

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom: Eine Tissue Microarray Studie an 599 Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Devita Irene Putri
aus Bandung, Indonesien

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.02.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Carsten Bokemeyer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	5
II. Abbildungsverzeichnis	7
III. Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung	9
1.1. Pankreaskarzinom.....	9
1.2. Mikrosatelliteninstabilität	14
1.2.1. Mikrosatelliten und Mikrosatelliteninstabilität.....	14
1.2.2. DNA- <i>Mismatch</i> -Reparatur (MMR)-System	16
1.2.3. Diagnostik der Mikrosatelliteninstabilität.....	18
1.2.4. Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom.....	21
1.3. Ziele der Studie.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1. <i>Tissue-Microarray</i> -Technik.....	23
2.2. Patientenkollektiv	24
2.3. Strategien für die Identifikation von mikrosatelliteninstabilen Tumoren	27
2.4. Immunhistochemie	27
2.4.1. MMR-Immunhistochemie.....	27
2.4.2. CD8-Immunhistochemie	28
2.5. Auswertung.....	29
2.5.1. Auswertung der MMR-Immunhistochemie	29
2.5.2. Auswertung der CD8-Immunhistochemie	30
2.6. Mikrosatelliten-PCR	31
2.6.1. Auswertung der Mikrosatelliten-PCR.....	34
2.7. Statistik	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Mikrosatelliteninstabilität	35

3.1.1. Auswertbarkeit	35
3.1.2. Identifikation von verdächtigen Fällen	35
3.1.3. Großschnitt-Analysen, Heterogenität und PCR-Validierung.....	39
3.1.4. Intensität der MMR-Immunfärbung im Vergleich zum Tumorphänotyp.....	39
3.1.5. Intensität der MMR-Immunfärbung im Vergleich zur TumorgroÙe	43
3.2. CD8 ⁺ -Lymphozytendichte	45
3.2.1. Auswertbarkeit	45
3.2.2. Vergleich der CD8 ⁺ -Lymphozytendichte mit dem Tumorphänotyp	46
3.2.3. Vergleich der CD8 ⁺ -Lymphozytendichte mit der Färbung der MMR-Marker...	48
4. Diskussion	50
5. Zusammenfassung	56
6. Summary	57
7. Literaturverzeichnis.....	58
8. Danksagung	68
9. Lebenslauf	69
10. Eidesstattliche Versicherung	71

I. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
CA	<i>Carbohydrate-Antigen</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
DAB	3-3-Diaminobenzidin
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
Eppi	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FU	Fluorouracil
FOLFIRINOX	5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IHC	Immunhistochemie
IPMN	Intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie
MLH	MutL-Homolog
MSH	MutS-Homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD1	<i>Program Death-Rezeptor 1</i>
PDL1	<i>Program Death-Ligand 1</i>
p-T/N/M	pathologisches Stadium von Tumor, Nod(ul)us/Lymphknoten oder Metastase
pMX	pathologischer Metastasenstatus kann nicht beurteilt werden
pNX	pathologischer Status der regionären Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pTX	pathologisches Tumorstadium kann nicht beurteilt werden
R-Status	Resektionsstatus / Status des chirurgischen Resektionsrandes
R0	Kein Residualtumor / Resektion im Gesunden
R1	Mikroskopischer Residualtumor

RX	Das Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM	Tumor, Nod(ul)us / Lymphknoten, Metastase
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Liu et al., 2017): Der Mechanismus des MMR-Systems.....	17
Abbildung 2 (Westwood et al., 2019): Beispiel eines immunhistochemischen Befund.	18
Abbildung 3 (Baudrin et al., 2018): PCR Untersuchung für den Nachweis einer MSI.....	19
Abbildung 4 (Baudrin et al., 2018): Next Generation Sequencing	20
Abbildung 5: TMA-Gerät.....	23
Abbildung 6: TMA-Koordinatensystem	24
Abbildung 7. Pankreas TMA-Blöcke.....	26
Abbildung 8: TMA Array A Quadrant A - Färbung MLH1-Immunhistochemie	30
Abbildung 9: Immunhistochemische Befunde vom TMA-Spot Koordinate A-B51	36
Abbildung 10: A: MSH2-positiver Befund im Großschnitt vom TMA-Spot Koordinate A-B51; B: Vergrößerung des markierten Areals.....	37
Abbildung 11: A: MSH6-negativer Befund im Großschnitt vom TMA-Spot Koordinate A- B51; B: Vergrößerung des markierten Areals.....	37
Abbildung 12: Tumorgroße und Expressionsniveau von MMR-Proteinen.	44
Abbildung 13: Beispiele von Gewebespots mit unterschiedlicher CD8 ⁺ -Lymphozytendichte.	45
Abbildung 14: Verteilung der CD8 ⁺ -Lymphozytendichte beim Pankreaskarzinom.....	45
Abbildung 15: CD8 ⁺ -Lymphozytendichte und Tumorphänotyp (pT, pN und pM).	46
Abbildung 16: CD8 ⁺ -Lymphozytendichte, Differenzierungsgrad und R-Status.	47
Abbildung 17: CD8 ⁺ -Lymphozytendichte und Tumorgroße.	47
Abbildung 18: CD8 ⁺ -Lymphozytendichte und Expressionsniveau von MMR-Proteinen.....	48
Abbildung 19: MMR-Status und CD8 ⁺ -Lymphozytendichte.	49

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms von UICC (Cong et al., 2018).....	10
Tabelle 2: Stadium des Pankreaskarzinom von UICC (Cong et al., 2018).....	10
Tabelle 3 (Bonneville et al., 2017): Häufigkeit der MSI in 39 Tumortypen.....	15
Tabelle 4 (Luchini et al., 2021): Häufigkeit der MSI beim Pankreaskarzinom.....	21
Tabelle 5: Beispiel eines TMA-Datenfiles.....	24
Tabelle 6: pT-Klassifikation.....	25
Tabelle 7: pN-Klassifikation.....	25
Tabelle 8: pM-Klassifikation und Resektionsstatus (R-Status).....	26
Tabelle 9: Liste von den Normalgewebe.....	27
Tabelle 10: Verwendete Antikörper und Bedingungen der Immunhistochemie.....	28
Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendete Primer.	32
Tabelle 12: verwendete Primer.	33
Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.	33
Tabelle 14: Thermocycler-Programm.	34
Tabelle 15: Anzahl der Auswertbarkeit der 4 MMR-Proteine.	35
Tabelle 16: MMR-immunhistochemische-Befunde von 6 Tumoren mit Verdacht auf MMR-Defekt.	38
Tabelle 17: Ergebnisse der immunhistochemischen Großschnittanalyse und PCR-Untersuchung.	39
Tabelle 18: MLH1-Färbung und Tumorphänotyp.....	40
Tabelle 19: PMS2-Färbung und Tumorphänotyp.	41
Tabelle 20: MSH2-Färbung und Tumorphänotyp.....	42
Tabelle 21: MSH6-Färbung und Tumorphänotyp.....	43

1. Einleitung

1.1. Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist nach dem kolorektalen Karzinom das zweithäufigste Karzinom des Gastrointestinaltraktes in Deutschland (Erdmann et al., 2021). Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen und bei beiden Geschlechtern ist das Pankreaskarzinom mit einem Anteil von 8,7 % (Frauen) bzw. 7,4 % (Männer) die vierthäufigste Krebstodesursache (Erdmann et al., 2021). Jährlich erkranken in Deutschland ca. 19.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom (Erdmann et al., 2021). Die Diagnose wird meistens im höheren Lebensalter zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr gestellt, wobei das mittlere Erkrankungsalter 76 Jahre bei Frauen und 72 Jahre bei Männern beträgt (Kamisawa et al., 2016, Erdmann et al., 2021). Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist unklar (Hidalgo, 2010). Wenige Fälle können durch eine familiäre Prädisposition erklärt werden (Hidalgo, 2010, Kamisawa et al., 2016, Capasso et al., 2018). Außerdem gibt es bei verschiedenen genetischen Syndromen eine Häufung von Pankreaskarzinomen wie beispielsweise beim familiären Pankreaskarzinom. Verschiedene Erkrankungen sind mit einem erhöhten Risiko für das Pankreaskarzinom assoziiert wie die hereditäre Pankreatitis, das Peutz-Jeghers-Syndrom, das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom, das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis, das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (Lynch Syndrom), die Ataxia teleangiectatica und die zystische Fibrose (Hidalgo, 2010, Kamisawa et al., 2016, Capasso et al., 2018). Die Bedeutung exogener Risikofaktoren ist unklar. Als Risikofaktoren gelten Rauchen, Alkoholabusus, chronische Pankreatitis, langjähriger Diabetes Mellitus und Adipositas (Hidalgo, 2010, Kamisawa et al., 2016, Capasso et al., 2018).

Die Symptomatik des Pankreaskarzinoms ist lange sehr diskret (Kamisawa et al., 2016). Viele Pankreaskarzinome manifestieren sich erst spät durch unspezifische Bauchschmerzen (Kamisawa et al., 2016, Chu et al., 2017, Zhao et al., 2017). Klassische, mit dem Pankreaskarzinom assoziierte Symptome sind auch ein schmerzloser Ikterus oder ein sogenanntes Courvoisier-Zeichen (eine prall gefüllte und schmerzlose Gallenblase mit Ikterus aufgrund eines Verschlusses des Ductus choledochus) (De La Cruz et al., 2014). Weitere Symptome sind Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Adynamie, Gewichtsverlust, Anorexie, Rückenschmerzen und eine pathologische Glukosetoleranz (Hidalgo, 2010, De La Cruz et al., 2014, Kamisawa et al., 2016). Die Diagnose des Pankreaskarzinoms erfolgt in der Regel mittels Bildgebung, welche beispielsweise durch Sonographie, Endosonographie, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie mit Magnetresonanztomographie

Cholangiopankreatikographie erfolgt (AWMF, 2021). Das klassische und pathognomische Zeichen für das Pankreaskopfkarzinom ist das sogenannte „*double duct sign*“, ein Verschluss von Pankreas- und Gallengang durch den Tumor, der zur Ausweitung der beiden Gänge führt (Chu et al., 2017, Inoue et al., 2003). Die endoskopische Ultraschall-gesteuerte Feinnadelaspiration ist aufgrund ihrer Sicherheit, hohen Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit eine sehr gute Methode für die Diagnose eines Pankreaskarzinom (Iglesias-Garcia et al., 2014, Zhang et al., 2018, Kamisawa et al., 2016). Falls allerdings ein hoher Verdacht auf ein potenziell resektables Pankreaskarzinom besteht, sollte es primär reseziert werden und eine präoperative Biopsie ist dann nicht nötig (Vincent et al., 2011, AWMF, 2021). Serologisch können sich Pankreaskarzinome mit vermehrtem Nachweis von Tumormarker-proteinen wie CA 19-9 und CEA manifestieren (Hidalgo, 2010, Zhang et al., 2015, Kamisawa et al., 2016, AWMF, 2021).

Häufig sind Pankreaskarzinome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht operabel (Ciambella et al., 2018, Kamisawa et al., 2016, Vincent et al., 2011, Zhang et al., 2018). Die Operabilität hängt in erster Linie von der lokalen Tumorausdehnung und dem Vorliegen von Fernmetastasen (Kamisawa et al., 2016). Die lokale Tumorausdehnung wird nach den Vorgaben von Union for International Cancer Control (UICC) im TNM-Stadium klassifiziert. Die Definitionen der TNM-Stadien sind in der Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms von UICC (Cong et al., 2018)

T1	Tumordiameter ≤ 2 cm
T2	Tumordiameter > 2 bis ≤ 4 cm
T3	Tumordiameter > 4 cm
T4	Tumor mit Infiltration des Truncus coeliacus, A. hepatica communis oder A. mesenterica superior
N0	Keine regionale Lymphknotenmetastase
N1	Metastase in 1-3 regionalen Lymphknoten
N2	Metastase in ≥ 4 regionalen Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastase
M1	Fernmetastase

Tabelle 2: Stadium des Pankreaskarzinom von UICC (Cong et al., 2018)

Stadium/TNM	T	N	M
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-T3	N1	M0
III	T4 (alle T)	alle N (N2)	M0
IV	alle T	alle N	M1

Die meisten Pankreaskarzinome liegen im Pankreaskopf, welches 60-70 % der Pankreasneoplasien entspricht. Bei der überwiegenden Mehrzahl (>85 %) handelt es sich um duktale Adenokarzinome, welche histologisch durch eine hohe Stromabeimengung charakterisiert sind (Ryan et al., 2014, Zhang et al., 2018). Die häufigste Vorstufe eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas sind pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN), welche in Stadien PanIN-1A, -1B, -2 und -3 unterteilt werden und häufig ist neben dem Adenokarzinom auch noch eine Vorstufe im Sinne einer intraduktal papillär-muzinösen Neoplasie (IPMN) zu finden (Hidalgo, 2010, Ryan et al., 2014). In ca. 10% der malignen Pankreastumoren handelt es sich um seltene Pankreaskarzinome wie muzinöse Zystadenokarzinome, adenosquamöse Karzinome, anaplastische Karzinome, Azinuszellkarzinome sowie funktionierende und nicht funktionierende neuroendokrine Tumore (Fitzgerald et al., 2008). Seltenerweise manifestieren sich auch maligne Lymphome primär in Pankreas. An diese Diagnose muss gedacht werden, wenn unverhältnismäßig ausgedehnte Lymphknotenmetastasen in der Bildgebung zu erkennen sind (Anand et al., 2016).

Die einzige kurative Therapie des Pankreaskarzinoms besteht in der chirurgischen Resektion (Vincent et al., 2011, Ryan et al., 2014, Kamisawa et al., 2016). Diese wird deswegen bei allen operablen Tumoren im Stadium I-III unbedingt angestrebt und im Anschluss sollte bei einem ECOG-Score (Eastern Cooperative Oncology Group) von ≤ 2 eine adjuvante Chemotherapie erfolgen (AWMF, 2021). Sie erfolgt bei einem ECOG-Score von ≤ 1 mit 5-Fluorouracil (FU), Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem sogenannten FOLFIRINOX-Protokoll und bei einem ECOG-Score von 2 entweder nur mit Gemcitabin oder mit der Kombination von Gemcitabin und Capecitabin (AWMF, 2021). Nach erfolgreicher (R0) Operation kommt es allerdings nur selten zum Langzeitüberleben (Oettle et al., 2013). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate weist mit 10 % bei beiden Geschlechtern in Deutschland die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf (Erdmann et al., 2021). Die durchschnittliche Überlebenszeit von operierten Patient:innen beträgt 17-27 Monate, bei lokal fortgeschrittenen und inoperablen Pankreaskarzinomen (Stadium III) 8-12 Monate und beim Vorliegen einer Fernmetastase (Stadium IV) 4-6 Monate (Gong et al., 2016). In den meisten Fällen kommt es trotz erfolgreicher Operation zu einer Fernmetastasierung, vor allem in die Leber und die Lunge oder zu einer lokalen Ausbreitung mit Peritonealkarzinose. Die Entwicklung von ausgedehnten intraperitonealen Tumormassen und massiven Aszites sind auch möglich (Cannistrà et al., 2015, Hishinuma et al., 2006, Lu et al., 2015).

