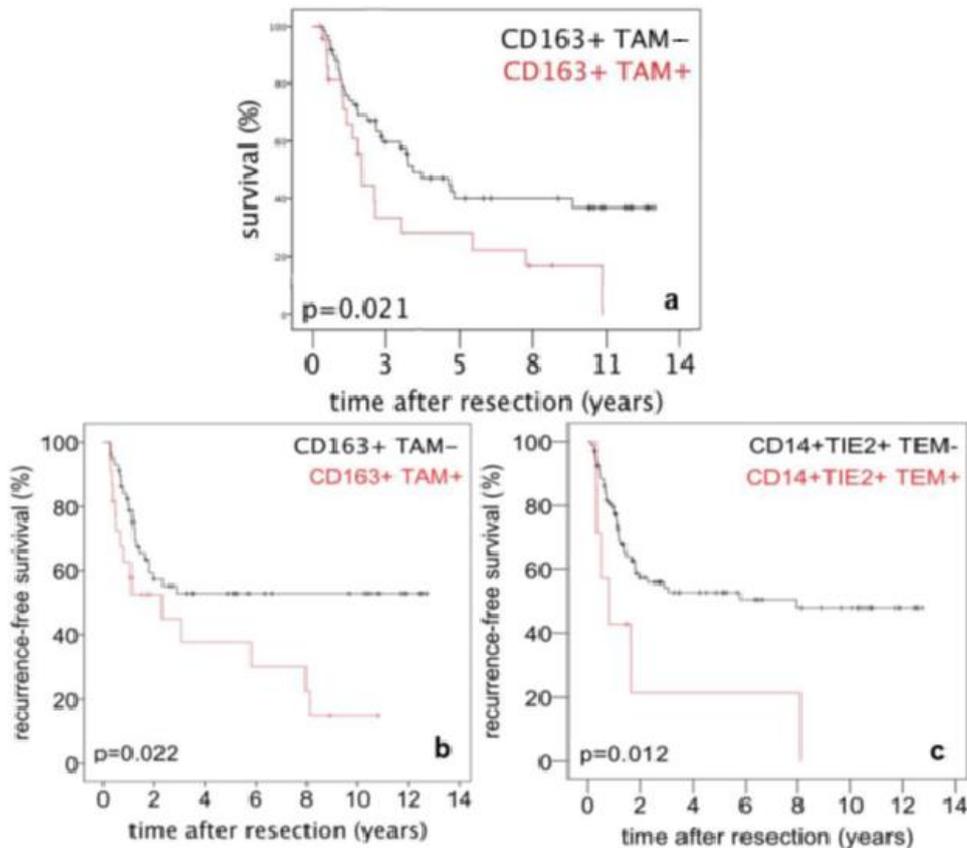


Abbildung 7: Überlebensdaten der Patienten mit Pankreaskarzinom im Hinblick auf die Präsenz von Tumor-assoziierten M2-Makrophagen (TAMs) und Tie-2-exprimierenden Makrophagen (TEMs)

a) postoperatives Gesamtüberleben von PDAC-Patienten in Abhängigkeit von CD163+TAMs innerhalb der Tumorinvasionsfront

b) rezidivfreies Überleben von PDAC-Patienten in Abhängigkeit von CD163+TAMs innerhalb der Tumorinvasionsfront

c) rezidivfreies Überleben von PDAC-Patienten in Abhängigkeit von TEMs innerhalb des Tumorzentrums

Atanasov, G., Pötner C., et al. TIE2-expressing monocytes and M2-polarized macrophages impact survival and correlate with angiogenesis in adenocarcinoma of the pancreas. *Oncotarget* **9**, 29715–29726; 10.18632/oncotarget.25690 (2018)

4.4.2. Überlebensdaten von Patienten mit Gallengangskarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Abhängigkeit zwischen dem Überleben von Patienten mit Gallengangskarzinom und dem Auftreten von CD68+Makrophagen festgestellt werden.

Dabei zeigte sich für Patienten mit der Präsenz von CD68+Makrophagen (CD68+TAMs⁺) im Bereich der Tumorinvasionsfront ein längeres Gesamtüberleben. Das postoperative Gesamtüberleben der Patienten der CD68+TAMs⁺-Gruppe war dabei mit 31,7 Monaten (95% Konfidenzintervall: 10,0-20,1 Monate) höher als das der CD68+TAMs⁻-Gruppe mit 15,1 Monaten (95% Konfidenzintervall: 28,1-35,4 Monate). Dieser Unterschied war statistisch mit $p=0,001$ hoch signifikant (siehe Abbildung 8).

In der univariaten Analyse zeigte das Grading der Tumorzellen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zum Gesamtüberleben der Patienten mit distalem Gallengangskarzinom (siehe Anlage 5). Darüber hinaus konnte in der Multivarianzanalyse das Auftreten von TEMs innerhalb der Tumorinvasionsfront als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der Patienten mit Gallengangskarzinom ermittelt werden ($p=0,018$).

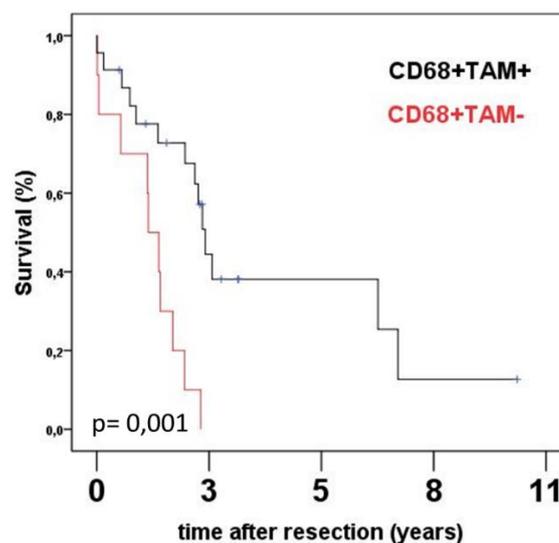


Abbildung 8: Gesamtüberlebensdaten der Patienten mit Gallengangskarzinom im Hinblick auf die Präsenz von CD68+Makrophagen (CD68+TAMs)

Patienten mit einer starken Präsenz von CD68+Makrophagen im Bereich der Tumorinvasionsfront wiesen ein signifikant längeres Überleben.

5. Diskussion

Gegenstand aktueller Forschung ist es, die Tumorbiologie von Pankreas- und Gallengangskarzinomen zu untersuchen, um somit die Grundlage für neue Therapieansätze und Möglichkeiten der Frühdiagnostik zu schaffen. Die Tumorimmunologie bzw. die Rolle verschiedener Immunzellen und deren Einfluss auf die Progression und Angiogenese der Malignome, stellen dabei einen wichtigen Ansatzpunkt dar. Demnach untersuchten wir die Bedeutung einzelner Makrophagensubtypen und Angiopoietine für das klinische Outcome der Patienten anhand immunhistologischer Charakterisierung. Insbesondere für die Patienten mit Pankreaskarzinom konnten wertvolle Erkenntnisse erzielt werden, welche bereits publiziert wurden. Insgesamt zeigten sich folgende Resultate:

Die Präsenz von M2-Makrophagen, CD68+TAMs und Tie-2-exprimierenden Makrophagen hatte einen Einfluss auf das Überleben der Patienten mit Pankreas- bzw. Gallengangskarzinom. Im PDAC korrelierte die Präsenz von M2-Makrophagen mit einer hohen Gefäßdichte und dem Auftreten von TEMs. Diese wiederum waren vorrangig in perivaskulären Bereichen anzutreffen und mit der Metastasierungsrate der PDAC-Patienten assoziiert. Obwohl sich kein Zusammenhang zwischen den Angiopoietinen und den proangiogenetischen TEMs im PDAC nachweisen ließ, korrelierte ANG 2 mit der Infiltration von Perineuralscheiden und Lymphgefäßen, welche unter anderem als wichtige pathohistologische Prognosefaktoren fungieren.