Die therapeutischen Möglichkeiten sind im Falle einer Metastasierung bzw. intraabdominellen Tumorausdehnung limitiert. Bei gutem Allgemeinzustand der Patient:innen wird eine aggressive Chemotherapie mit FOLFIRINOX-Schema durchgeführt (Conroy et al., 2011, Kamisawa et al., 2016, Pusceddu et al., 2019, AWMF, 2021). Bei eingeschränktem Allgemeinzustand kommt eine Kombinationstherapie mit Gemcitabine und nab-Paclitaxel in Frage und bei reduziertem Allgemeinzustand wird Gemcitabin als Monotherapie empfohlen (Von Hoff et al., 2013, Kamisawa et al., 2016, Kang et al., 2018, Pusceddu et al., 2019, AWMF, 2021). Die Ansprechrate auf diese Therapien liegt bei 31,6 % mit FOLFIRINOX und 23 % mit Gemcitabine/nab-Paclitaxel (Conroy et al., 2011, Von Hoff et al., 2013). Bei Progress unter der Erstlinientherapie und bei einem ECOG-Score ≤ 2 sollte eine Zweitlinientherapie mit Kombinationen aus 5-FU/Folinsäure mit Irinotecan oder Oxaliplatin oder eine Monotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU/Folinsäure durchgeführt werden (Sohal et al., 2018).

Die klassische Chemotherapie wie beispielsweise mit dem FOLFIRINOX-Schema oder Gemcitabine ist eine zytostatische Therapie, welche sämtliche proliferierenden Zellen betrifft (Adel, 2019, Corrie, 2011). Da Karzinome wachsende Gewebe darstellen, bestehen sie aus Zellen, welche sich überdurchschnittlich häufig teilen. Diesen Effekt macht man sich bei zytostatischen Medikamenten zu Nutze (Corrie, 2011, Freissmuth, 2016). Gleichzeitig wirken diese Medikamente auch auf die übrigen schnell wachsenden Gewebe der Patient:innen, wie beispielsweise die Blutzellen, das Darmepithel, oder auch der Haarwuchs (Corrie, 2011, Freissmuth, 2016). In diesen Organen entstehen teilweise substanzielle Nebenwirkungen. Ein neues, alternatives Konzept der medikamentösen Tumorthherapie betrifft nicht direkt die Tumorzellen, sondern basiert auf der Idee, dass durch eine Aktivierung des körpereigenen Immunsystems die existierenden Immunzellen bei der Bekämpfung eines Tumors unterstützt werden (Kreamer, 2014). Vom besonderen Interesse sind aktuell die sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren, welche physiologische Systeme bremsen, die den Zweck haben, eine überschießende Immunreaktion zu blockieren (Kreamer, 2014). Dabei kommt es zu einer überschießenden Immunreaktion unter anderem gegen die Tumorzellen (Kreamer, 2014). Die meisten aktuell zugelassenen Medikamente betreffen das Regelsystem vom *Program Death-Rezeptor 1* (PD1) und dessen Liganden – *Program Death-Ligand 1* (PDL1). PD1 wird physiologischer Weise auf aktivierten T-, B-Lymphozyten oder natürlichen Killerzellen exprimiert, welche direkt Tumorzellen angreifen können (Granier et al., 2017). Die Bindung von PDL1 an seinen Rezeptor PD1 auf T-Lymphozyten führt zu einer Hemmung der Aktivität der T-Lymphozyten (Granier et al., 2017). Verschiedene Tumoren exprimieren aberrant PDL1, um sich der Immunantwort der betroffenen Patient:innen zu entziehen (Lee et al., 2019).

Immuncheckpoint-Inhibitoren wie das System PD1/PDL1 bestehen aus Antikörpern, welche die Aktivität von PD1 oder PDL1 inhibieren (Lee et al., 2019). Bei verschiedenen Tumorarten haben Immuncheckpoint-Inhibitoren zu spektakulären Erfolgen geführt (Kim and Park, 2019). Hervorzuheben ist das metastasierende Melanom. Während Patient:innen mit einem metastasierten Melanom früher an ihrem Tumor in kurzer Zeit verstorben sind, können heute durch Immuncheckpoint-Inhibitoren viele dieser Patient:innen geheilt werden, sehr wahrscheinlich auch dauerhaft (Wilden et al., 2016). Immuncheckpoint-Inhibitoren wirken nicht bei allen Tumoren (Kim and Park, 2019). Bei vielen Patient:innen zeigen die Tumoren keinerlei Reaktion auf die Therapie. Die Forschung zu möglichen prädiktiven Faktoren, welche ein Ansprechen oder auch nicht Ansprechen eines Tumors auf einen Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie voraussagen, läuft dementsprechend in vollem Gange. Die am meisten diskutierten und auch untersuchten prädiktiven Parameter sind Expression von PDL1, die Anzahl der Lymphozyten in Tumoren, das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) sowie eine hohe Anzahl von Mutationen in einem Tumor (Havel et al., 2019, Darvin et al., 2018). Die genannten Parameter sind aus biologischer Sicht sehr plausible Prädiktoren. Exprimiert ein Tumor oder die Mikroumgebung des Tumors im hohen Ausmaß PDL1, ist davon auszugehen, dass die Immunantwort auf diesen Tumor durch die PD1/PDL1-Achse inhibiert wird, sodass ein Medikament, was an diesem Punkt angreift, eine höhere Erfolgschance haben dürfte (Havel et al., 2019). Eine hohe Anzahl an Lymphozyten im Tumor dürfte eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor sein (Darvin et al., 2018). Es wäre vernünftig anzunehmen, dass eine Entthemmung von Lymphozyten dann besonders Sinn macht, wenn auch viele Lymphozyten im Gewebe vorhanden sind (Darvin et al., 2018). Bei Tumoren mit nachgewiesener MSI oder generell hoher Mutationslast sind überdurchschnittlich viele Gene der Tumorzellen pathologisch verändert (Havel et al., 2019). Da eine Immunantwort sich gegen als „fremd“ erkannte Proteine richten muss, dürfte eine höhere Zahl potenziell aberranter Proteine mit einer größeren Chance einhergehen, dass im Tumor auch für eine Immunantwort geeignete abnormale Proteine vorkommen (Havel et al., 2019). Studien zur Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren haben beim Pankreaskarzinom zunächst sehr enttäuschende Ergebnisse gezeigt (Kabacaoglu et al., 2018, Henriksen et al., 2019).

Eine neuere Studie, welche sich nicht primär mit Pankreaskarzinomen beschäftigte, sondern mit soliden Tumoren aller Art mit einer MSI, hat am 23. Mai 2017 zur Zulassung des gegen PD1 gerichteten Immuncheckpoint-Inhibitors Pembrolizumab bei allen soliden Tumoren mit MSI geführt, unabhängig vom Tumorursprung (Marcus et al., 2019). In der für die

Zulassung dieses Medikaments entscheidenden Studie wurden 8 Pankreaskarzinome eingeschlossen, wovon 2 Patient:innen ein vollständiges Ansprechen, 3 Patient:innen ein partielles Ansprechen und 1 Patient eine stabile Erkrankung zeigten (Le et al., 2017). Die restliche 2 Patient:innen waren aber nach RECIST-Kriterien (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*) nicht auswertbar (Le et al., 2017). Diese Studie eröffnet also für mikrosatelliteninstabile Pankreaskarzinome eine neue Therapieoption, welche potenziell sehr vielversprechend ist.

1.2. Mikrosatelliteninstabilität

Die Bedeutung und die Diagnostik von Mikrosatelliteninstabilität (MSI) waren Gegenstand meiner Studienarbeit und die folgende Darstellungen sind teilweise aus dieser Arbeit entnommen (Putri, 2021).

1.2.1. Mikrosatelliten und Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliten sind wiederholende DNA-Sequenzen, die aus einem einzelnen Nukleotid (Mononukleotid) oder Einheiten von zwei oder mehr Nukleotiden (z.B. Di-, Tri-, Tetra- oder Pentanukleotide) bestehen können (de la Chapelle and Hampel, 2010). Meist befinden sich die Mikrosatelliten in den Introns von Genen, können sich aber auch in den kodierenden Exons selbst, in Promotoren oder nicht translatierten terminalen Regionen befinden (de la Chapelle and Hampel, 2010). Im Prinzip ist die Anzahl der Wiederholungen von Mikrosatelliten in jeder Körperzelle gleich (de la Chapelle and Hampel, 2010). Wenn in einem Gewebe Zellen mit unterschiedlicher Anzahl von Wiederholungen von Mikrosatelliten auftreten, besteht eine sogenannte MSI (de la Chapelle and Hampel, 2010). Eine Beeinträchtigung des DNA-*Mismatch*-Reparatur (MMR)-Systems, das unter physiologischer Bedingung das Auftreten von aberranten Wiederholungszahlen von Mikrosatelliten im Rahmen der DNA-Replikation korrigiert, verursacht die Entstehung einer MSI (Hause et al., 2016). Verschiedene Ursachen treten bei der Inaktivierung von MMR-Genen auf. Dazu gehören epigenetische Inaktivierung, somatische Mutationen und Herabregulierung der MMR-Gene durch Mikro-RNAs (Cortes-Ciriano et al., 2017). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine MSI auftritt, ist abhängig von der Aktivität des betroffenen Genes (Cortes-Ciriano et al., 2017). Zwischen verschiedenen Gewebetypen ist die Aktivität vieler Gene unterschiedlich und damit auch zwischen verschiedenen Tumorsprunggeweben (Hause et al., 2016). Deswegen betrifft die MSI nicht immer die gleichen Mikrosatelliten, sondern variiert je nach Tumorart (Hause et al., 2016). Die Tabelle 3 aus Boneville et al zeigt eine Zusammenfassung der Häufigkeiten einer MSI in 39 Tumorarten (Boneville et al., 2017).

Tabelle 3 (Bonneville et al., 2017): Häufigkeit der MSI in 39 Tumortypen

Cancer Type	No. of Cases	MSI-H	% MSI-H
Adrenocortical carcinoma (TCGA-ACC)	92	4	4.35
Bladder carcinoma (TCGA-BLCA)	412	2	0.49
Breast carcinoma (TCGA-BRCA)	1,044	16	1.53
Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma (TCGA-CESC)	305	8	2.62
Cholangiocarcinoma (TCGA-CHOL, CHOL_10.1038_ng.2273, CHOL_10.1038_ng.2806)	74	1	1.35
Chronic lymphocytic leukemia (CLL_phs000922.v1.p1)	338	1	0.30
Colon adenocarcinoma (TCGA-COAD)	431	85	19.72
Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL_10.1038_ng.3356)	33	0	0.00
Lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma (TCGA-DLBC)	48	0	0.00
Esophageal carcinoma (TCGA-ESCA)	184	3	1.63
Glioblastoma multiforme (TCGA-GBM)	396	1	0.25
Head and neck squamous cell carcinoma (TCGA-HNSC)	510	4	0.78
Kidney chromophobe (TCGA-KICH)	66	0	0.00
Kidney renal clear cell carcinoma (TCGA-KIRC)	339	5	1.47
Kidney renal papillary cell carcinoma (TCGA-KIRP)	288	0	0.00
Acute myeloid leukemia (TCGA-LAML)	146	0	0.00
Lower-grade glioma (TCGA-LGG)	513	2	0.39
Liver hepatocellular carcinoma (TCGA-LIHC)	375	3	0.80
Lung adenocarcinoma (TCGA-LUAD)	569	3	0.53
Lung squamous cell carcinoma (TCGA-LUSC)	496	3	0.60
Mesothelioma (TCGA-MESO)	83	2	2.41
Nasopharyngeal carcinoma (NPC_10.1073_pnas.1607606113)	50	0	0.00
Ovarian serous cystadenocarcinoma (TCGA-OV)	437	6	1.37
Pancreatic adenocarcinoma (TCGA-PAAD)	183	0	0.00
Pheochromocytoma and paraganglioma (TCGA-PCPG)	179	0	0.00
Prostate adenocarcinoma (TCGA-PRAD)	498	3	0.60
Rectal adenocarcinoma (TCGA-READ)	157	9	5.73
Sarcoma (TCGA-SARC)	255	2	0.78
Skin cutaneous melanoma (TCGA-SKCM)	470	3	0.64
Stomach adenocarcinoma (TCGA-STAD)	440	84	19.09
Testicular germ cell tumor (TCGA-TGCT)	150	0	0.00
Thyroid carcinoma (TCGA-THCA)	496	0	0.00
Thymoma (TCGA-THYM)	123	1	0.81
Uterine corpus endometrial carcinoma (TCGA-UCEC)	542	170	31.37

Cancer Type	No. of Cases	MSI-H	% MSI-H
Uterine carcinosarcoma (TCGA-UCS)	57	2	3.51
Uveal melanoma (TCGA-UVM)	80	0	0.00
Pediatric acute myeloid leukemia (TARGET-AML)	19	0	0.00
Pediatric neuroblastoma (TARGET-NBL)	220	1	0.45
Pediatric high-risk Wilms tumor (TARGET-WT)	41	1	2.44
Total	11,139	425	3.82

Abkürzungen: MSI: Mikrosatelliteninstabilität, MSI-H: Mikrosatelliteninstabilität hoch, TARGET: *Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments*, TCGA: *The Cancer Genome Atlas*.

Die Darstellung macht deutlich, dass eine MSI bei Endometriumkarzinomen (31,37 %) und kolorektalen Karzinomen (19,72 %) besonders häufig auftritt, aber im Wesentlichen auch in anderen Tumorarten vorkommen kann. In den meisten untersuchten Tumorentitäten liegt die Häufigkeit der MSI zwischen 0 % und 2 %. Dabei ist zu beachten, dass die Zahl der untersuchten Tumoren bei vielen Entitäten mit 0 % mikrosatelliteninstabilen Tumoren häufig unter 100 liegt, so dass auch bei diesen Tumorarten das Vorkommen einzelne mikrosatelliteninstabile Fälle keineswegs ausgeschlossen werden kann.

Mit dem Wissen, dass es bei allen malignen Tumoren eine MSI vorkommen könnte und es für alle soliden malignen Tumor mit MSI eine von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie Pembrolizumab gibt, sind effiziente zuverlässige und einfach durchführbare Testverfahren zum Nachweis der MSI von höher Bedeutung.

1.2.2. DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)-System

Das *Mismatch*-Reparatur (MMR)-System wurde erstmals in *Escherichia coli* von der Meselson-Gruppe entdeckt (Liu et al., 2017, Wildenberg and Meselson, 1975, Wagner and Meselson, 1976). In *E. coli* sind beim MMR-System folgende Proteine beteiligt: MutS, MutL, MutH, DNA-Helicase (Exo1, ExoVII, ExoX, RecJ, UvrD), Single Strand binding Protein (SSB), Exonukleasen (5'-3' oder 3'-5'), DNA-Polymerase III und DNA-Ligase (Lahue et al., 1989, Liu et al., 2017). Bei Eukaryoten gibt es zwei Komplexe von MMR-Proteinen, die den Homologen des bakteriellen MutL und MutS-Systems entsprechen, zu dem MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1 und PMS2 gehören (Muro et al., 2015). Diese beteiligten Proteine sind typischerweise in spezifischen Komplexen gemeinsam aktiv (Muro et al., 2015). Die humanen MutS-Proteine bestehen aus Heterodimeren MutS α (MSH2-MSH6) und MutS β

(MSH2- MSH3) und die humanen MutL-Proteine aus Heterodimeren MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-PMS1) und MutL γ (MLH1-MLH3) (Muro et al., 2015).

Im Wesentlichen kann man den Mechanismus des MMR-Systems in drei Prozesse unterteilen: Erkennung, Entfernung und Resynthese (Viale et al., 2017). Zuerst erkennt das Proteinkomplex MutS α oder MutS β nicht übereinstimmende DNA-Basenpaare in der DNA (Viale et al., 2017, Lupinacci et al., 2019, Liu et al., 2017). Das Proteinkomplex MutS rekrutiert dann das Proteinkomplex MutL α , als Hauptvertreter für das Proteinkomplex MutL (Viale et al., 2017). Folglich wird die latente Endonuklease in der PMS2-Untereinheit von MutL α durch PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) stimuliert, um den defekten Strang in der Nähe der Fehlpaarungsstelle herauszuschneiden (Viale et al., 2017, Lupinacci et al., 2019, Liu et al., 2017, Muro et al., 2015). Am Ende wird das entfernte DNA-Segment durch die DNA-Polymerase δ resynthetisiert und der Reparaturprozess durch die DNA-Ligase I abgeschlossen (Viale et al., 2017, Lupinacci et al., 2019, Liu et al., 2017, Muro et al., 2015). Der Mechanismus des MMR-Systems ist schematisch in der Abbildung 1 dargestellt (Liu et al., 2017).

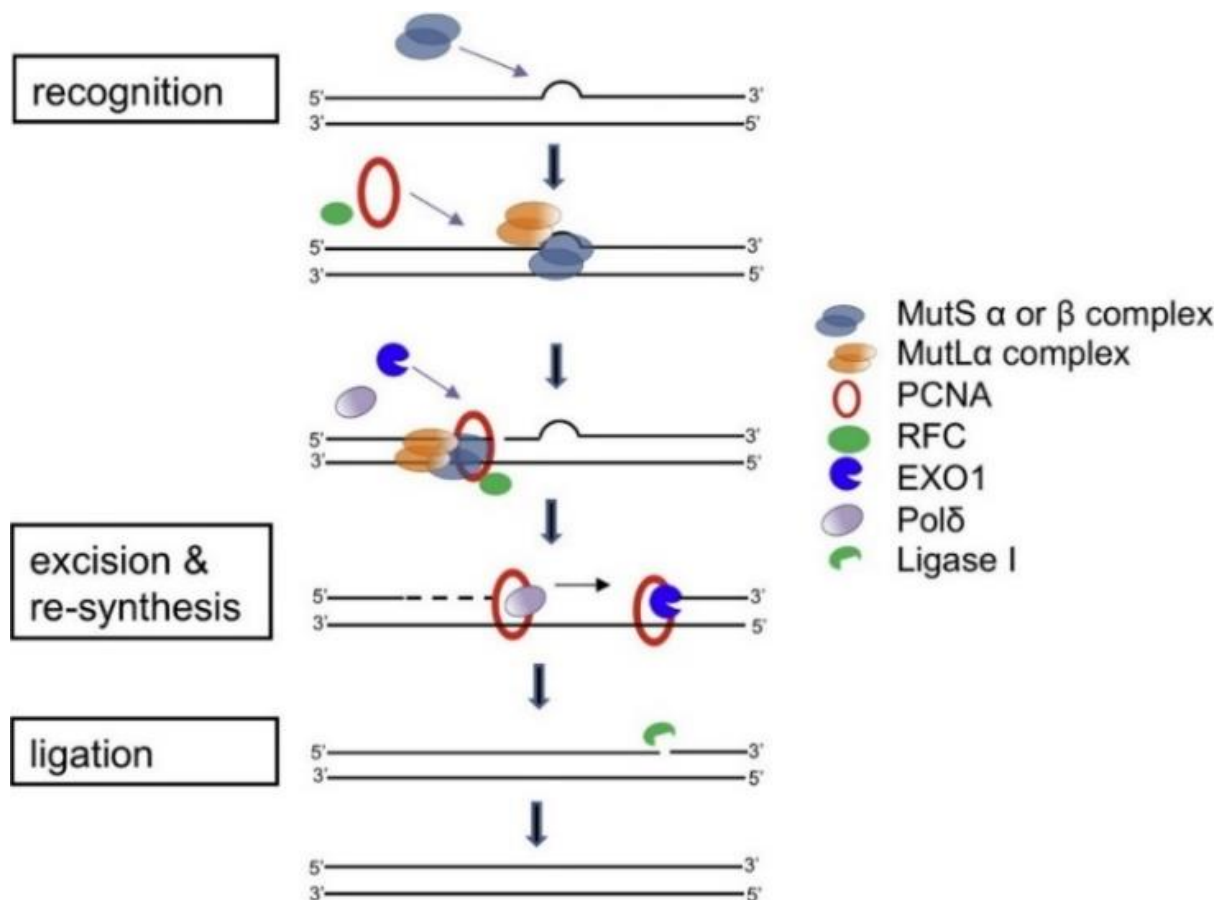


Abbildung 1 (Liu et al., 2017): Der Mechanismus des MMR-Systems.

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*, RFC: *replication factor C*, EXO1: Exonuklease 1, Pol δ : DNA-Polymerase δ , Ligase I: DNA-Ligase I.

1.2.3. Diagnostik der Mikrosatelliteninstabilität

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) lässt sich entweder durch immunhistochemische Verfahren zum Nachweis der MMR-Proteine oder durch DNA-Untersuchungen zum Nachweis aberranter Mikrosatelliten. Neben PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gehören zu den DNA basierten Methoden auch das sogenannte *Next Generation Sequencing* (NGS), für das in den letzten Jahren viele verschiedene neue Verfahren vorgeschlagen wurden, um die Bestimmung der MSI zu optimieren.

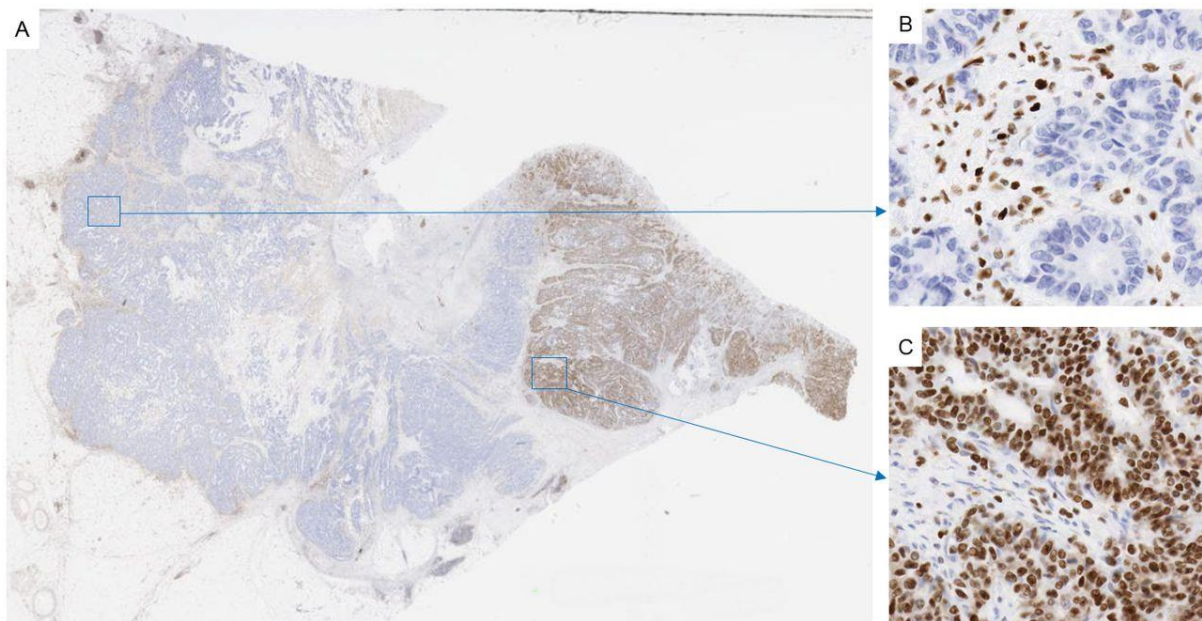


Abbildung 2 (Westwood et al., 2019): Beispiel eines immunhistochemischen Befund.

A: MSH2-Immunhistochemie in einem Resektionsblock eines kolorektalen Karzinom mit einer klonalen Verlust in 76 % der gesamten Tumorfläche (0,5-fache Vergrößerung). B: Verlust der MSH2-Expression mit den umgebenden positiven Stromazellen als interne Kontrolle (20-fache Vergrößerung). C: Normale MSH2-Expression im Rest des Tumors mit den umgebenden Stromazellen (20-fache Vergrößerung).

Als Testverfahren zum Nachweis einer MSI wurde die immunhistochemische Untersuchung eines Ausfalls von MMR-Proteinen nach Bethesda-Leitlinie (Umar et al., 2004) und von European Society for Medical Oncology (ESMO) (Luchini et al., 2019) vorgeschlagen. In der Immunhistochemie lässt sich nachweisen, ob die MMR-Proteine in der Zelle exprimiert werden. Da die MMR-Proteine in allen Zelltypen exprimiert werden (Odze and Goldblum, 2009), lässt sich der Ausfall von MMR-Proteinen in Tumorzellen immunhistochemisch eindeutig feststellen. Beim Ausfall eines MMR-Proteins entfällt die Anfärbung von Tumorzellkernen mit Antikörpern gegen das entsprechende MMR-Protein komplett, während die umgebende Stromazellen eine eindeutige nukleäre Anfärbung zeigen (Westwood et al., 2019). Die normal gefärbten Stromazellen dienen also als interne Kontrolle dieser

Untersuchung. Die Abbildung 2 zeigt ein immunhistochemisches Bild von einem kolorektalen Karzinom mit einem Verlust des MSH2-Proteins und einer normalen MSH2-Expression im umgebenden Stroma (Westwood et al., 2019).

Wie oben bereits beschrieben wurde, arbeiten die MMR-Proteine immer in Form eines Heterodimers. Dies führt dazu, dass meistens zwei in einem Komplex zusammenarbeitende Proteine gleichzeitig verloren gehen (Marginean and Melosky, 2018). Der gleichzeitige Ausfall von zwei zusammenarbeitenden MMR-Proteinen verbessert außerdem die Zuverlässigkeit der immunhistochemischen Untersuchung, da dadurch die Möglichkeit eines falschen Ergebnisses durch ein Farbeartefakt verringert wird.

Auch die PCR-Untersuchung steht in der Bethesda-Leitlinie (Umar et al., 2004) als Nachweismethoden einer MSI und wurde von ESMO (Luchini et al., 2019) empfohlen. Die PCR-Untersuchung erfolgt mit verschiedenen gut bekannten Mikrosatellitenmarkern, wie dem Bethesda-Panel, das ebenfalls in der Bethesda-Leitlinie empfohlen wurde. Das Bethesda-Panel besteht aus 2 Markern mit Mononukleotid-Wiederholungen (BAT-25 und BAT-26) und 3 Markern mit Dinukleotid-Wiederholungen (D2S123, D5S346 und D17S250) (Umar et al., 2004, Boland et al., 1998). Eine geringgradige MSI (MSI-*low*) wird diagnostiziert, wenn nur 1 der 5 Mikrosatelliten als instabil erscheint und eine hochgradige MSI (MSI-*high*) wird bei einer Erscheinung von ≥ 2 instabilen Mikrosatelliten diagnostiziert (Boland et al., 1998). Eine MSI in der PCR-Untersuchung lässt sich erkennen, wenn eine oder mehrere zusätzliche Peaks bzw. zusätzliche Banden vorkommen, die durch das Vorliegen eines Mikrosatelliten in zwei verschiedenen Konfigurationen entstehen (Bacher et al., 2004). Die Abbildung 3 stellt eine Schema der PCR-Untersuchung zur Bestimmung einer MSI dar (Baudrin et al., 2018).

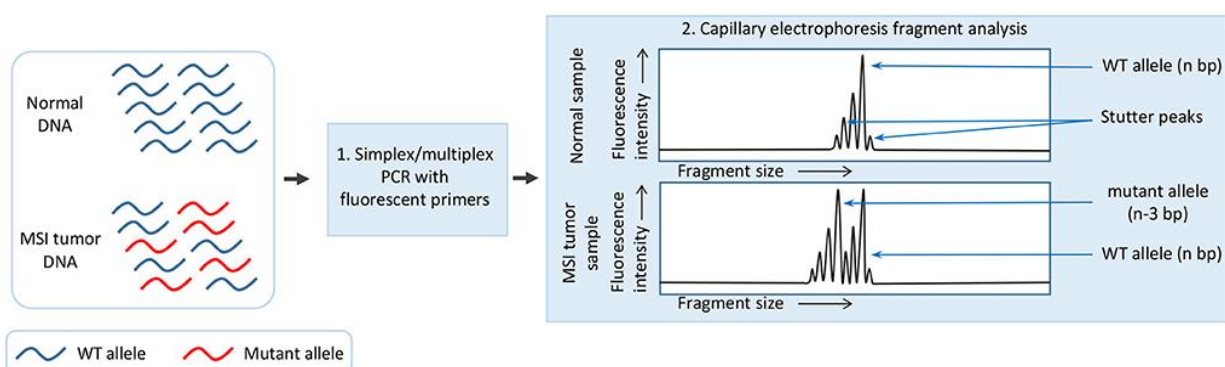


Abbildung 3 (Baudrin et al., 2018): PCR Untersuchung für den Nachweis einer MSI
WT: Wildtyp

Für die Therapieindikation genügt somit der Nachweis eines Expressionsverlustes eines MMR-Proteins in der immunhistochemische Untersuchung und/oder einer MSI-high in der PCR Untersuchung (Toh et al., 2017, Vasen et al., 1999, Rigau et al., 2003, Riazzy et al., 2015, Marcus et al., 2019).