Im dCCA konnte im Gegensatz zum PDAC eine Assoziation zwischen den TEMs und der Gefäßdichte im Tumor nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zur Metastasierungsrate zeigten die TEMs im dCCA allerdings nicht. Darüber hinaus wurde die Präsenz dieser Zellen als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der dCCA-Patienten ermittelt. Tumorresektate mit einem vermehrten Auftreten von CD68+TAMs korrelierten mit einem verlängerten Überleben.

M2-Makrophagen, CD68+TAMs und TEMs beeinflussen das Überleben der Patienten

In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv konnte gezeigt werden, dass die Präsenz von TEMs und M2-phänotypische Makrophagen (CD163+TAMs*) mit einem reduziertem Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom korrelierte. Andere wissenschaftliche Arbeiten konnten bereits einen negativen Einfluss dieser Zellen für Tumore des Urogenitaltraktes, sowie für Magenkarzinome und B-Zell-Lymphome feststellen^{67,44}. Wie in Abschnitt 1.2.1.1. bereits erwähnt, stellt das *reprogramming* der M1- und M2-phänotypischen Makrophagen ein dynamisches Konstrukt dar^{39,68}. Auf der Grundlage verschiedener Untersuchungen wird derzeit vermutet, dass die Tumorzellen in Pankreaskarzinomen selbst

zum *Reprogramming* der Makrophagen in der Lage sind und so deren dichotomen Eigenschaften zur Tumorprogression nutzen ²⁶. Im Rahmen unserer Studie wird diese Hypothese anhand der ausgeprägten Dichte von M2-phänotypischen Makrophagen und dem damit einhergehenden schlechten klinischen Outcome der Patienten mit Pankreaskarzinom unterstützt. Darüber hinaus führte die Präsenz der proangiogenetischen TEMs ebenfalls zu einem reduzierten rezidivfreien Überleben im PDAC. Interessanterweise zeigte das Auftreten von M2-Makrophagen und den TEMs dabei eine positive Korrelation im PDAC, wobei letztere wiederum mit einer erhöhten Metastasierungsrate einhergingen. Die Tatsache, dass das Fernrezidiv als unabhängiger Prognosefaktor im PDAC ermittelt wurde, lässt einerseits eine prognostische Relevanz für die Interaktion zwischen den Tumorzellen und den Makrophagen (M2-Makrophagen und TEMs), und andererseits eine Abhängigkeit zwischen den beiden Makrophagensubtypen, vermuten. In Ergänzung dazu, stellte die Präsenz von TEMs in den von uns untersuchten Gewebeproben von Patienten mit distalem Gallengangskarzinom einen unabhängigen Prognosefaktor dar. Hierbei ließ sich allerdings, im Gegensatz zum PDAC, kein Zusammenhang zwischen den M2-Makrophagen und den TEMs bzw. dem Überleben der dCCA-Patienten feststellen. Interessanterweise wiesen wir in den dCCA-Tumorresektaten allerdings eine deutliche Assoziation zwischen den M2-Makrophagen und den CD68+TAMs nach: dCCA-Patienten mit einer starken Ausprägung von CD68+TAMs im Tumor präsentierten ein längeres Gesamtüberleben. Im Rahmen von anderen wissenschaftlichen Untersuchungen wurden dahingehend gegenteilige Erkenntnisse gewonnen: Für intrahepatische und hiläre Gallengangskarzinome wurde ein vermindertes Überleben für Patienten mit einer ähnlich starken Ausprägung der CD68+TAMs im Tumor gezeigt ^{21,37,61}. In Analogie zu den vorliegenden Arbeiten konnte für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Kolonkarzinom, ein positiver Einfluss von einem vermehrten Auftreten der CD68+TAMs auf das Überleben der Patienten gezeigt werden ⁵¹. Eine mögliche Erklärung dieser konträren Ergebnisse ist, dass mithilfe des Oberflächenmarkers CD68, als Panmarker für gewebständige Makrophagen, keine Aussage über die Polarisierung dieser Zellen möglich ist, und demnach ein Einfluss tumorsupprimierender M1-Makrophagen sehr wahrscheinlich ist.

TEMs und ANG 2 stehen mit der Metastasierung und Angiogenese im Zusammenhang

Die Rolle der TEMs in menschlichen Tumorgewebe ist noch weitestgehend ungeklärt. Das Tie-2-Angiopoietin-System dient im Gewebe vorallem zur Regulation der Vaskularisierung ⁵³. Die Endothelzellen sind in der Lage Angiopoietine (ANG 1 und ANG 2), als Liganden von Tie-2, zu sezernieren und so entweder ANG 1-vermittelt die Gefäßausreifung bzw. -stabilisierung zu initiieren, oder mithilfe von ANG 2 den Tie-2-Rezeptor, und damit die

Endothelzellen, zu aktivieren und Neoangiogenese zu fördern ⁵³. Ein Zusammenhang zwischen dem Tie-2-Angiopietin-System und der Neoangiogenese im Tumor konnte bereits für einige wenige Entitäten hergestellt werden ^{55,69}. Dabei spielte Angiopietin 2 in-vitro eine wesentliche Rolle für lymphatische Metastasierung und Gefäßneubildung ⁵⁹. Aus diesen Erkenntnissen resultierte die Hypothese, dass TEMs und Angiopietine auch im Tumorgewebe interagieren und so die Grundlage für die lokale Tumorprogression und Metastasierung bilden ⁷⁰.

Innerhalb unseres Patientenkollektivs zeigten PDAC-Tumore mit einer hohen Dichte von TEMs eine höhere Metastasierungsrate, eine verstärkte Vaskularisierung und wiesen ein kürzeres Überleben auf, als Tumore mit einer niedrigeren bzw. fehlenden Präsenz dieser Zellen. Zudem korrelierte ANG 2 in beiden Tumorentitäten mit der Infiltration von Lymphgefäßen und Perineuralscheiden. ANG 1 verhielt sich dahingehend konträr, spielte aber für den klinischen Verlauf der von uns untersuchten Tumore nur eine untergeordnete Rolle (Daten nicht dargestellt). Darüber hinaus zeigten hohe ANG 1-Expressionen eine Assoziation zu verminderten Metastasierungsraten, während ANG 2 in diesem Gewebe keinen relevanten Zusammenhang zu klinisch-pathohistologischen Parametern aufwies ⁶². Dies suggeriert einen maßgeblichen Einfluss der Angiopietine auf die prognostische Bedeutung der TEMs im Tumorgewebe. Auf Grundlage dessen lässt sich vermuten, dass Tumorzellen, am ehesten mithilfe von Zytokinen und der Bildung eines hypoxischen Gewebes unabhängig von Angiopietinen, zur TEMs-Rekrutierung ins Tumorgewebe befähigt sind ⁷⁰. Trotzdem scheinen Angiopietine an der Interaktion zwischen den TEMs und den Endothelzellen bzw. ihrer Bildung und Ausreifung beteiligt zu sein ⁷⁰. Interessant ist dahingehend die Beobachtung in dieser und anderen wissenschaftlichen Arbeiten, dass sich die TEMs insbesondere in perivaskulären Bereichen der PDAC-Resektate ansiedelten und sich so in der räumlichen Nähe zu den ANG 2 sezernierenden Endothelzellen befanden ⁷¹. Die zuvor genannte direkte Interaktion zwischen den TEMs und Angiopietinen konnte im Rahmen dieser Arbeit in PDAC- und dCCA-Resektaten anhand der immunhistochemischen Expressionraten allerdings nicht reproduziert werden. Für hiläre Gallengangstumore wurde das Verhalten der TEMs im Tumor ebenfalls untersucht: Im Gegensatz zu den hier dargestellten Erkenntnissen, besaßen die prädominierenden TEMs einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten mit hilärem Gallengangskarzinom ⁶². Auch im Kolonkarzinom konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der TEMs-Expression und tumor-promovierenden Charakteristika, wie beispielsweise ein fortgeschrittenes Tumorstadium oder eine vermehrte Vaskularisierung, der Patienten nachgewiesen werden ⁷².

Es sind weitere in vitro- sowie in vivo-Experimente notwendig, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Interaktion dieser Zellen mit Angiopoietinen im Tumorgewebe zu entschlüsseln.

Die Lokalisation der Makrophagen im Tumorgewebe ist für die prognostische Bedeutung der Zellen relevant

In Anlehnung an das von Fridman et al. erörterte Konzept des *Immune contextures*, eruierten wir die Expression der gefärbten Zellen im Bereich des Tumorzentrums (TCA), sowie innerhalb der Tumorinvasionsfront (TIF) (siehe auch Abschnitt 1.2.1.2.)⁷³. Während eine erhöhte Dichte von M2-Makrophagen innerhalb der Tumorinvasionsfront vom Pankreaskarzinom mit einem reduzierten Gesamt- und rezidivfreien Überleben einherging, konnte für die Ausprägung dieser Zellen im Bereich des Tumorzentrums kein Einfluss auf das Überleben nachgewiesen werden. Die prognostische Relevanz dieses Makrophagensubtyps im Bereich der TIF konnte für Pankreaskarzinome bereits bestätigt werden^{48 58}. Auch in Gallengangskarzinomen wurde im Rahmen dieses Projektes, sowie in vorherigen Arbeiten mit hilären Gallengangskarzinomen, die Tumorinvasionsfront als die entscheidene Lokalisation für prognostisch relevante TAMs festgestellt⁶². Eine mögliche theoretische Erklärung liefert der zugrundeliegende Mechanismus der Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorgewebe: Spezifische Chemokine und Zytokine, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), IL-1 β und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 12 (CXCR12), werden von Tumorzellen selbst, oder auch von umliegenden Stroma- und Epithelzellen (zum Beispiel mithilfe von VEGF) sezerniert und dienen insbesondere im Grenzbereich zwischen Normal- und Tumorgewebe zur Anlockung von Makrophagen^{25,74}. Die TAMs innerhalb der TIF entsenden dann, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen, wiederum proangiogenetische Faktoren, wie VEGF, Plateled derived growth factor (PDGF), ANG 1, Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9), und tragen so zur Neoangiogenese und zum Tumorwachstum bei⁷⁴. Auf Grundlage dessen lässt sich auch erklären, weshalb sich im Rahmen unserer immunhistochemischen Untersuchung eine Assoziation zwischen einer vermehrten Gefäßdichte, insbesondere in PDAC-Gewebeproben, und einer starken M2-Expression in der TIF zeigte. Eine Blockierung dieser CXCR12-Achse könnte demnach die Rekrutierung von M2-Makrophagen in die Tumordinfiltrationszone inhibieren, und so das Ansprechen auf Chemotherapeutika verbessern⁷⁵.

Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Präsenz der TEMs und deren Bedeutung im Tumor, sowohl für Pankreas- als auch für Gallengangskarzinome, insbesondere der Bereich des Tumorzentrums als relevant: Die Metastasierungsrate im PDAC und die Gefäßdichte im dCCA waren maßgeblich von der Lokalisation der TEMs im TCA abhängig. In der Arbeit mit

hilären Gallengangskarzinom sahen wir für TEMs in Analogie zu den M2-Makrophagen eine prädominierende Bedeutung der TIF ⁶². Weitere vergleichende Untersuchungen zu diesen Erkenntnissen liegen nach unserem Wissen bis dato nicht vor. Es scheinen jedoch weitere Mechanismen zur Rekrutierung der proangiogenetischen TEMs in diesen Bereich eine Rolle zu spielen, welche im Rahmen von in-vitro und in-vivo-Experimenten untersucht werden sollten.

Die Beobachtung, dass das Auftreten und die Funktion der Immunzellen im Gewebe zwischen verschiedenen Tumorentitäten, aber auch je nach Lokalisation im Tumorgewebe deutlich variiert, lässt schlussfolgern, dass die genaue Beschreibung des *Immune contextures* einen wesentlichen Beitrag zur Etablierung neuer und vielversprechender Immuntherapien leistet ⁴⁹.

Immuntherapien könnten zukünftig das klinische Outcome der Patienten verbessern

Pankreas- und Gallengangskarzinome haben viele pathohistologische und klinische Gemeinsamkeiten. Aufgrund ihrer anatomischen Nähe führen beide Karzinome in fortgeschrittenen Stadien zu vergleichbarer klinischer Symptomatik. Die Lagebeziehung ist auf den gemeinsamen embryologischen Ursprung beider Organbestandteile zurückzuführen ⁷⁶. Darüber hinaus lassen sich auch auf molekulargenetischer Ebene Ähnlichkeiten in der Entstehung beider Tumorentitäten eruieren (siehe auch Abschnitt 1.1.) ⁷⁶. Aktuelle Therapieregime postulieren vorrangig die Indikationsprüfung zur Whipple-Operation bzw. pyloruserhaltenden Duodenopankreatektomie und einer anschließenden adjuvanten Chemotherapie. Diese zahlreichen Gemeinsamkeiten machen es klinisch häufig schwer beide Entitäten voneinander zu unterscheiden. Trotzdem handelt es sich um eigenständige Tumorentitäten mit unterschiedlichen Herausforderungen bezüglich der Prognose und Therapie. Im vorliegenden Projekt konnten wir anhand immunhistochemischer Charakterisierung von Makrophagensubtypen deutliche Unterschiede in der Funktion dieser Immunzellen und deren Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern von Patienten mit Pankreas- und Gallengangskarzinom feststellen. Die wegweisenden Erkenntnisse für das Pankreaskarzinom konnten bereits publiziert werden. Weiterführende Untersuchungen sind demnach notwendig, um die Gründe dieser Unterschiede herauszuarbeiten und die Entwicklung individueller Therapieregime zu ermöglichen.