Verschiedene NGS-Methoden wurden neulich zur Erkennung von MSI in Tumoren etabliert. Ein großer Vorteil von NGS ist, dass das Vorliegen einer MSI gleichzeitig in einer großen Anzahl von Tumor-DNAs nachgewiesen werden kann (Baudrin et al., 2018). Verschiedene NGS-Methoden für den Nachweis einer MSI wurden in den letzten Jahren vorgeschlagen (z.B. MANTIS, MSISensor, mSINGs, MSIsseq, etc) (Baudrin et al., 2018). Als eine diagnostische Methode zum MSI-Nachweis war NGS allerdings zum Stichtag 11.10.2019 noch nicht zugelassen.

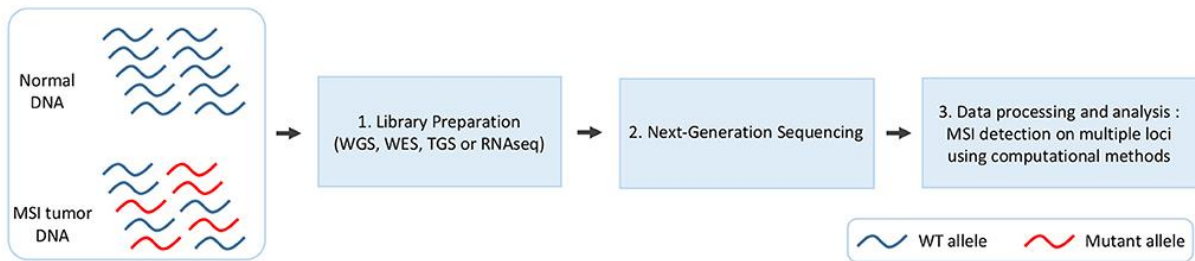


Abbildung 4 (Baudrin et al., 2018): Next Generation Sequencing; WT: Wildtyp

1.2.4. Mikrosatelliteninstabilität beim Pankreaskarzinom

Die Häufigkeit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) beim Pankreaskarzinom wurde bereits von zahlreichen Studien untersucht. Davon konnten bis zum 30. November 2019 insgesamt 34 Studien in der systematischen Übersichtsarbeit von Luchini et al. zusammengefasst werden (Luchini et al., 2021). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 von Luchini et al. dargestellt.

Tabelle 4 (Luchini et al., 2021): Häufigkeit der MSI beim Pankreaskarzinom

Study	Country	Tumour type analysed in the cohort	Number of tumours analysed for MSI	Number of MSI/dMMR (%)	Pancreatic site of MSI/dMMR tumours	Histology of MSI/dMMR tumours	Molecular data of MSI/dMMR tumours	Methodology for MSI analysis IHC PCR NGS	Lynch syndrome	Survival data of MSI/dMMR tumours
Han et al ¹¹	Japan, Korea	PC	9	6 (66.6%)	NA	NA	NA	PCR ¹	NA	NA
Seymour et al ¹²	USA	PDAC	7	0 (0%)	NA	NA	NA	PCR ²	NA	NA
Brentnall et al ¹³	USA	PC	13	8 (62%)	NA	NA	NA	PCR ²	NA	NA
Abe et al ¹⁴	Japan	PC	44	7 (15.9%)	NA	NA	NA	PCR ²	NA	NA
Venkatasubbarao et al ¹⁵	USA	PDAC	14	4 (28.6%)	NA	PDAC G3	NA	PCR ²	NA	NA
Ouyang et al ¹⁶	Japan	PC	60	9 (15%)	NA	NA	NA	PCR ²	NA	NA
Goggins et al ¹⁷	USA	PDAC	82	3 (3.7%)	3 head (100%)	MED	KRAS wt	PCR ²	NA	2/3 AWD at 16 and 52 months, 1/3 DOD after 4 months
Ghimeni et al ¹⁸	Italy	PC	21	0 (0%)	NA	NA	NA	PCR ²	NA	NA
Caligo et al ¹⁹	Italy	PC	31	13 (42%)	NA	NA	NA	PCR ²	NA	NA
Wlentz et al ²⁰	MED	PC	18	4 (22.2%)	NA	MED; 1/4 showed also microglanular features. No associated PanIN	KRAS wt	IHC ⁴ , PCR ⁸	1	3/4 AWD at 13, 24 and 67 months, 1/4 DOD after 4 months
Ueki et al ²¹	USA	PDAC	36	4 (11.1%)*	NA	MED	2/4 harboured promoter hypomethylation of <i>MLH1</i>	PCR ²	NA	NA
Yamamoto et al ²²	Japan	PDAC	103	16 (15.5%)	NA	10/13 PDAC G3, 2 G2, 1 G1	10/13 KRAS wt, 11/13 TP53 wt	PCR ⁸	3	MSI associated with better survival
Moriyama et al ²³	Japan	PDAC	18	2 (11.1%)	NA	NA	NA	PCR ¹⁰	NA	NA
Nakata et al ²⁴	Japan	PC	46	8 (17.4%)	NA	5/8 G1, 3 G2-G3-G4	NA	PCR ¹¹	NA	MSI associated with better survival
Tomaszewska et al ²⁵	Poland	PDAC	30	0 (0%)	NA	NA	NA	IHC ⁶	NA	NA
Lüttges et al ²⁶	Germany	11 M/C-C and 12 PDAC	23	1 (4.3%)	1 head (100%)	M/C-C, pT4 (8 cm) N1	NA	IHC ⁶ , PCR ¹⁰	NA	NA
Nakata et al ²⁷	Japan	PC	55	4 (7.2%)	2 head (50%), 1 body (25%), 1 tail (25%)	2 head: G1; 1 body: G4; 1 tail: G3	NA	IHC ⁶	NA	Loss of MSH2 associated with initial better survival
Maple et al ²⁸	USA	LS-PC	35	3 (8.6%)	NA	1 MED; 2 PDAC	Germine <i>MLH1</i> mutation in 1 patient	IHC ⁴ , PCR ¹²	1	NA
Fuji et al ²⁹	Japan	PDAC	21	0 (0%)	NA	NA	NA	PCR ¹³	NA	NA
Laghi et al ³⁰	272 cases Italy, 66 Germany	PDAC	338	1 (0.3%)	Head	G3, pT4N2	KRAS ^{mut2} mutation, BRAF wt	IHC ⁴ , PCR ¹⁰	No	NA (died of postsurgical complication)
Ottendorf et al ³¹	The Netherlands	PDAC	78	3 (3.9%)†	NA	NA	NA	IHC ⁴	NA	NA
Mitsuhashi et al ³²	Japan	PDAC	283	0 (0%)	NA	NA	NA	PCR ¹⁴	NA	NA
Riazzy et al ³³	Canada	PDAC	265	41 (15.4%)	NA	NA	NA	IHC ⁴	NA	dMMR did not correlate with survival§
Grant et al ³⁴	Canada	PDAC	290	4 (1.38%)	NA	NA	Germine mutations in 4 patients: 1) <i>MLH1</i> ^{del71-84x2} , 2) <i>MSH2</i> ^{del153-154x1} , 3) <i>MSH2</i> ^{del153-154x1} , 4) <i>MSH6</i> ^{del102-103x1}	NGS ⁵	4	NA
Connor et al ³⁵	Canada	PDAC	255	4 (1.6%)	NA	NA	NA	IHC ⁴ , PCR ¹⁰ , NGS ⁵	3	NA
Humphris et al ³⁶	Australia (international cohort)	PDAC	385	4 (1%)	NA	1 case G4, 2 cases G2, 1 signet ring	All high TMB (100%), 2 KRAS wt (50%)	IHC ⁴ , NGS ⁵	No	NA
Salem et al ³⁷	USA	PDAC	870	12 (1.4%)	NA	NA	NA	NGS ⁵	No	NA
Lupinacci et al ³⁸	France	PDAC	513	8 (1.6%)	NA	3pT1, 2pT2, 3pT3; 1 case medullary, 1 colloid, 6 conventional	NA	IHC ⁴ , PCR ⁹	3	dMMR did not correlate with survival
Wartenberg et al ³⁹	Greece	PDAC	110	5 (4.5%)	NA	Stroma rich in immune cells with a very high stromal CD8/FOXP3 ratio	High prevalence of JAK2 mutations (3/5 cases vs 4/105 MSS PDAC); all KRAS mutated, 2/5 TP53 wt	IHC ⁴	NA	Survival analysis not specific for MSI status
Hu et al ⁴⁰	USA	PDAC	833	7 (0.8%)	NA	2 conventional, 4 mucinous/colloid (IPMN-associated, 1 medullary)*	All available for NGS (5 cases) had high TMB	IHC ⁴ , PCR ¹⁰ , NGS ⁵	7	dMMR did not correlate with survival
Mori et al ⁴¹	Japan	PC	40	0 (0%)	NA	NA	NA	PCR ¹⁵	NA	NA
Latham et al ^{42††}	USA	PDAC	824	34 (4.1%)	NA	NA	5 patients with germine mutations: 1) <i>MLH1</i> ^{del71-84x1} , 2) <i>MSH2</i> ^{del153-154x1} , 3) <i>MSH2</i> ^{del153-154x1} , 4) <i>PMS2</i> ^{del102-103x1} , 5) <i>MSH6</i> ^{del102-103x1}	NGS ⁵	5	NA
Kato et al ⁴³	Japan	PC	10	0 (0%)	NA	NA	NA	NGS ⁵	NA	NA
Singhi et al ⁴⁴	USA	PDAC	2563	3 (0.1%)	NA	NA	3 KRAS wt, 1 TP53 wt, 1 case showed the druggable FGFR2-POC7B fusion; 1/3 high TMB; 3 cases harboured <i>KMT2</i> gene mutations (2 <i>KMT2D</i> and 1 <i>KMT2C</i>) and a <i>JAK1</i> mutation	NGS ⁵	NA	NA
Total	-	-	8323	218 (2.61%)	7 head, 1 body, 1 tail	36 conventional PDAC (3 G4, 16 G3, 5 G2, 8 G1, 4 NOS); 10 MED, 6 M/C, 1 signet ring	Significant association of MSI/dMMR with KRAS and TP53 wt status and with JAK and KMT2 mutations	-	-	Not significant association with survival

Microsatellite instability analysis with PCR: ¹ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D25336 and D31067; ² PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D25336, D31067, D55107, D6687, D85255, D10597, D115904, D13261, D17361, D17587, D18334; ³ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D15199, D25123, D35128, TP53, D252384; ⁴ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D25336, D351067, D55107, D6687, D18334; ⁵ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; BAT26, D105579, D105541, D95272, D95258, D951809; ⁶ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25313, D25123, D55404, D82255, D105197, D115904, D175250, THRA1, D175579, D175396; ⁷ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; length analysis of BAT25 and BAT26 markers; and direct sequencing of the polythymine tract of the TGFBR2 gene; ⁸ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; 9) BAT25, BAT26, D25123, D25336, D175250, or 9) BAT25, BAT26, NR-21, NR-24 and NR-27; ¹⁰ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D351067, D95171, D951870, D18558, D18646, D18647, ¹¹ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D351067, D95171, D951870, D18558, D18646, D18647, ¹² PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D351067, D95171, D951870, D18558, D18646, D18647, ¹³ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; D25123, D351067, D95171, D951870, D18558, D18646, D18647, ¹⁴ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; MYC1, D95242, D8821, D20582, D20583, BA1-25, BA1-26, NR-21, NR-22, NR-25. ¹⁵ PCR with not recommended panel of markers (nor NC) neither MSI PCR; MYC1, D95242, D8821, D20582, D20583, BA1-25, BA1-26, NR-21, NR-22, NR-25. ¹⁶ Microsatellite instability analysis with IHC: ¹⁶ IHC for MLH1 and MSH2; all MSI cases in this series showed MLH1 loss and MSH2 retained. This study first demonstrated the reliability of IHC in determining MSI in pancreatic cancer; ¹⁷ IHC for MLH1 and MSH2; ¹⁸ IHC for MLH1, MSH2 and MSH6; ¹⁹ IHC for MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6. ²⁰ Microsatellite instability analysis with NGS: ²⁰ NGS using a custom panel targeting the exonic and splice site regions of 385 genes previously associated with cancer; ²¹ Whole-genome sequencing variant calls, RNA sequencing and microarray expression values available from the International Cancer Genome Consortium data portal; ²² NGS with MSI sensor methodology; ²³ MSI-NGS assessment with the reference genome hg19 from the University of California, Santa Cruz—Genome Browser database; ²⁴ MSK-IMPACT panel; ²⁵ MSI sensor methodology; ²⁶ Illumina HiSeq technology, MSI tested using 114 loci. ²⁷ In this study, 4 out of 36 cases were MSI; but these cases were specifically and deliberately added by authors to expand the spectrum of cases to be studied for hypomethylation; in addition, 3 of the 4 MSI tumours were previously reported by Goggins et al. ²⁸ First reported case of medullary phenotype associated with MSH2 loss (previously reported cases were all MLH1 negative). ²⁹ Data obtained from another manuscript (Lupinacci et al³⁸), two cases were MSH2-MSH6 negative, and one case was PMS2-MLH1 negative. ³⁰ dMMR had no survival advantage from gemcitabine or 5-fluorouracil adjuvant chemotherapy. ³¹ This study investigated germine mutations. ³² This case is probably a medullary PDAC (described as a poorly differentiated carcinoma with fused glands and some necrotic areas). ³³ This study investigated >50 cancer types, with patients with PDAC representing 3.5% of the entire cohort. ³⁴ AWD, alive without disease; dMMR, defective mismatch repair; DOD, died of disease; IHC, immunohistochemistry; LS-PC, long survivors-pancreatic cancer (>36 months after surgery); M/C-C, mucinous/colloid carcinoma of the pancreas; MED, medullary pancreatic cancer; MN, mononucleotide marker; MSI, microsatellite instability; NA, not assessed (or not reported); NGS, next-generation sequencing; PC, pancreatic cancer; not otherwise specified; PCR, polymerase chain reaction; PDAC, pancreatic duct adenocarcinoma; TMB, tumour mutation burden; wt, wild type.