Vor allem die Polarisierung von Makrophagen mit tumorpromovierenden Eigenschaften, oder auch die Rekrutierung dieser in das Tumorgewebe, könnten dabei als Zielmechanismen für supportive Antitumor-Therapien dienen. In verschiedenen Mausmodellen konnte bereits eine selektive Wirkung von DNA-bindenden Chemotherapeutika auf Tumor-assoziierte Makrophagen festgestellt werden ⁷⁷. Über die Aktivierung von Signalmolekülen kommt es zu

einer vermehrten Apoptose von insbesondere myelomonocytyären Zellen, und damit vorrangig Makrophagen, während Lymphozyten und Neutrophile Zellen nicht betroffen sind⁷⁷. Inwieweit auch Patienten mit PDAC und dCCA davon profitieren, ist bislang noch ungeklärt.

Makrophagen als Target zur Antitumor-Therapie zu nutzen, birgt stets das Risiko auch Prozesse, wie Wundheilung und Immunabwehr zu schwächen, und damit die natürlichen Abwehrmechanismen des Körpers zu reduzieren. Die genaue Lokalisation der Makrophagensubtypen und deren Zusammenhang mit der Klinik könnte ein hilfreicher Schritt zur Optimierung dieser Therapieregime sein. Für distale Gallengangskarzinome ist der Kenntnisstand zur Wirkung möglicher Immuntherapien gering. Derzeit liegt der Fokus auf der Entwicklung möglicher Strategien zur Suppression von Zellen des *Microenvironment*, wie Makrophagen, um durch die Ausschaltung der immunsupprimierenden Eigenschaften, T-Zellen wiederum zur Tumorabwehr zu stärken²⁰.

Eine weiterer möglicher Ansatzpunkt ist die Inhibierung der ANG2-Tie-2-Achse. Im Rahmen unseres Projektes zeigten die TEMs und Angiopoietin 2 eine starke Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern der Patienten. Eine verbreitete Theorie, weshalb Tumore des pankreato-biliären Systems bisher schlechte Ansprechraten auf gut etablierte anti-angiogenetische Chemotherapeutika, wie beispielsweise Bevacizumab zeigen, ist die im Vergleich zu anderen Entitäten geringe Vaskularisierung des Tumorgewebes⁷⁸. Demnach wäre eine ANG 2 Blockade, bzw die Inhibierung der Rekrutierung von TEMs im Tumorgewebe ein vielversprechender Ansatz zur antiangiogenetischen und im Falle von ANG 2, anti-metastatischen Therapie⁷⁰.

In einem etablierten Tumormodell konnte die Arbeitsgruppe von Park et al. bereits belegen, dass eine Kombination aus der Aktivierung des Tie-2-Rezeptors auf Endothelzellen und die gleichzeitige Blockierung der ANG 2-Expression zu einem vermindertem Tumorwachstum führt⁷⁹. Hintergrund dieser Ergebnisse ist die Überlegung, dass eine therapeutisch verursachte Minderperfusion des Gewebes (beispielsweise mittels anti-angiogenetischer Chemotherapeutika) zur Hypoxie im Tumor und damit zur Rekrutierung insbesondere der tumor-promovierenden TAMs und Überexpression von ANG 2 führt⁷⁹. Aufgrund dessen kommt es anschließend zur vermehrten Neoangiogenese und Tumorprogression. Die Blockade von ANG2 und Aktivierung des Tie-2-Rezeptors soll zu einer ausreichenden Vaskularisierung im Gewebe führen und gleichzeitig eine fortschreitende Neoangiogenese supprimieren. Die Weiterführung der experimentellen Grundlagenforschung zu diesem Thema, könnte zukünftig zu verbesserten Ansprechraten dieser Chemotherapeutika führen.

Es muss abschließend darauf hingewiesen werden, dass die immunhistochemische Bestimmung der Zellen des mononukleären Phagozytensystems keine Auskunft über kausale Zusammenhänge erlaubt. Die erhobenen Daten und daraus resultierenden Interpretationen sind zudem aufgrund einer begrenzten Anzahl von Patienten bzw. Tumorsektaten vor dem Hintergrund einer eingeschränkten Repräsentativität zu sehen. Demnach sollten weitere experimentelle Arbeiten zur Bestätigung dieser Ergebnisse folgen, in denen beispielsweise anhand von *in-vitro*-Kultivierung eine Überexpression von TEMs in etablierte Zellreihen von PDAC und dCCA erfolgt. Dies ermöglicht eine Erfassung der resultierenden molekularen Veränderungen im Microenvironment und der Reaktionen von M2-Makrophagen im Tumorgewebe.

Zusammenfassend konnten wir im Rahmen unseres Projektes erstmals vergleichend eine maßgebliche Bedeutung von M2-Makrophagen, CD68+TAMs und TEMs, sowie Angiopoietinen im Pankreaskarzinom und distalen Gallengangskarzinom erarbeiten. Dabei stellten wir in Abhängigkeit ihrer Lokalisation im Tumor eine bedeutende Rolle dieser Zellen für das Überleben der Patienten, der Metastasierung, sowie dem Vaskularisierungsgrad der Tumore fest. Insgesamt ermöglichen die vorliegenden zum Teil bereits veröffentlichten Ergebnisse dieser Arbeit neue Einblicke in die Tumorbiologie von Pankreas- und Gallengangskarzinomen und sollten in weiterführenden Experimenten reevaluiert werden, um wichtige mechanistische Zusammenhänge hinsichtlich der Tumorpogression zu gewinnen und die Konzipierung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Die Bedeutung von Angiogenesefaktoren und tumorinfiltrierenden Immunzellen des mononukleären Phagozytensystems bei Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas und distalem Gallengangskarzinom

eingereicht von Charlotte Christiane Pötner

angefertigt an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie

betreut von Prof. Dr. rer. nat Gabriela Aust/ Dr. med. Georgi Atanasov

Mai 2019

In der Tumormunologie werden Interaktionen zwischen Tumoren und dem humanen Immunsystem untersucht. Inwieweit diese Wechselwirkungen einen Einfluss auf das klinische Outcome der Patienten haben, ist Gegenstand aktueller Forschung. Tumormunologische Prozesse, wie *Tumor-Escape*-Mechanismen, Veränderungen im *Microenvironment* und die Neoangiogenese, tragen zur Regulierung der Tumorprogression bei. Die Vermittlung sowohl von tumorpromovierenden, als auch –supprimierenden Mechanismen, wird aktuell unter anderem den körpereigenen Immunzellen zugeschrieben.

Dabei fungieren Immunzellen des mononukleären Phagozytensystems, wie tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs), als Produzenten von proangiogenetischen und immunregulatorischen Mediatoren. Vereinfachend dargestellt, besitzen TAMs in Abhängigkeit ihres Phänotyps dichotome Eigenschaften. Es wird zwischen den M1-phänotypischen Makrophagen mit tumor-supprimierenden Eigenschaften und M2-Makrophagen mit wachstumsfördernden Eigenschaften unterschieden. Der Übergang von dem einen zum anderen Phänotyp ist dabei fließend und wird von Veränderungen im umgebenden Mikromilieu reguliert.

Neben den Immunzellen, sind zudem Angiogenesefaktoren, wie Angiopoietin 1 und 2, als Liganden des endothelialen Membranrezeptors Tie-2, maßgeblich an der Neoangiogenese im Tumorgewebe beteiligt. Einige tumorinfiltrierende Makrophagensubtypen exprimieren diesen Tie-2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Tie-2-exprimierende Makrophagen, abgekürzt TEMs). Das lässt vermuten, dass eine verstärkte Präsenz von TAMs, TEMs und Angiopoietinen innerhalb von Tumoren, die Tumorprogression und damit klinisch-pathohistologische Parameter, wie Tumorstadium, Rezidivraten und Gesamtüberleben hinreichend beeinflusst. Trotz neuesten Erkenntnissen für verschiedene Tumorentitäten in diesem Bereich, ist die Datenlage für Pankreas- und Gallengangskarzinome weiterhin unzureichend.