Die Darstellung zeigt, dass frühere Studien mit geringen Patientenzahlen eine MSI in bis zu 66,6 % gefunden haben, wobei insgesamt 12 Studien über eine Häufigkeit von >10 % berichteten. Alle anderen neueren Studien mit jeweils über 250, teilweise bis zur 2563 Fällen hatten Häufigkeiten von 1-2 % oder sogar <1 % ergeben. Die heterogenen Ergebnisse können durch unterschiedliche Nachweismethoden und Interpretationskriterien erklärt werden (Luchini et al., 2021).

1.3. Ziele der Studie

Diese Studie verfolgte drei Ziele, die alle darauf abzielten zu klären, ob eine relevante Menge von Patient:innen mit Pankreaskarzinom von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren profitieren könnten. Die spezifischen Fragestellungen waren:

1. Die Untersuchung der Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) am Patientenkollektiv des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Dabei sollten Tumoren identifiziert werden, die für die weiteren Untersuchungen für Ziel zwei geeignet sind.
2. Die Klärung der Frage, wie homogen eine MSI in vom Tumor betroffenen Patient:innen ist. Dieser Teil der Untersuchung ist bedeutsam, weil Tumoren nicht dauerhaft von einer derartigen Therapie profitieren können, die nur in einem Teil ihrer Masse ein molekulares Phänomen aufweisen, die sie für eine bestimmte Therapie empfänglich macht.
3. Die Klärung der Beziehung zwischen der MSI und der Menge an CD8⁺-Lymphozyten. Bei anderen Tumorarten zeichnen sich mikrosatelliteninstabile Tumoren durch eine deutlich erhöhte Anzahl von Tumordinfiltrierenden CD8⁺-Lymphozyten aus. Dies ist ein Indiz dafür, dass bei den Tumoren eine vermehrte Immunreaktion stattfindet. Eine hohe Zahl an CD8⁺-Lymphozyten spricht bei mikrosatelliteninstabilen Tumoren für einen tatsächlichen biologischen Effekt auf das Immunsystem.

2. Material und Methoden

2.1. Tissue-Microarray-Technik

Die *Tissue Microarray* (TMA)-Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 600 Tumoren auf einem einzigen Objektträger. Das Verfahren ist technisch außerordentlich einfach. Von den für eine Studie ausgewählten Tumorblöcken wird jeweils eine Biopsie mit einer 0,6 mm im Durchmesser messenden Hohlzylinder entnommen und dann in ein vorgefertigtes 0,6 mm im Durchmesser messendes Loch in einem ansonsten leeren Paraffinblock eingefügt. In diesem „Empfängerblock“ werden die zur Aufnahme von Gewebezylinder nötigen „Löcher“ nach einem vordefinierten Koordinatensystem lokalisiert, sodass nach Herstellung eines TMA-Blockes ca. 600 Tumoren an genau definierten Positionen des Blockes liegen. Die Abbildung 6 zeigt das am UKE typischerweise verwendete Koordinatensystem. Die Tumoren bzw. Kontrollgewebe sind auf sechs Sektoren verteilt, welche asymmetrisch angeordnet sind, um eine Orientierung am Block zu erlauben. Die sechs Sektoren des TMA-Blocks werden mit Großbuchstaben von A bis F bezeichnet. Die Positionen der Stenzen in den einzelnen Sektoren sind im Koordinatensystem mit Zahlen für die Zeilen und Kleinbuchstaben für die Spalten angeordnet.

Ein wesentlicher Vorteil der TMA-Methode ist die problemlose Pseudonymisierung und Anonymisierung der untersuchten Gewebematerialien. Die Patientennummern, welche auf allen Schnitten und Blöcken eines Pathologieinstituts angebracht sind, könnte theoretisch zu einer Identifikation von Patient:innen führen. Diese Nummer ist aber nur während der Herstellungsphase eines TMAs von Bedeutung. Durch die Herstellung von TMAs werden jeder Patientennummer einem Punkt im TMA-Koordinatensystem zugeordnet. Nach Fertigstellung des TMAs können die ursprünglich in einer Liste vorhandenen Patientennummer entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder dauerhaft gelöscht werden (Anonymisierung). Ein Beispiel eines TMA-Datenfiles mit Kombination von den TMA-Koordinaten und pathologischen Informationen ist in der Tabelle 5 dargestellt.



Abbildung 5: TMA-Gerät

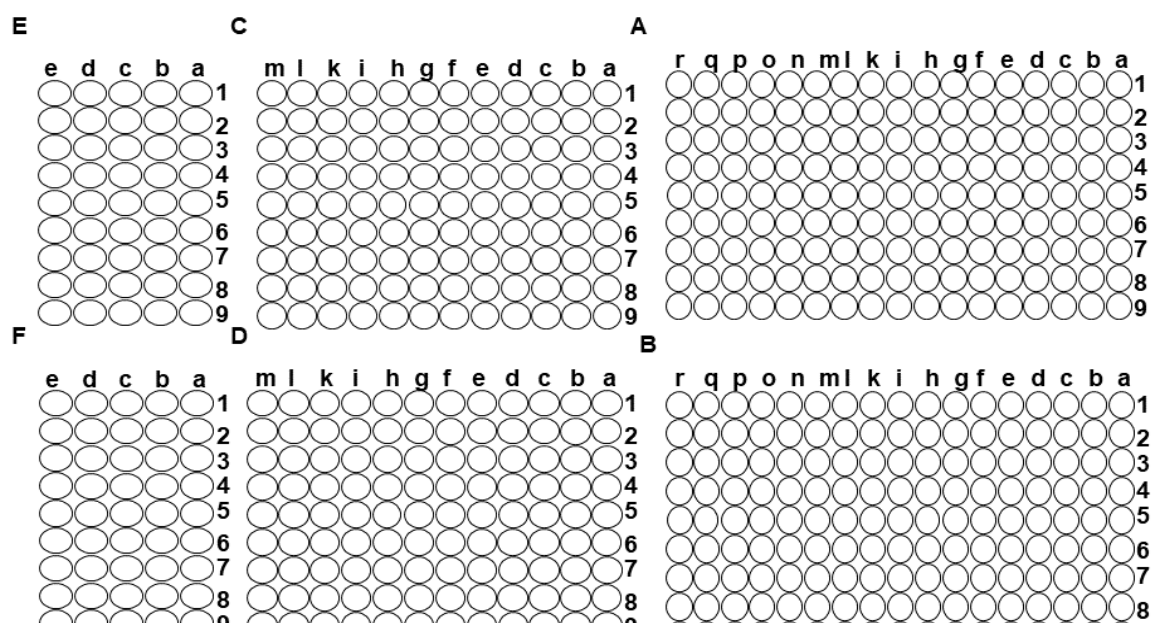


Abbildung 6: TMA-Koordinatensystem

Tabelle 5: Beispiel eines TMA-Datenfiles

Array	Koordinate	Tumortyp	pT	pN	pM	Grade	R-Status
A	A 1a	Adenokarzinom des Pankreas	pT4	pN0	pM1	3	R1
A	A 1b	Adenokarzinom des Pankreas	pT3	pN1	pM0	3	R1
A	A 1c	Adenokarzinom des Pankreas	pT3	pN1	pM0	3	R1
A	A 1d	Adenokarzinom des Pankreas	pT3	pN1	pM1	2	R0
A	A 1e	Adenokarzinom des Pankreas	pT3	pN1	pM0	2	R0

2.2. Patientenkollektiv

Für die Zwecke dieser Studie sollten alle Pankreastumoren mit Ausnahme neuroendokriner Tumoren identifiziert werden, die zwischen den Jahren 2009 und 2018 am UKE operiert worden waren. Die Suche der Patient:innen startete mit einer Volltextsuche in der UKE-Datenbank unter Verwendung der Suchbegriffe: Pankreas, Karzinom und pT. Diese Suche führte zur Identifikation von mehr als 1429 Patient:innen, von denen die gesamten Pathologiedaten zunächst ausgedruckt wurden. Diese Akten wurden durchgesehen, wobei nicht für die Studie nutzbare Fälle aussortiert wurden. Von den Verbliebenen 658 mutmaßlich brauchbare Fällen wurden alle histologischen Schnitte herausgesucht und von einer Pathologin auf die TMA-Herstellung brauchbare Tumoranteile durchgesehen. Dieser Schritt ist notwendig, denn sehr kleine Tumoren oder ausgedehnt nekrotische Karzinome eignen sich nicht für die TMA-Untersuchung. Die Evaluation ergab insgesamt 599 für die Studie brauchbare Tumoren, darunter 528 duktales Adenokarzinome des Pankreas, 60 Adenokarzinome der Papilla Vateri, 7 Azinuszellkarzinome des Pankreas und 4 andere Pankreastumoren (1 cholangiozelluläres

Karzinom der Ampulla Vateri , 1 solider, teils spindelzelliger, teils epitheloider Tumor des Pankreas, 1 undifferenziertes (anaplastisches) sarkomatoides Karzinom des Pankreas und 1 gemischt Adenokarzinom (70 %) und undifferenziertes, teils sarkomatoides Karzinom (30 %) des Pankreas). Die klinischen/pathologischen Daten für diese Tumoren sind in den Tabellen 6-8 zusammengestellt.

Tabelle 6: pT-Klassifikation

Tumorart	n	pT				
		pT1	pT2	pT3	pT4	pTX
Adenokarzinom des Pankreas	528	16	75	405	30	2
Adenokarzinom der Papilla Vateri	60	4	17	23	16	0
Azinuszellkarzinom des Pankreas	7	0	1	4	2	0
Cholangiozelluläres Karzinom der Ampulla Vateri	1	0	0	1	0	0
Solider, teils spindelzelliger, teils epitheloider Tumor des Pankreas	1	0	0	1	0	0
Undifferenziertes (anaplastisches) sarkomatoides Karzinom des Pankreas	1	0	0	0	1	0
70 % Adenokarzinom und 30 % undifferenziertes, teils sarkomatoides Karzinom des Pankreas	1	0	0	1	0	0
Total	599	20	93	435	49	2

Tabelle 7: pN-Klassifikation

Tumorart	n	pN			
		pN0	pN1	pN2	pNX
Adenokarzinom des Pankreas	528	113	372	41	2
Adenokarzinom der Papilla Vateri	60	14	40	6	0
Azinuszellkarzinom des Pankreas	7	5	2	0	0
Cholangiozelluläres Karzinom der Ampulla Vateri	1	1	0	0	0
Solider, teils spindelzelliger, teils epitheloider Tumor des Pankreas	1	1	0	0	0
Undifferenziertes (anaplastisches) sarkomatoides Karzinom des Pankreas	1	0	0	0	1
70 % Adenokarzinom und 30 % undifferenziertes, teils sarkomatoides Karzinom des Pankreas	1	1	0	0	0
Total	599	135	414	47	3

Tabelle 8: pM-Klassifikation und Resektionsstatus (R-Status)

Tumorart	n	pM			R-Status		
		pM0	pM1	pMX	R0	R1	RX
Adenokarzinom des Pankreas	528	422	105	1	266	219	43
Adenokarzinom der Papilla Vateri	60	10	50	0	52	7	1
Azinuszellkarzinom des Pankreas	7	0	6	1	4	3	0
Cholangiozelluläres Karzinom der Ampulla Vateri	1	0	1	0	1	0	0
Solider, teils spindelzelliger, teils epitheloider Tumor des Pankreas	1	1	0	0	1	0	0
Undifferenziertes (anaplastisches) sarkomatoides Karzinom des Pankreas	1	0	1	0	0	1	0
70 % Adenokarzinom und 30 % undifferenziertes, teils sarkomatoides Karzinom des Pankreas	1	1	0	0	0	1	0
Total	599	434	163	2	324	231	44

Von den ausgewählten Tumoren wurden die entsprechenden Gewebelöcke herausgesucht und die für die Herstellung des TMAs geeigneten Stellen wurden auf dem korrespondierenden HE-Schnitt eingezeichnet. Die Schnitte und die Blöcke wurden entsprechend der für den TMA vorgesehenen Reihenfolge zusammensortiert und von einem speziell ausgebildeten TMA-Hersteller mit einem semi-automatischen TMA-Gerät (Eigenbau von TMA-Arbeitsgruppe UKE) bearbeitet. Die Tumoren wurden mit einer Serie von normalen Kontrollgeweben (siehe Tabelle 9) auf zwei Arrays aufgebracht, der Erste enthielt 522 Tumoren, der Zweite 78 Tumoren und 21 Kontrollgewebe. Die beiden TMA-Blöcke sind in der Abbildung 7 dargestellt.

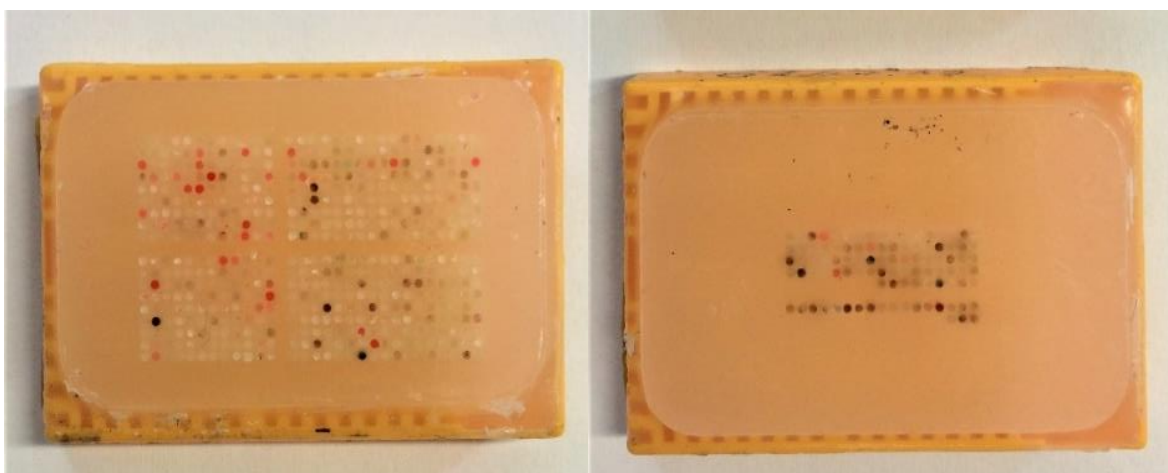


Abbildung 7. Pankreas TMA-Blöcke

Tabelle 9: Liste von den Normalgewebe

Array	Koordinate	Gewebe
B	B 1a	Pankreas Normalgewebe
B	B 1b	Pankreas Normalgewebe
B	B 1c	Pankreas Normalgewebe
B	B 1d	Pankreas Normalgewebe
B	B 1e	Pankreas Normalgewebe
B	B 1f	Pankreas Normalgewebe
B	B 1g	Pankreas Normalgewebe
B	B 1h	Pankreas Normalgewebe
B	B 1i	Pankreas Normalgewebe
B	B 1k	Pankreas Normalgewebe
B	B 1l	Pankreas Normalgewebe
B	B 1m	Leber Normalgewebe
B	B 1n	Leber Normalgewebe
B	B 1o	Haut Normalgewebe
B	B 1p	Haut Normalgewebe
B	B 1q	Lymphknoten Normalgewebe
B	B 1r	Lymphknoten Normalgewebe
B	B 2a	Niere Normalgewebe
B	B 2b	Niere Normalgewebe
B	B 2c	Prostata Normalgewebe
B	B 2d	Prostata Normalgewebe

2.3. Strategien für die Identifikation von mikrosatelliteninstabilen Tumoren

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde zunächst am TMA immunhistochemisch analysiert, wobei nach einem Expressionsverlust von MMR-Proteinen gesucht wurde. Alle Tumoren, bei denen immunhistochemisch am TMA ein Defekt von MMR-Genen vermutet wurden, wurden weiter evaluiert. Dabei wurden zunächst Großschnitte immunhistochemisch mit den gleichen Protokollen untersucht und zusätzlich eine PCR-Analyse zum Nachweis von MSI durchgeführt.