Das vorliegende Projekt diene der Untersuchung der prognostischen Bedeutung von Angiogenesefaktoren und tumorinfiltrierenden Zellen des mononukleären Phagozytensystems mittels immunhistochemischer Charakterisierung der Resektate von Pankreas- und distalen Gallengangskarzinomen. Die Daten der Patienten wurden aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Leipzig akquiriert und zusammen mit den klinischen Daten in einer Datenbank zusammengefasst. Zur Analyse der Zellen innerhalb des Tumorzentrums, sowie im Bereich der Tumorinfiltrationszone beider Entitäten, wurden immunhistochemische Färbungen repräsentativer Tumorproben durchgeführt und die Expression dieser semiquantitativ bestimmt. Zur Ermöglichung der statistischen Analyse mittels SPSS wurden die ermittelten Werte in ein Scoringssystem eingeordnet und Cut-off-Werte für eine hohe und geringe Expression bzw. der Präsenz der Zellsubtypen im jeweiligen Tumorgewebe festgelegt.

Um die prognostische Bedeutung der einzelnen Marker für das klinische Outcome der Patienten zu eruieren, wurden die Überlebens- und Rezidivraten der Patienten in einer Kaplan-Meier-Kurve erfasst. Zudem wurde das Überleben der Patienten im Hinblick auf die Expressionsraten der einzelnen Zellsubtypen mittels Log-rank-Test verglichen. Mögliche Zusammenhänge zwischen den untersuchten Makrophagensubtypen, den Angiopoietinen

und klinisch-pathohistologischen Parametern der Patienten wurden mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher's exact test evaluiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass M2-polarisierte Makrophagen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas mit einem reduzierten Gesamt- und rezidivfreien Überleben einhergehen. Darüberhinaus wurde eine starke Assoziation zwischen diesen Zellen und der Neovaskularisierung im Tumor festgestellt.

Tie-2-exprimierende Makrophagen korrelierten mit einer verstärkten Metastasierungsrate und konzentrierten sich vorrangig im perivaskulären Bereich. Auch hier ließ sich ein negativer Einfluss dieser Zellen auf das rezidivfreie Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom eruieren.

Für distale Gallengangskarzinome konnte die Expression von Tie-2-exprimierenden Makrophagen innerhalb der Tumordinvasionsfront als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben der im Rahmen dieses Projekts untersuchten Patienten detektiert werden. Es war eine positive Korrelation zwischen diesen Zellen und der Gefäßdichte im Tumor zu verzeichnen. Tumor-assoziierte Makrophagen zeigten im Allgemeinen im Gegensatz zu M2-polarisierten Phänotypen einen günstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten mit distalem Gallengangskarzinom.

Im Hinblick auf die Angiopoietine konnte vor allem eine verstärkte Assoziation zu wichtigen pathohistologischen Prognosefaktoren, wie der Infiltration von Blutgefäßen und Perineuralscheiden für beide Tumorentitäten dargestellt werden.

Zusammenfassend konnten wir im Rahmen dieses Projektes feststellen, dass tumor-assoziierte Makrophagen und dabei vor allem Tie-2-exprimierende und M2-Makrophagen im Pankreas- und Gallengangskarzinom exprimiert werden und negative Folgen für das Überleben der Patienten bedingen. Inwieweit sich die Ausprägung der Zellen auf die Prognose auswirkt, hängt neben der Tumorentität auch von der Lokalisation, dem Subtyp und der Interaktion dieser Zellen ab.

Zukünftige experimentelle Untersuchungen, wie in-vitro Kultivierungen etablierter Tumorzellreihen sind nötig. Dabei sollte der Fokus auf die erwähnten Makrophagensubtypen gesetzt werden, um die kausalen Zusammenhänge einer vermehrten Präsenz dieser Zellen und der Metastasierung sowie der Neovaskularisierung zu klären.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse leisten bereits jetzt einen maßgeblichen Beitrag zum Verständnis der Tumorbiologie von Pankreas- und Gallengangskarzinomen und ermöglichen die weitere Untersuchung innovativer Ansätze zur Etablierung von gezielten Immuntherapien.

Literaturverzeichnis

1. Birth, M., Ittel, T. H. & Pereira, P. L. Hepatobiliäre und Pankreastumoren (Springer-Verlag) Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010).
2. Tannapfel, A. & Wittekind, C. Anatomie und Pathologie des intrahepatischen und extrahepatischen Gallengangskarzinoms. *Der Pathologe* **22**, 114–123 (2001).
3. Hidalgo, M. Pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* **362**, 1605–1617; 10.1056/NEJMra0901557 (2010).
4. Tannapfel, A. & Wittekind, C. Gallenblasen- und Gallengangskarzinom. *Biologie und Pathologie. Der Internist* **45**, 33–41; 10.1007/s00108-003-1110-6 (2004).
5. Keane, M. G., Horsfall, L., Rait, G. & Pereira, S. P. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ open* **4**, e005720; 10.1136/bmjopen-2014-005720 (2014).
6. Fernandez Moro, C. et al. Immunohistochemical Typing of Adenocarcinomas of the Pancreatobiliary System Improves Diagnosis and Prognostic Stratification. *PloS one* **11**, e0166067; 10.1371/journal.pone.0166067 (2016).
7. Robert Koch-Institut (RKI). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
8. Koch-Institut, R. Krebs in Deutschland | 2013/2014 | Bauchspeicheldrüse C25.
9. Rachstein, C. in *Viszeralchirurgie Fragen und Antworten*, edited by M. Heise (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015), pp. 65–80.
10. Gillen, S., Schuster, T., Zum Meyer Büschenfelde, C., Friess, H. & Kleeff, J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS medicine* **7**, e1000267; 10.1371/journal.pmed.1000267 (2010).
11. Muniraj, T., Jamidar, P. A. & Aslanian, H. R. Pancreatic cancer: a comprehensive review and update. *Disease-a-month : DM* **59**, 368–402; 10.1016/j.disamonth.2013.08.001 (2013).

12. Hruban, R. H., Canto, M. I., Goggins, M., Schulick, R. & Klein, A. P. Update on familial pancreatic cancer. *Advances in surgery* **44**, 293–311 (2010).
13. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T. & Takaori, K. Pancreatic cancer. *The Lancet* **388**, 73–85; 10.1016/S0140-6736(16)00141-0 (2016).
14. Ormanns, S. et al. Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinom. *Trillium Krebsmedizin* 2014 Band 23 Heft 3
15. Onkologie, H. :L. Kurzversion S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom.
16. Helm, O. et al. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PloS one* **9**, e94357; 10.1371/journal.pone.0094357 (2014).
17. Nakeeb, A. et al. Cholangiocarcinoma. *Annals of Surgery* **224**, 463–475; 10.1097/00000658-199610000-00005 (1996).
18. Charbel, H. & Al-Kawas, F. H. Cholangiocarcinoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, and diagnosis. *Current gastroenterology reports* **13**, 182–187; 10.1007/s11894-011-0178-8 (2011).
19. Ganeshan, D., Moron, F. E. & Szklaruk, J. Extrahepatic biliary cancer. New staging classification. *World journal of radiology* **4**, 345–352; 10.4329/wjr.v4.i8.345 (2012).
20. Rizvi, S., Khan, S. A., Hallemeier, C. L., Kelley, R. K. & Gores, G. J. Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nature reviews. Clinical oncology* **15**, 95–111; 10.1038/nrclinonc.2017.157 (2018).
21. Thaneer, M. et al. Quantitative Changes in Tumor-Associated M2 Macrophages Characterize Cholangiocarcinoma and their Association with Metastasis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **16**, 3043–3050; 10.7314/APJCP.2015.16.7.3043 (2015).
22. Vogel, A., Wege, H., Caca, K., Nashan, B. & Neumann, U. The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Deutsches Arzteblatt international* **111**, 748–754; 10.3238/arztebl.2014.0748 (2014).
23. Kobayashi, S. et al. A retrospective analysis of the clinical effects of neoadjuvant combination therapy with full-dose gemcitabine and radiation therapy in patients with

- biliary tract cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **43**, 763–771; 10.1016/j.ejso.2016.12.008 (2017).
24. Lewis, H. L., Rahnamai-Azar, A. A., Dillhoff, M., Schmidt, C. R. & Pawlik, T. M. Current Management of Perihilar Cholangiocarcinoma and Future Perspectives. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)* **112**, 193–207; 10.21614/chirurgia.112.3.193 (2017).
25. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444; 10.1038/nature07205 (2008).
26. Chang, J. H., Jiang, Y. & Pillarisetty, V. G. Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application: An updated review. *Medicine* **95**, e5541; 10.1097/MD.0000000000005541 (2016).
27. Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature reviews. Immunology* **6**, 836–848; 10.1038/nri1961 (2006).
28. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer. The next generation. *Cell* **144**, 646–674; 10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
29. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899; 10.1016/j.cell.2010.01.025 (2010).
30. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* **29**, 235–271; 10.1146/annurev-immunol-031210-101324 (2011).
31. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* **5**, 514; 10.3389/fimmu.2014.00514 (2014).
32. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* **27**, 16–25; 10.1016/j.coi.2014.01.004 (2014).
33. Naito, Y. et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* **58**, 3491–3494 (1998).

34. Demaria, S. et al. Cancer and inflammation. Promise for biologic therapy. *Journal of immunotherapy* (Hagerstown, Md. : 1997) **33**, 335–351; 10.1097/CJI.0b013e3181d32e74 (2010).
35. Garg, A. D., Krysko, D. V., Golab, J., Vandenabeele, P. & Agostinis, P. in *Endoplasmic Reticulum Stress in Health and Disease*, edited by P. Agostinis & S. Afshin (Springer Netherlands, Dordrecht, 2012), pp. 413–428.
36. Neoptolemos, J. P. et al. Therapeutic developments in pancreatic cancer. Current and future perspectives. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*; 10.1038/s41575-018-0005-x (2018).
37. Atanasov, G. et al. Prognostic significance of macrophage invasion in hilar cholangiocarcinoma. *BMC cancer* **15**, 790; 10.1186/s12885-015-1795-7 (2015).
38. Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. CD68/macrosialin. Not just a histochemical marker. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **97**, 4–13; 10.1038/labinvest.2016.116 (2017).
39. Allavena, P. & Mantovani, A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical and experimental immunology* **167**, 195–205; 10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x (2012).
40. Shabo, I., Olsson, H., Elkarim, R., Sun, X.-F. & Svanvik, J. Macrophage Infiltration in Tumor Stroma is Related to Tumor Cell Expression of CD163 in Colorectal Cancer. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **7**, 61–69; 10.1007/s12307-014-0145-7 (2014).
41. Fabrick, B. O., Dijkstra, C. D. & van den Berg, T. K. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* **210**, 153–160; 10.1016/j.imbio.2005.05.010 (2005).
42. Solinas, G. et al. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **185**, 642–652; 10.4049/jimmunol.1000413 (2010).

43. Morita, Y. et al. Pathologic evaluation of tumor-associated macrophage density and vessel inflammation in invasive breast carcinomas. *Oncology letters* **14**, 2111–2118; 10.3892/ol.2017.6466 (2017).
44. Nam, S. J. et al. An increase of M2 macrophages predicts poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leukemia & lymphoma* **55**, 2466–2476; 10.3109/10428194.2013.879713 (2014).
45. Ohri, C. M., Shikotra, A., Green, R. H., Waller, D. A. & Bradding, P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *The European respiratory journal* **33**, 118–126; 10.1183/09031936.00065708 (2009).
46. Miura, T. et al. Prognostic Impact of CD163+ Macrophages in Tumor Stroma and CD8+ T-Cells in Cancer Cell Nests in Invasive Extrahepatic Bile Duct Cancer. *Anticancer research* **37**, 183–190; 10.21873/anticancer.11304 (2017).
47. Kurahara, H. et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *The Journal of surgical research* **167**, 9; 10.1016/j.jss.2009.05.026 (2011).
48. Yoshikawa, K. et al. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer science* **103**, 2012–2020; 10.1111/j.1349-7006.2012.02411.x (2012).
49. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews. Cancer* **12**, 298–306; 10.1038/nrc3245 (2012).
50. Mlecnik, B. et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 610–618; 10.1200/JCO.2010.30.5425 (2011).
51. Forssell, J. et al. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the*

- American Association for Cancer Research **13**, 1472–1479; 10.1158/1078-0432.CCR-06-2073 (2007).
52. Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* **19**, 329–337; 10.1016/j.semcan.2009.05.003 (2009).
53. Fiedler, U. & Augustin, H. G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology* **27**, 552–558; 10.1016/j.it.2006.10.004 (2006).
54. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer* **3**, 401–410; 10.1038/nrc1093 (2003).
55. Matsubara, T. et al. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **57**, 1416–1425; 10.1002/hep.25965 (2013).
56. Palma, M. de & Naldini, L. Angiopoietin-2 TIEs up macrophages in tumor angiogenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 5226–5232; 10.1158/1078-0432.CCR-10-0171 (2011).
57. Germano, D. & Daniele, B. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis. *Hepatobiliary surgery and nutrition* **3**, 166–167; 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.06.04 (2014).
58. Ino, Y. et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British journal of cancer* **108**, 914–923; 10.1038/bjc.2013.32 (2013).
59. Schulz, P. et al. Angiopoietin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 3325–3335; 10.1096/fj.11-182287 (2011).
60. Kitano, Y. et al. Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *British journal of cancer* **118**, 171–180; 10.1038/bjc.2017.401 (2018).
61. Hasita, H. et al. Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer science* **101**, 1913–1919; 10.1111/j.1349-7006.2010.01614.x (2010).