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. MMR-Immunhistochemie

Die Expression der MMR-Proteine MSH2, MSH6, MLH1 und PMS2 wurde immunhistochemisch analysiert. Für jede Immunfärbung wurde ein frischer Gewebeschnitt (4µm) angefertigt und auf einen Glasobjektträger (Super Frost) aufgezogen. Das Gewebe wurde in Xylol (3x 10 min) entparaffiniert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 100 %) entwässert. Die Vorbehandlung (Antigendemaskierung)

erfolgte in einem speziellen Gerät (Dako/Agilent PT Link). Der genaue Vorgang ist in der Tabelle 10 beschrieben. Anschließend wurden die Schnitte dem PT-Link entnommen und in einen Färbeautomaten (Dako/Agilent Autostainer Link 48) überführt. Die verwendeten Antikörper, Reaktionszeiten und Inkubationsschritte sind in der Tabelle 10 aufgelistet. Die jeweiligen Antikörper (1. AK) werden vom Hersteller auf die geeignete Endkonzentration vorverdünnt (*Ready-To-Use*) geliefert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper wurde mit einem Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten Detektionssystem geführt, welches den Farbstoff 3-3-Diaminobenzidin (DAB) umsetzt. Das Gewebe wurde abschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt und der Objektträger mit Eukitt eingedeckelt.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper und Bedingungen der Immunhistochemie.

	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2
Vorbehandlung	pH 9 für 15 min bei 95 °C			
Peroxidase	5 min			
Inkubationszeit 1. AK	20 min	20 min	20 min	30 min
Inkubationszeit Linker	15 min (Maus)	-	15 min (Maus)	-
Inkubationszeit HRP	20 min	20 min	20 min	30 min
Inkubationszeit DAB	10 min	10 min	10 min	2x 5 min
Inkubationszeit Hämatoxylin	5 min			
AK-Bestellnummer	IR085	IR086	IR079	IR087
AK-Klon	FE11	EP49	ES05	EP51

2.4.2. CD8-Immunhistochemie

Auch für die Untersuchung von CD8⁺-Lymphozyten wurden frisch geschnittene Schnitte (ein Tag alt) verwendet. Beide Schnitte vom TMA-Block A und -Block B wurden am selben Tag gemeinsam gefärbt. Die Schnitte wurden dazu in Xylol entparaffiniert, rehydriert und für 15 Minuten einer hitze-induzierten Antigendemaskierungsprozedur bei 98 °C in pH9 DAKO „*target retrieval solution*“ (S2367) in einem DAKO PT-LINK-Gerät ausgesetzt. Die Schnitte wurden danach in einem DAKO Link 48 Farbeautomat eingebracht. Das Färbeprotokoll beinhaltete eine Blockierung mit Peroxidase für 5 Minuten (DAKO, EnVision Flex-Kit 8002), gefolgt von einer Inkubation mit dem Primärantikörper (Oncodianova, Maus monoklonale Antikörper, Clone TC8, Verdünnung 1:200) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach

wurde die Antikörperreaktion mittels des DAKO EnVision Flex-Kit 8002 visualisiert. Hierfür erfolgt eine Inkubation für 20 Minuten. Die Färbung wurde abgeschlossen durch DAB-Chromogen-Applikation für 10 Minuten und eine finale Inkubation mit Hämatoxylin (DAKO K8008) für 5 Minuten.

2.5. Auswertung

2.5.1. Auswertung der MMR-Immunhistochemie

Die Auswertung der Immunfärbungen wurde durch visuelle Inspektion am Mikroskop vorgenommen. Als interne positiv-Kontrolle für den Erfolg der Immunfärbung diente eine positive Färbung der Zellkerne im nicht-tumorösen Gewebe (z.B. Stromazellen). Von der Analyse ausgeschlossen wurden fehlende Gewebe im TMA, Gewebe ohne eindeutige Tumoranteile und Tumoren ohne nukleäre Färbung, bei denen kein positives Kontrollgewebe miterfasst war oder bei denen das positive Kontrollgewebe keine nukleäre Färbung zeigte. Jeder MMR-Marker wurde einzeln ausgewertet. Notiert wurden in den Tumorzellen die Intensität der Färbung (0, 1+, 2+, 3+) sowie die Fraktion der gefärbten Tumorzellen (in %), sowie die An- oder Abwesenheit der Färbung in den Kernen normaler Zellen. Als positives Ergebnis wurde gewertet, wenn die Tumorzellkerne eine Anfärbung (jeglicher Intensität und Fraktion) zeigten. Als negatives Ergebnis wurde gewertet, wenn die Tumorzellkerne keine Anfärbung zeigten und gleichzeitig aber das interne Kontrollgewebe gefärbt war. Ein MMR-Protein Verlust (deficient mismatch repair, dMMR) wurde dann angenommen, wenn mindestens eines der 4 MMR-Proteine einen Ausfall zeigte. Eine intakte MMR wurde dann angenommen, wenn alle 4 MMR-Proteine auswertbar waren und keines der 4 MMR-Proteine einen Ausfall zeigte. Als „vermutlich stabil“ wurde ein Tumor bewertet, bei dem 3 der 4 MMR-Proteine auswertbar waren und keines davon einen Ausfall zeigte. Als nicht interpretierbar wurde das Ergebnis definiert, wenn ≥ 2 der 4 Marker von der Analyse ausgeschlossen werden mussten.

Zur Kategorisierung der Färbeintensität der MMR-Proteine wurde jede Färbung in 4 Kategorien eingeteilt: negativ, schwach, mäßig stark und stark. Negativ bedeutet das völlige Fehlen einer Färbung. Eine schwache Färbung wurde diagnostiziert, wenn <70 % der Tumorzellen eine 1+ Färbung aufwiesen oder ≤ 30 % der Tumorzellen eine 2+ Färbung aufwiesen. Eine mäßig starke Färbung wurde angenommen, wenn ≥ 70 % der Tumorzellen eine 1+ Färbung aufwiesen, oder wenn >30 %, jedoch ≤ 70 % der Tumorzellen eine 2+ Färbung aufwiesen, oder wenn ≤ 30 % der Tumorzellen eine 3+ Färbung aufwiesen. Eine starke Färbung wurde angenommen, wenn >70 % der Tumorzellen eine 2+ oder >30 % der Zellen eine 3+ Färbung zeigten.

2.5.2. Auswertung der CD8-Immunhistochemie

Von allen gefärbten Schnitten wurden digitale Bilder mit dem automatischen Leica's Aperio VERSA 8 Mikroskop aufgenommen. Die TMA-Gewebe wurden automatisch mit der HALO™ (Indica Labs, USA) identifiziert und analysiert. Jeder TMA-Schnitt wurde zunächst bei vierzigfacher Vergrößerung eingescannt. Digitale Bilder wurden unter Verwendung des HALO TMA-Moduls zur Identifizierung und Annotierung individueller TMA-Spots segmentiert. Wo es nötig ist, wurde die Segmentierung manuell korrigiert. Das HALO Membran Immunhistochemie Quantifizierungsmodul wurde dann verwendet, um die Zahl der CD8⁺-Zellen in jedem Gewebespot zu bestimmen und zur exakten Messung des pro Gewebespot vorhandenen Gewebeareals. Dieser Schritt ist notwendig, weil nicht jeder Gewebespot auf dem TMA vollständig abgebildet ist. Manchmal sind nur Teile eines Gewebestücks auf dem TMA abgebildet. Beispiele von nur teilweise vorhandenen TMA-Spots sind in der Abbildung 8 dargestellt. Die durchschnittliche Gewebefläche pro Gewebespot betrug 0,327 mm². Die Zahl der gefärbten Fälle pro Spots und seine Fläche in Quadratmillimeter wurde dann zur Berechnung der Dichte gefärbter Zelle pro Quadratmillimeter verwendet (Zahl der Zellen/mm²).

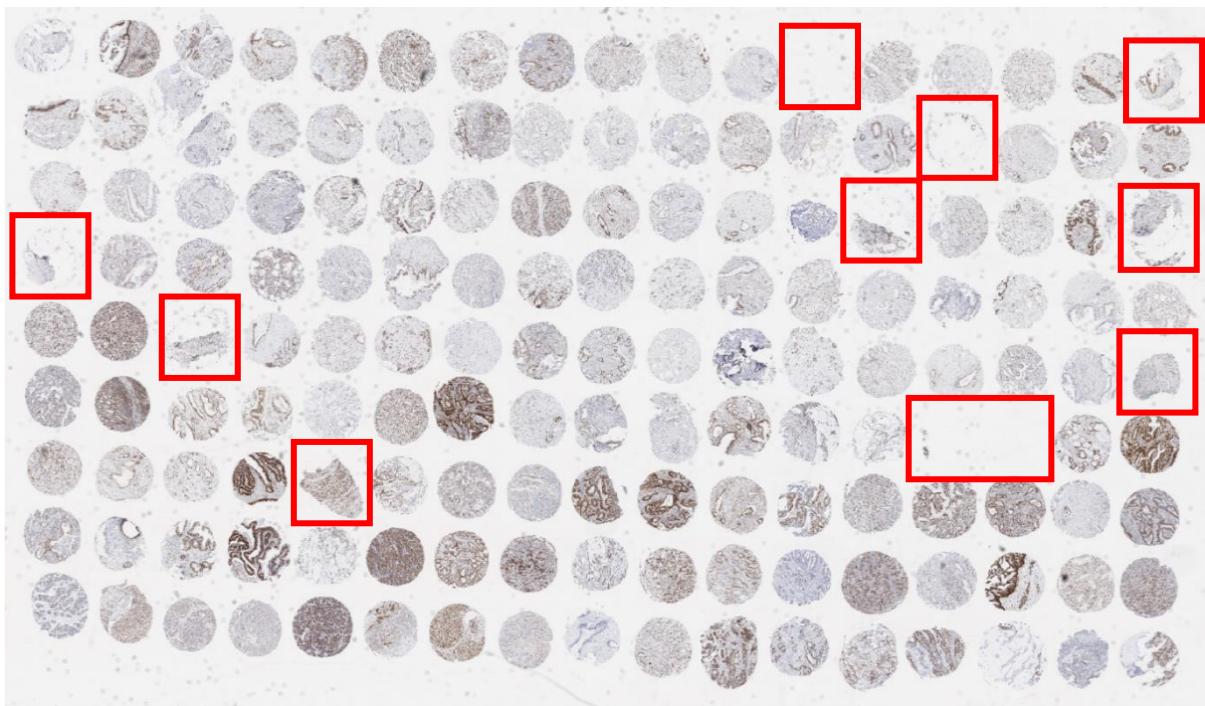


Abbildung 8: TMA Array A Quadrant A - Färbung MLH1-Immunhistochemie
Die Markierungen zeigen unvollständig abgebildete TMA-Spots.

2.6. Mikrosatelliten-PCR

Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde anhand des für Kolon-Karzinome empfohlenen (sog. „Bethesda“-) Panels von 5 Mikrosatelliten-Loci (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) untersucht (Umar et al., 2004, Boland et al., 1998), welches um den Marker MYCL1 erweitert wurde. Auf dem HE-gefärbten Objektträger wurde bei der Mikroskopie die zu untersuchende Bereiche vom Tumor- und Normalgewebe von einem Pathologen eingezeichnet. Von dem zu untersuchenden Gewebe wurden fünf Leerschnitte (je 5 µm) direkt in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppi) überführt.

Die DNA-Isolation wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

DNA-Extraktion mit dem Maxwell RSC DNA FFPE Kit:

- 1 steriles 1,5 ml Eppi pro Probe beschriften
- 150 µl Lysis-Puffer vorlegen
- 50 µL Proteinase K dazu pipettieren, mit der Pipettenspitze aufmischen
- Gewebe einzeichnen, ggf. überschüssiges Gewebe entfernen
- gewünschtes Areal mit Hilfe einer geraden Klinge und einer Pipettenspitze ins Eppi kratzen
- auf einem Vortex mischen
- Im Thermomixer: 1 h, 56 °C, 1300 rpm inkubieren
- Im Thermomixer: 1 h, 90 °C, 1300 rpm inkubieren

Vorbereitung des Extraktions-Automaten (Promega Maxwell):

- Schwarzes Rack mit gewünschter Anzahl an Kartuschen möglichst ausgeglichen bestücken
- Achtung: Kartuschen müssen richtig einrasten
- Obere Lasche mit Hilfe der Pinzette nach oben klappen
- Vor jede Kartusche ein 0,5 ml Eppi fest in das dafür vorgesehene Loch stecken (der Deckel muss zum Körper gedreht sein)
- In jedes Eppi die entsprechende Menge Nuklease-freies Wasser hineingeben (kann zwischen 40-100 µl variieren) und bis zum Gebrauch wieder verschließen
- Stößel parat legen
- Sterile 1,5 ml Eppis für die fertige DNA beschriften

Aufreinigung im Extraktions-Automaten (Promega Maxwell):

- Folie von den Kartuschen ziehen
- Stößel ins letzte Loch jeder Kartusche stecken
- DNA kurz runterzentrifugieren und gesamte Menge ins erste Loch pipettieren
- Eppis mit H₂O öffnen
- Maxwell öffnen und starten (Laufzeit ca. 45 min)
- Wenn fertig, DNA in 1,5 ml Eppi umpipettieren und messen

Die PCR-Reaktion wird nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

- Jede PCR-Reaktion wird im Doppel-Ansatz durchgeführt. Für jeden PCR-Mastermix wird eine negative Kontrolle (ohne DNA) mitgeführt. Für die MSI-Analyse wird eine Multiplex-PCR für alle 6 Gene durchgeführt. Zur Kontrolle der DNA wird außerdem β -Globin untersucht. Diese wird ebenfalls mit in der Multiplex-PCR angesetzt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendete Primer.