62. Atanasov, G. et al. Prognostic significance of TIE2-expressing monocytes in hilar cholangiocarcinoma. *Journal of surgical oncology* **114**, 91–98; 10.1002/jso.24249 (2016).
63. Swanson, P. E. Foundations of immunohistochemistry. A practical review. *American journal of clinical pathology* **90**, 333–339 (1988).
64. Hasan, J., Byers, R. & Jayson, G. C. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *British journal of cancer* **86**, 1566–1577; 10.1038/sj.bjc.6600315 (2002).
65. Vermeulen, P. B. et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *European Journal of Cancer* **38**, 1564–1579; 10.1016/S0959-8049(02)00094-1 (2002).
66. Weidner, N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Tr* **36**, 169–180; 10.1007/BF00666038 (1995).
67. Zhang, Q.-w. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor. A meta-analysis of the literature. *PloS one* **7**, e50946; 10.1371/journal.pone.0050946 (2012).
68. Italiani, P. & Boraschi, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* **5**, 514; 10.3389/fimmu.2014.00514 (2014).
69. Goede, V. et al. Analysis of Tie2-expressing monocytes (TEM) in patients with colorectal cancer. *Cancer investigation* **30**, 225–230; 10.3109/07357907.2011.636114 (2012).
70. Mazziari, R. et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer cell* **19**, 512–526; 10.1016/j.ccr.2011.02.005 (2011).
71. Palma, M. de, Murdoch, C., Venneri, M. A., Naldini, L. & Lewis, C. E. Tie2-expressing monocytes. Regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends in immunology* **28**, 519–524; 10.1016/j.it.2007.09.004 (2007).
72. Turrini, R. et al. TIE-2 expressing monocytes in human cancers. *Oncoimmunology* **6**, e1303585; 10.1080/2162402X.2017.1303585 (2017).

73. Galon, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 1960–1964; 10.1126/science.1129139 (2006).
74. Noonan, D. M., Lerma Barbaro, A. de, Vannini, N., Mortara, L. & Albini, A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer metastasis reviews* **27**, 31–40; 10.1007/s10555-007-9108-5 (2008).
75. Brown, J. M., Recht, L. & Strober, S. The Promise of Targeting Macrophages in Cancer Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*; 10.1158/1078-0432.CCR-16-3122 (2017).
76. Schmuck, R. B., Carvalho-Fischer, C. V. de, Neumann, C., Pratschke, J. & Bahra, M. Distal bile duct carcinomas and pancreatic ductal adenocarcinomas: postulating a common tumor entity. *Cancer medicine* **5**, 88–99; 10.1002/cam4.566 (2016).
77. Germano, G. et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer cell* **23**, 249–262; 10.1016/j.ccr.2013.01.008 (2013).
78. Jayson, G. C., Kerbel, R., Ellis, L. M. & Harris, A. L. Antiangiogenic therapy in oncology. Current status and future directions. *The Lancet* **388**, 518–529; 10.1016/S0140-6736(15)01088-0 (2016).
79. Park, J.-S. et al. Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer cell* **30**, 953–967; 10.1016/j.ccell.2016.10.018 (2016).

Anlagen

- Anlage 1** Korrelationen von Angiopoietin 2 im Tumorzentrum und pathohistologische Daten von Patienten mit Pankreaskarzinom
- Anlage 2** Darstellung von Korrelationen zwischen M2-Makrophagen in der Tumordinvasionsfront und klinisch-pathohistologischen Parametern von Patienten mit Gallengangskarzinom
- Anlage 3** Korrelationen von Tie-2-exprimierenden Makrophagen im Tumorzentrum und klinisch-pathohistologische Daten von Patienten mit Gallengangskarzinom
- Anlage 4** Übersicht relevanter klinisch-pathologischer Daten und ihr Einfluss auf das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom
- Anlage 5** Übersicht relevanter klinisch-pathologischer Daten und ihr Einfluss auf das Überleben der Patienten mit Gallengangskarzinom

Anlage 1: Korrelationen von Angiopoietin 2 im Tumorzentrum und pathohistologische Daten von Patienten mit Pankreaskarzinom

Klinisch-pathohistologische Daten	ANG 2 HIGH	ANG 2 LOW	Signifikanz p
Anzahl Patienten	n=80	n=26	
Tumorgröße			0,177
T1/T2	21 (26,2%)	3 (11,5%)	
T3/T4	59 (73,8%)	23 (88,5%)	
Lymphknotenbefall			0,963
Vorhanden	25 (31,2%)	8 (30,8%)	
Nicht vorhanden	55 (68,8%)	18 (69,2%)	
Infiltration von Lymphgefäßen			0,046
Vorhanden	13 (16,2%)	9 (34,6%)	
Nicht Vorhanden	67 (83,8%)	17 (65,4%)	
Infiltration venöser Gefäße			0,205
Vorhanden	57 (71,3%)	22 (84,6%)	
Nicht Vorhanden	23 (28,7%)	4 (15,4%)	
Infiltration Perineuralscheiden			0,004
Vorhanden	20 (25,0%)	15 (57,7%)	
Nicht Vorhanden	60 (75,0%)	11 (42,3%)	
Fernmetastase			0,919
Vorhanden	36 (45,0%)	12 (46,2%)	
Nicht vorhanden	44 (55,0%)	14 (53,8%)	
Lokalrezidiv			0,845
Vorhanden	17 (21,2%)	6 (23,1%)	
Nicht vorhanden	63 (78,8%)	20 (76,9%)	
MVD			0,061
Stark	32 (40,0%)	5 (19,2%)	
Gering	48 (60,0%)	21 (80,8%)	
TEMs in TCA *			0,676
Positiv	5 (6,4%)	2 (8,0%)	
Negativ	73 (93,6%)	23 (92,0%)	

* Einige Gewebeproben von Tumorrektaten konnten aufgrund fortgeschrittener Nekrotisierung während des Färbevorgangs nicht erhalten werden, und entfielen bei der histologischen Beurteilung. Daraus ergeben sich abweichende n-Zahlen in den statistischen Erhebungen.

Anlage 2: Darstellung von Korrelationen zwischen M2-Makrophagen in der Tumorinvasionsfront und klinisch-pathohistologischen Parametern von Patienten mit Gallengangskarzinom

Klinisch-pathohistologische Daten	CD163+TAMs positiv	CD163+TAMs negativ	Signifikanz p
Anzahl Patienten	n=25	n=10	
Geschlecht			0,447
Weiblich	9 (36,0%)	2 (20,0%)	
Männlich	16 (64,0%)	8 (80,0%)	
Alter			0,689
≤60 Jahre	7 (28,0%)	4 (40,0%)	
>60 Jahre	18 (72,0%)	6 (60,0%)	
Lymphknotenbefall			0,712
Vorhanden	15 (60,0%)	5 (50,0%)	
Nicht vorhanden	10 (40,0%)	5 (50,0%)	
Infiltration von Lymphgefäßen			0,542
Vorhanden	22 (88,0%)	10 (100%)	
Nicht Vorhanden	3 (12,0%)	0 (0,0%)	
Infiltration venöser Gefäße			0,258
Vorhanden	7 (28,0%)	5 (50,0%)	
Nicht Vorhanden	18 (72,0%)	5 (50,0%)	
Infiltration Perineuralscheiden			0,652
Vorhanden	21 (81,0%)	9 (90,0%)	
Nicht Vorhanden	4 (16,0%)	1 (10,0%)	
R-Stadium			0,851
R0	23 (92,0%)	9 (90,0%)	
R1/R2	2 (8,0%)	1 (10,0%)	
Peritonealkarzinose			0,496
Vorhanden	24 (96,0%)	9 (90,0%)	
Nicht vorhanden	1 (4,0%)	1 (10,0%)	
MVD			0,266
Stark	16 (64,0%)	4 (40,0%)	
Gering	9 (36,0%)	6 (60,0%)	
CD68+TAMs in TCA *			0,030
Positiv	10 (45,5%)	0 (0,0%)	
Negativ	12 (54,5%)	9 (100%)	