Primer (je 100 pmol/μL)	Volumen in Primer-Mix	Endkonzentration
BAT25-F und -R	Je 40 μ L	Je 4 pmol/ μ L
BAT26-F und -R	Je 50 μ L	Je 5 pmol/ μ L
D2S123-F und -R	Je 50 μ L	Je 5 pmol/ μ L
D5S346-F und -R	Je 40 μ L	Je 4 pmol/ μ L
D17S250-F und -R	Je 150 μ L	Je 15 pmol/ μ L
MYCL1-F und -R	Je 140 μ L	Je 14 pmol/ μ L
β-Globin-F und -R	Je 30 μ L	Je 3 pmol/ μ L
Gesamtvolumen	1000 μL	

Für die Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte werden spezifische Primer (siehe Tabelle 12) sowie die AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase (Applied Biosystems) mit dem entsprechenden Puffersystem verwendet. Eingesetzte Desoxyribonukleotide (dNTPs) (Promega) werden für eine Konzentration von 2,5 mM folgendermaßen angesetzt:

- 900 μ l H₂O
- Je 25 μ l der Nukleotide Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) (Stammlösung 100 mmol)

- Gut durchmischen und je 250 µl aliquotieren

Der PCR-Ansatz (25 µl Gesamtvolumen) wird wie in der Tabelle 13 beschrieben zusammengestellt und mit dem Thermocyclerprogramm gemäß Tabelle 14 inkubiert.

Tabelle 12: verwendete Primer.

BAT25-F	FAM-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT*
BAT25-R	TCTGCATTTTAACTATGGCTC
BAT26-F	JOE-TGACTACTTTTGACTTCAGCC*
BAT26-R	AACCATTCAACATTTTAAACCC
D2S123-F	NED-AAACAGGATGCCTGCCTTTA*
D2S123-R	GGACTTTCACCTATGGGAC
D5S346-F	NED-ACTCACTCTAGTGATAAATCG*
D5S346-R	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT
D17S250-F	FAM-GGAAGAATCAAATAGACAAT*
D17S250-R	GCTGGCCATATATATATTAAACC
MYCL1-F	JOE-TGGCGAGACTCCATCAAAG*
MYCL1-R	CCTTTTAAGCTGCAACAATTTC
β-Globin-F	JOE-GCCATCACTAAAGGCACCGAGC*
β-Globin-R	ATGGTGCATCTGACTCCTGAGG

*FAM, JOE, NED sind Farbstoffkonjugate an den Primern.

Tabelle 13: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.

Komponente	Konzentration	Einsatzvolumen
PCR-Puffer	10 x	2,5 µL
dNTP	2,5 mM	2 µL
Primermix		1 µL
TaqPolymerase	5 U/µL	0,3 µL
H2O	-	17,2 µL
DNA	50 ng/µL	2 µL
Endvolumen		25 µL

Tabelle 14: Thermocycler-Programm.

1	T = 95 °C	10 min
2	T = 95 °C	40 s
3	T = 54 °C	40 s
4	T = 72 °C	60 s
5	Zurück zu Schritt 2, 41-mal wiederholen	
6	T = 72 °C	7 min
7	T = 10 °C	unendlich

Für die Analyse der Fragmentlänge werden je 2 ng des PCR-Produktes zu einem Gemisch aus Formamid und dem DNA-Längenstandard ROX 500 (0.3 µL Rox in 10 µL Formamid) mit einem Endvolumen von 13 µL gegeben. Der Ansatz wird für 2 Minute bei 95 °C denaturiert, anschließend für 5 Minute auf Eis abgekühlt und in die Sequenatorplatte zur Fragmentlängenanalyse am ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) pipettiert. Die detektierten DNA-Fragmente können anschließend ausgewertet werden.

2.6.1. Auswertung der Mikrosatelliten-PCR

Zur Auswertung wurden die Fragmentgrößen der Tumorproben mit denen der des Normalgewebes verglichen. Eine Abweichung des Fragmentmusters, d.h. neu hinzugekommenen oder verloren gegangene Fragmente, wurden als Instabilität des jeweiligen Markers gewertet. Ein identisches Fragmentmuster wurde als „stabil“ für den jeweiligen Marker gewertet. Eine Ausnahme ist der Verlust aller Fragmente eines Alleles. In diesem Fall wurde der Befund als LOH (loss of heterozygosity) und damit als „stabil“ im Sinne der MSI-Analyse gewertet. Eine Mikrosatelliten-Stabilität (MMS) wurde dann angenommen, wenn alle Mikrosatelliten ein stabiles Ergebnis zeigen. Eine geringe Instabilität (*MSI-low*) wurde definiert als Instabilität eines der Marker. Eine hohe Instabilität (*MSI-high*) wurde definiert als Instabilität von mindestens 2 der Marker.

2.7. Statistik

Zum Vergleich kategorischer Daten wie pT, pN oder Intensität der MMR-Genexpression wurden X²-Test bzw. Mehrfeldertests durchgeführt. Zum Vergleich von den kontinuierlichen Variablen (z.B Lymphozytenzahl) mit kategorischen Variablen wurden Varianzanalysen (ANOVA) und T-Tests verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Mikrosatelliteninstabilität

3.1.1. Auswertbarkeit

Die Anzahl der auswertbaren Gewebeproben ist für jeden MMR-Marker separat in der Tabelle 15 - getrennt nach allen Tumoren und der reinen Adenokarzinome des Pankreas (die größte Untergruppe) - gegeben. Die anderen Pankreastumoren zeigten keine Befunde, welche auf eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) hindeuteten.

Tabelle 15: Anzahl der Auswertbarkeit der 4 MMR-Proteine.

		alle Tumoren	Adenokarzinom des Pankreas
	Gesamt	599	528
MMR-Marker	MLH1	552	487
	PMS2	555	488
	MSH2	552	484
	MSH6	550	483

3.1.2. Identifikation von verdächtigen Fällen

Insgesamt zeigten 6 Tumoren auffällige Befunde. In allen Fällen wurde eine komplett negative Immunhistochemie von MSH6 beobachtet, in 3 Fällen lag zusätzlich ein Verlust von PMS2 vor. Beispiele von Tumoren mit erhaltener Expression von MMR-Genen und von Tumoren mit Verlust der Expression von MMR-Genen sind in der Abbildung 9 (TMA-Spots), 10 und 11 (Großschnitte) dargestellt. Die detaillierten Befunde dieser 6 Fälle sind in der Tabelle 16 gezeigt. Ein negativer immunhistochemischer Befund in den Tumorzellen wurde nur dann angenommen, wenn im umgebenden Normalgewebe eine positive Färbung des entsprechenden MMR-Proteins zu sehen war und somit ein technischer Grund für die negative Immunhistochemie in den Tumorzellen ausgeschlossen werden konnte.

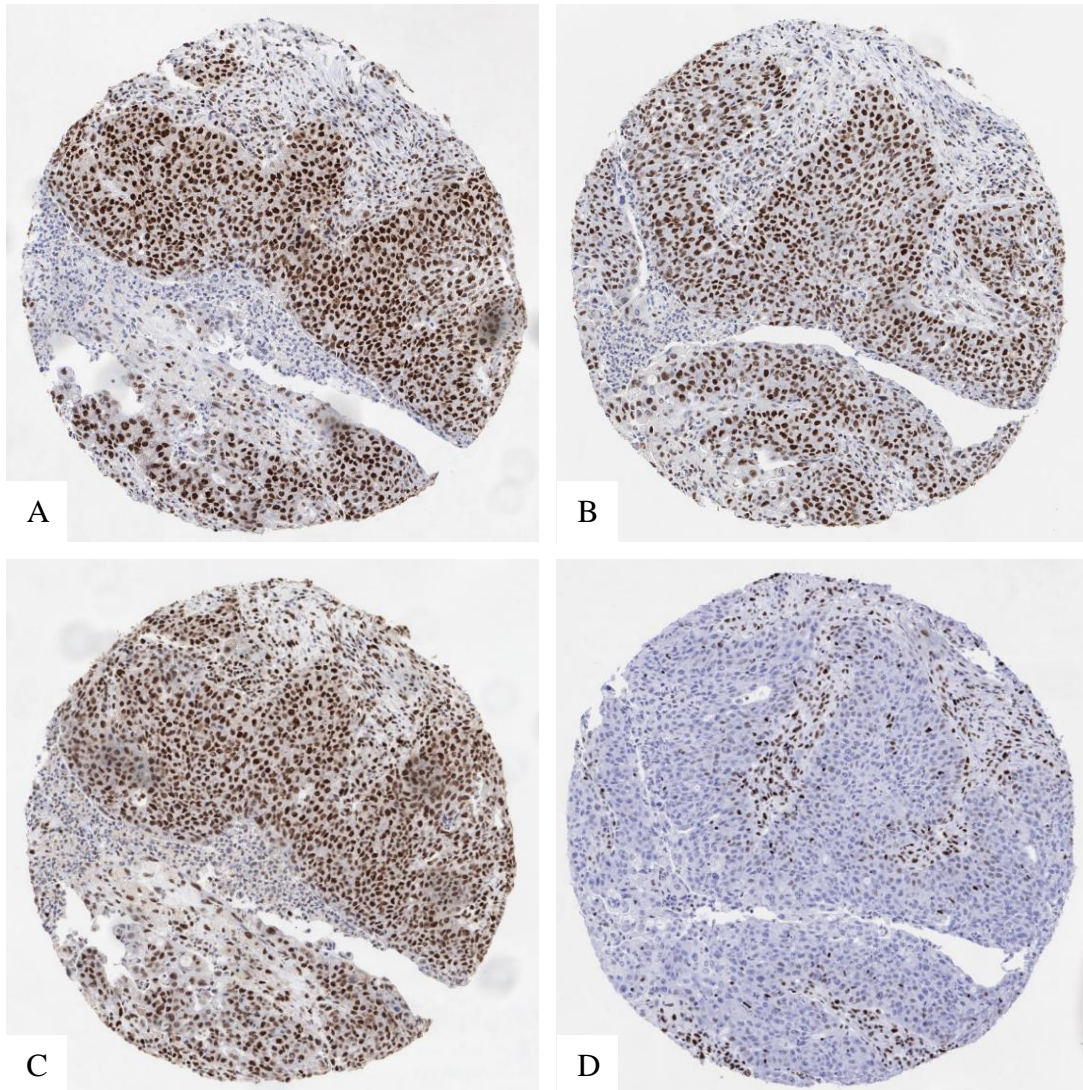


Abbildung 9: Immunhistochemische Befunde vom TMA-Spot Koordinate A-B51
A: MLH1 pos; B: PMS2 pos; C: MSH2 pos; D: MSH6 neg;
pos: positiv (Expression); neg: negativ (Verlust).

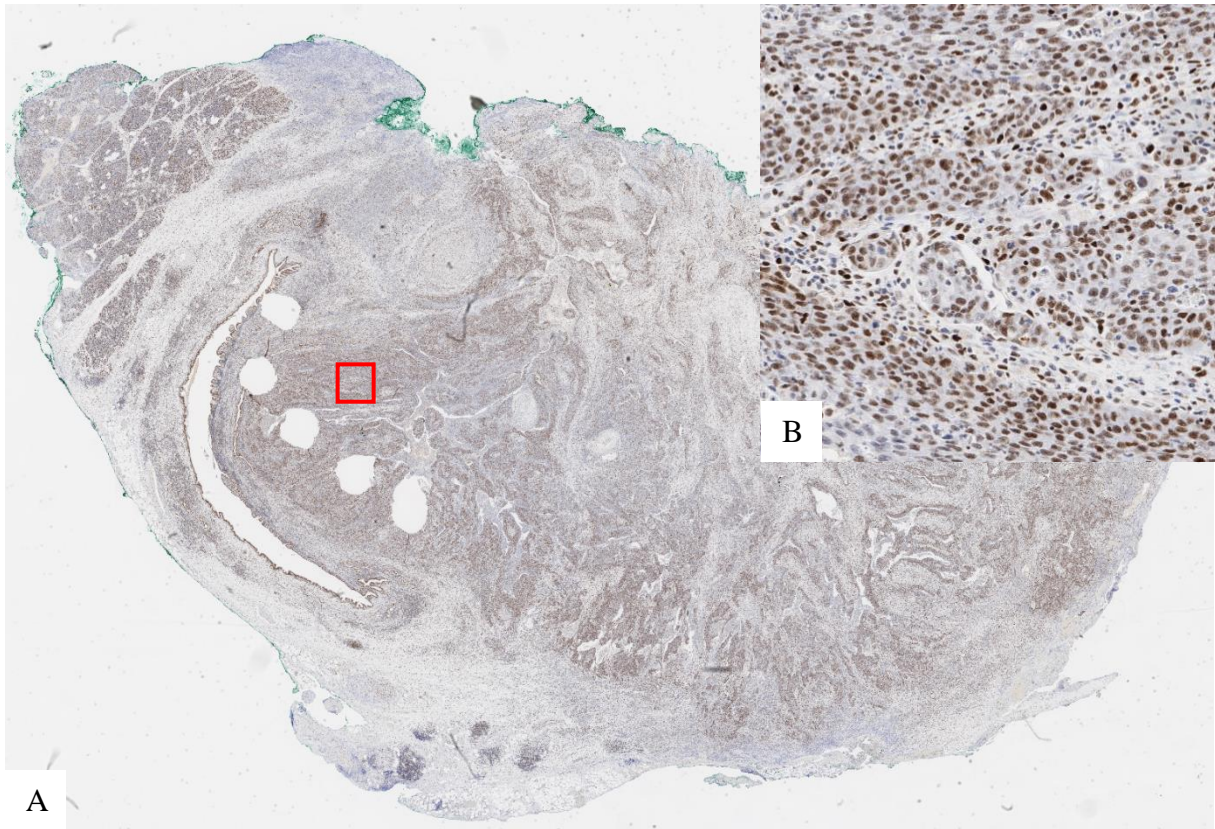


Abbildung 10: A: MSH2-positiver Befund im Großschnitt vom TMA-Spot Koordinate A-B51;
B: Vergrößerung des markierten Areals

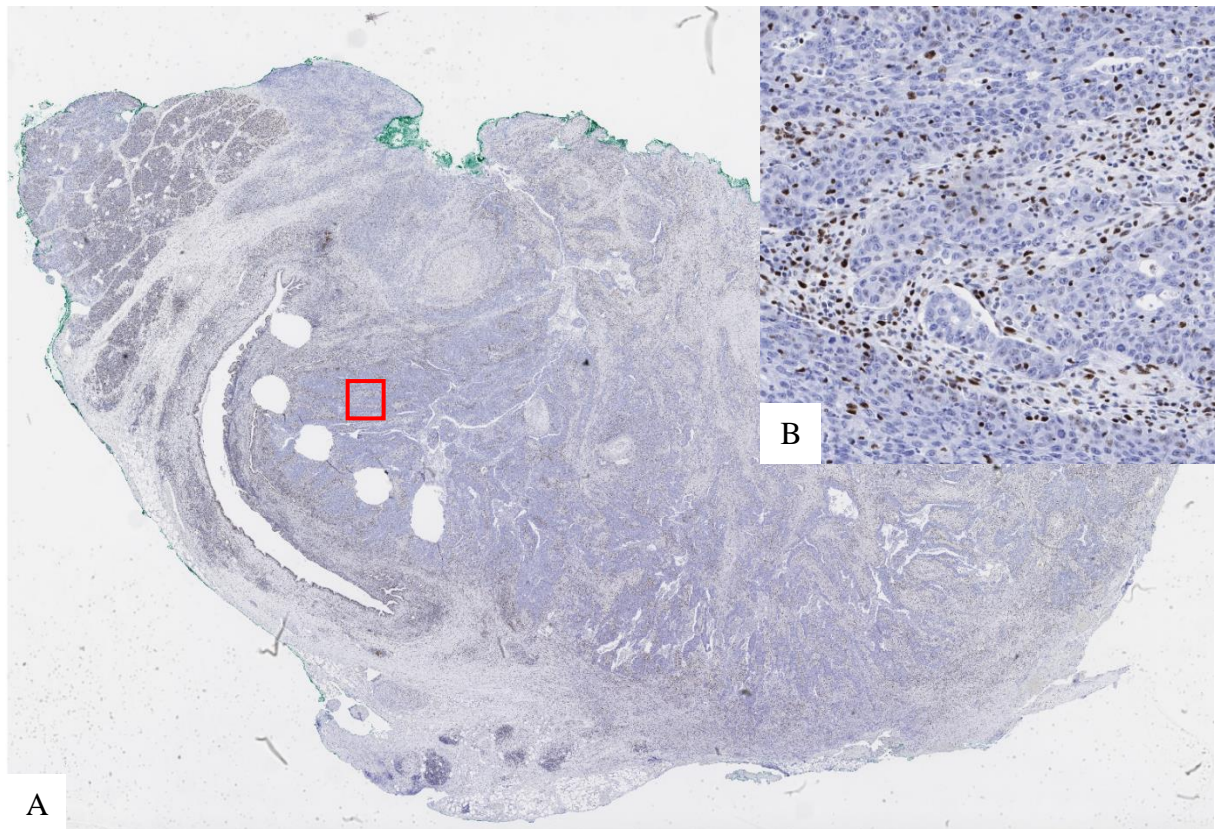


Abbildung 11: A: MSH6-negativer Befund im Großschnitt vom TMA-Spot Koordinate A-B51;
B: Vergrößerung des markierten Areals.

Tabelle 16: MMR-immunohistochemische-Befunde von 6 Tumoren mit Verdacht auf MMR-Defekt.

TMA-Array TMA- Koordinate	A B 1g	A B 5f	A B 5l	B A 2g	A B 5g	A D 1k
MLH1 Intensität Tumorzellen	2	1	3	2	2	2
% gefärbte Tumorzellen	70	50	100	100	50	100
IHC Ergebnis	mäßig	schwach	stark	stark	mäßig	stark
Status	MLH1 intakt	MLH1 intakt	MLH1 intakt	MLH1 intakt	MLH1 intakt	MLH1 intakt
PMS2 Intensität Tumorzellen	2	2	3	2	2	3
% gefärbte Tumorzellen	100	50	100	50	70	100
IHC Ergebnis	stark	mäßig	stark	mäßig	mäßig	stark
Status	PMS2 intakt	PMS2 intakt	PMS2 intakt	PMS2 intakt	PMS2 intakt	PMS2 intakt
MSH2 Intensität Tumorzellen	0	0	3	0	3	3
% gefärbte Tumorzellen	0	0	100	0	100	100
Färbung im Normalgewebe	+	+		+		
IHC Ergebnis	negativ	negativ	stark	negativ	stark	stark
Status	MSH2 defekt	MSH2 defekt	MSH2 intakt	MSH2 defekt	MSH2 intakt	MSH2 intakt
MSH6 Intensität Tumorzellen	0	0	0	0	0	0
% gefärbte Tumorzellen	0	0	0	0	0	0
Färbung im Normalgewebe	+	+	+	+	+	+
IHC Ergebnis	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Status	MSH6 defekt	MSH6 defekt	MSH6 defekt	MSH6 defekt	MSH6 defekt	MSH6 defekt

IHC = Immunhistochemie, + = positive Färbung der Normalgewebe

3.1.3. Großschnitt-Analysen, Heterogenität und PCR-Validierung

Die 6 auffälligen Tumoren wurden am konventionellen Großschnittpräparat überprüft. In 2 Fällen (Koordinaten A-B5f und A-B5g) ergab bereits die Färbungen an konventionellen Großschnitten, dass die negative Immunhistochemie für MSH2 und MSH6 artifiziell und nur auf kleine Gewebeanteile beschränkt war. Zufälligerweise färbten die Gewebeareale, die im TMA-Spot erfasst wurden, sich nicht an.

In den weiteren 4 Fällen bestätigte sich jedoch der Expressionsverlust im jeweiligen Großschnitt sowie bei der Analyse aller weiteren Tumor-haltigen Blöcke des jeweiligen Falles. Von den 4 Fällen mit der Koordinate A-B1g, A-B5l, A-D1k und B-A2g wurden jeweils 15, 16, 7 und 6 Tumorblöcke untersucht. Der Verlust der jeweiligen MMR-Marker wurden in allen 4 Fällen in jedem der untersuchten Tumorblöcke gefunden (homogene MMR-Defizienz).

Die Überprüfung mit Mikrosatelliten-PCR bestätigte diese Befunde in 3 der 4 Fälle (Tabelle 17). In einem Fall, der nach der immunhistochemischen Großschnittanalyse keinen Verlust von MMR-Proteinen zeigte, war einer der Loci nicht auswertbar, sodass hier eine MSI-Low-Status nicht ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 17: Ergebnisse der immunhistochemischen Großschnittanalyse und PCR-Untersuchung.

Array	Koordinate	Immunhistochemische Großschnittanalyse					MSI-PCR					MSI-Status
		MLH1	PMS2	MSH2	MSH6	MMR-Status	BAT25	BAT26	D17S25	D5S346	D2S123	
A	B 1g	pos	pos	neg	neg	defekt	i	i	i	i	s	MSI-high (4/5)
A	B 5f	pos	pos	pos	pos	intakt	s	s	s	s	s	MSS (0/5)
A	B 5l	pos	pos	pos	neg	defekt	s	s	s	s	s	MSS (0/5)
A	B 5g	pos	pos	pos	pos	intakt	s	s	s	s	x	MSS (0/4)
A	D 1k	pos	pos	neg	neg	defekt	i	i	i	i	s	MSI-high (4/5)
B	A 2g	pos	pos	neg	neg	defekt	i	i	i	i	i	MSI-high (5/5)

pos = positiv, neg = negativ, i = instabil, s = stabil, x = nicht interpretierbar, MSI-high = hochgradige Mikrosatelliteninstabilität, MSS = Mikrosatelliten stabil.

3.1.4. Intensität der MMR-Immunfärbung im Vergleich zum Tumorphänotyp

Für die nachfolgende Analyse wurde nur die größte Untergruppe der n=528 Adenokarzinome des Pankreas berücksichtigt. Der Zusammenhang der immunhistochemischen Färbung von MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6 mit dem Tumorstadium, dem

Differenzierungsgrad, dem Nodalstatus bzw. Lymphknotenmetastasen, den Fernmetastasen und dem Status des chirurgischen Resektionsrandes (R-Status) ist in den Tabellen 18-21 dargestellt. In die Analyse wurde auch die Tumoren mit einbezogen, deren Stroma ein negatives Färbeergebnis zeigte. In keinem Fall ergaben sich statistisch signifikante Assoziationen.

Tabelle 18: MLH1-Färbung und Tumorphänotyp.

		Ergebnisse von MLH1-Immunhistochemie					P-Wert
		n evaluable	negativ (%)	schwach (%)	mäßig (%)	stark (%)	
Alle Tumoren		487	1	5.1	16.4	77.4	
Tumorstadium	pT1	14	0	0	14.3	85.7	0.443
	pT2	71	0	2.8	11.3	85.9	
	pT3	372	1.3	5.4	17.5	75.8	
	pT4	28	0	10.7	17.9	71.4	
Grad	1	17	0	0	17.6	82.4	0.796
	2	346	0.6	6.1	16.8	76.6	
	3	103	1	3.9	16.5	78.6	
Lymphknoten- metastasen	pN0	102	0	4.9	18.6	76.5	0.4209
	pN+	383	1.3	5.2	15.7	77.8	
Fernmetastasen	pM0	393	1.3	5.6	15.5	77.6	0.2507
	pM1	93	0	3.2	20.4	76.3	
R-Status	R0	247	0.4	4.5	15.4	79.8	0.2406
	R1	200	2	7	15.5	75.5	

Tabelle 19: PMS2-Färbung und Tumorphänotyp.

		Ergebnisse von PMS2-Immunhistochemie					P Wert
		n evaluable	negativ (%)	schwach (%)	mäßig (%)	stark (%)	
Alle Tumoren		488	0.6	8	18	73.4	
Tumorstadium	pT1	14	0	14.3	14.3	71.4	0.6862
	pT2	71	0	4.2	14.1	81.7	
	pT3	372	0.8	8.1	19.1	72	
	pT4	29	0	13.8	17.2	69	
Grad	1	17	0	0	11.8	88.2	0.5081
	2	347	0.6	8.4	18.2	72.9	
	3	103	0	8.7	20.4	70.9	
Lymphknoten- metastasen	pN0	105	0	16.2	19	64.8	0.0065
	pN+	381	0.8	5.8	17.8	75.6	
Fernmetastasen	pM0	393	0.8	8.1	17.6	73.5	0.6513
	pM1	94	0	7.4	20.2	72.3	
R-Status	R0	249	0.4	7.6	16.1	75.9	0.4918
	R1	199	1	9.5	19.6	69.8	

Tabelle 20: MSH2-Färbung und Tumorphänotyp.

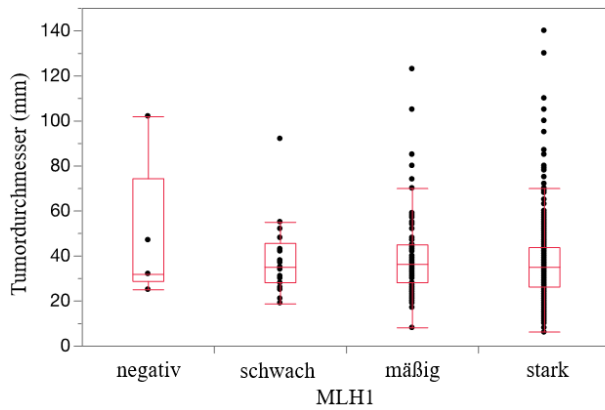
Ergebnisse von MSH2-Immunhistochemie							
		n evaluable	negativ (%)	schwach (%)	mäßig (%)	stark (%)	P Wert
Alle Tumoren		484	1.2	1.2	4.3	93.2	
Tumorstadium	pT1	14	0	0	0	100	0.3337
	pT2	71	0	0	1.4	98.6	
	pT3	369	1.6	1.4	5.1	91.9	
	pT4	28	0	3.6	3.6	92.9	
Grad	1	17	0	0	5.9	94.1	0.9758
	2	343	1.2	1.5	4.7	92.7	
	3	104	1	1	3.8	94.2	
Lymphknoten- metastasen	pN0	102	1	0	2	97.1	0.1592
	pN+	380	1.3	1.6	5	92.1	
Fernmetastasen	pM0	388	1.3	1.5	4.6	92.5	0.3666
	pM1	95	1.1	0	3.2	95.8	
R-Status	R0	243	1.6	1.6	3.7	93	0.5842
	R1	202	0.5	1	4.5	94.1	

Tabelle 21: MSH6-Färbung und Tumorphänotyp.

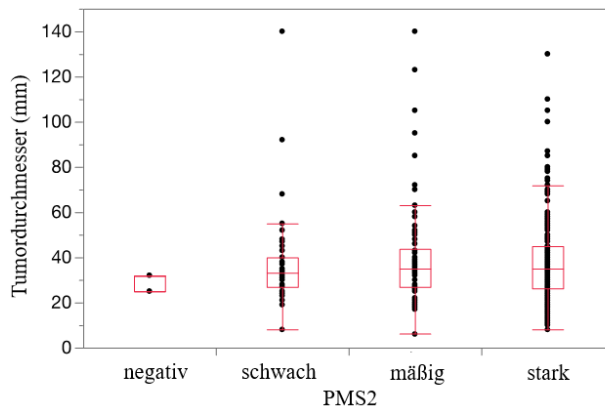
		Ergebnisse von MSH6-Immunhistochemie					P-Wert
		n evaluatable	negativ (%)	schwach (%)	mäßig (%)	stark (%)	
Alle Tumoren		483	1.9	4.6	9.5	84.1	
Tumorstadium	pT1	13	0	0	0	100	0.1753
	pT2	72	0	2.8	6.9	90.3	
	pT3	370	2.4	5.1	10.8	81.6	
	pT4	26	0	3.8	3.8	92.3	
Grad	1	16	0	0	0	100	0.2143
	2	341	2.1	5.3	8.8	83.9	
	3	104	1	3.8	13.5	81.7	
Lymphknoten- metastasen	pN0	104	1.9	3.8	11.5	82.7	0.8718
	pN+	377	1.9	4.8	9	84.4	
Fernmetastasen	pM0	390	2.1	5.4	10	82.6	0.1401
	pM1	92	1.1	1.1	7.6	90.2	
R-Status	R0	241	2.5	5	9.5	83	0.6689
	R1	202	1	5	8.9	85.1	

3.1.5. Intensität der MMR-Immunfärbung im Vergleich zur Tumorgroße