Anlage 3: Korrelationen von Tie-2-exprimierenden Makrophagen im Tumorzentrum und klinisch-pathohistologische Daten von Patienten mit Gallengangskarzinom

Klinisch-pathohistologische Daten	TEMs positiv	TEMs negativ	Signifikanz p
Anzahl Patienten	n=25	n=17	
Geschlecht			0,531
Weiblich	10 (40,0%)	5 (29,4%)	
Männlich	15 (60,0%)	12 (70,6%)	
Alter			0,058
≤60 Jahre	6 (24,0%)	9 (52,9%)	
>60 Jahre	19 (76,0%)	8 (47,1%)	
Lymphknotenbefall			0,212
Vorhanden	8 (32,0%)	9 (52,9%)	
Nicht vorhanden	17 (68,0%)	8 (47,1%)	
Infiltration von Lymphgefäßen			0,556
Vorhanden	1 (4,0%)	2 (11,8%)	
Nicht Vorhanden	24 (96,0%)	15 (88,2%)	
Infiltration venöser Gefäße			0,963
Vorhanden	16 (64,0%)	11 (64,7%)	
Nicht Vorhanden	9 (36,0%)	6 (35,3%)	
Infiltration Perineuralscheiden			0,070
Vorhanden	5 (20,0%)	0 (0,0%)	
Nicht Vorhanden	20 (80,0%)	17 (100%)	
R-Stadium			0,635
R0	22 (88,0%)	16 (94,1%)	
R1/R2	3 (12,0%)	1 (5,9%)	
Grading			0,504
Gut	12 (48,0%)	9 (64,3%)	
Moderat/schlecht	13 (52,0%)	5 (35,7%)	
Fernrezidiv			0,744
Vorhanden	8 (32,0%)	7 (41,2%)	
Nicht vorhanden	17 (68,0%)	10 (58,8%)	
MVD			0,028
Stark	16 (64,0%)	5 (29,4%)	
Gering	9 (36,0%)	12 (70,6%)	

Anlage 4: Übersicht relevanter klinisch-pathologischer Daten und ihr Einfluss auf das Überleben der Patienten mit Pankreaskarzinom

Klinisch-pathologische Parameter		Gesamtüberleben			Rezidivfreies Überleben		
Variable	Charakteristik	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	Signifikanz p	Odds Ratio	95%- Konfidenzintervall	Signifikanz p
Geschlecht	Weiblich/Männlich	0,996	0,606-1,637	0,988	1,275	0,718-2,266	0,407
Alter	<60/>60 Jahre	1,331	0,814-2,175	0,254	0,873	0,501-1,519	0,630
Operationsdauer	<300/>300min	1,308	0,771-2,221	0,319	1,613	0,841-3,095	0,150
Stationärer Aufenthalt	<21/>21 Tage	1,339	0,821-2,182	0,242	0,979	0,565-1,696	0,940
Adjuvante Chemotherapie	Ja/Nein	0,730	0,442-1,204	0,217	0,351	0,194-0,636	0,001*
T-Stadium	T1 und 2/T3 und 4	1,250	0,691-2,262	0,460	1,308	0,654-2,616	0,447
N-Stadium	Ja/nein	2,314	1,258-4,258	0,007	2,254	1,154-4,404	0,017
Infiltration Lymphgefäße	Ja/Nein	2,442	1,227-4,862	0,011	1,531	0,741-3,163	0,250
Gefäß- infiltration	Ja/Nein	1,799	1,035-3,128	0,037	1,813	0,978-3,360	0,059
Infiltration Perineuralscheiden	Ja/Nein	1,857	1,058-3,259	0,031	1,321	0,725-2,405	0,363
R-Stadium	R0/R1	1,023	0,607-1,724	0,931	0,895	0,481-1,663	0,725
Metastasen	Ja/Nein	0,341	0,206-0,566	<0,001	/	/	/
Lokalrezidiv	Ja/Nein	0,514	0,300-0,881	0,016	/	/	/
Fernrezidiv	Ja/Nein	0,292	0,172-0,496	<0,001	/	/	/

Anlage 5: Übersicht relevanter klinisch-pathologischer Daten und ihr Einfluss auf das Überleben der Patienten mit Gallengangskarzinom

Klinisch-pathologische Parameter		Gesamtüberleben			Rezidivfreies Überleben		
Variable	Charakteristik	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz p	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	Signifikanz p
Geschlecht	Weiblich/Männlich	0,728	0,349-1,518	0,397	0,877	0,296-2,603	0,813
Alter	<60/>60 Jahre	1,103	0,515-2,366	0,801	0,774	0,275-2,178	0,627
N-Stadium	Ja/nein	2,280	1,027-5,064	0,043	3,607	0,999-13,028	0,050
Infiltration Gefäße	Ja/Nein	1,426	0,727-2,795	0,302	1,490	0,576-3,852	0,411
Infiltration Perineuralscheiden	Ja/Nein	0,484	0,165-1,425	0,188	/	/	/
R-Stadium	R0/R1	0,685	0,162-2,899	0,607	1,441	0,317-6,555	0,636
Grading	Gut/Schlecht	3,756	1,554-9,080	0,003	2,077	0,626-6,891	0,232
Peritonealkarzinose	Ja/Nein	0,946	0,268-3,347	0,932	1,822	0,210-15,811	0,586

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 2 Verwendete Geräte	15
Tabelle 3 Verwendete Chemikalien.....	16
Tabelle 4 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und deren Charakteristika	17
Tabelle 5 Durchführungsprotokoll der Färbung mit PAP-Methode	20
Tabelle 6 Einteilung der Patientengruppen mit Pankreaskarzinom (PDAC)	22
Tabelle 7 Einteilung der Patientengruppen mit Gallengangskarzinom (dCCA)	23
Tabelle 8 Übersicht zu klinisch-pathologischen Parametern der untersuchten Patienten	27
Tabelle 9 Darstellung von Korrelationen zwischen M2-Makrophagen in der	
Tumorinvasionsfront und klinisch-pathohistologischen Parametern von Patienten mit	
Pankreaskarzinom.....	33
Tabelle 10 Korrelationen von Tie-2-exprimierenden Makrophagen im Tumorzentrum und.....	
klinisch-pathohistologischen Parametern im Pankreaskarzinom.....	35

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.....	2
Abbildung 2: Phasen des Immunoediting vom Tumorzellen.....	7
Abbildung 3: Differenzierung und Funktion von Makrophagen-Subtypen.....	9
Abbildung 4 Darstellung der Histomorphologie vom Pankreas- und Gallengangskarzinom	25
Abbildung 5: Darstellung der Tumorinvasionsfront und des Tumorzentrums im..... Pankreaskarzinom (PDAC)	29
Abbildung 6: Immunhistologische Färbungen im Pankreas- (PDAC) und Gallengangskarzinom (dCCA)	31
Abbildung 7: Überlebensdaten der Patienten mit Pankreaskarzinom im Hinblick auf die Präsenz von Tumor-assoziierten M2-Makrophagen (TAMs) und Tie-2-exprimierenden..... Makrophagen (TEMs).....	37
Abbildung 8: Gesamtüberlebensdaten der Patienten mit Gallengangskarzinom im Hinblick .. auf die Präsenz von CD68+Makrophagen (CD68+TAMs)	38

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift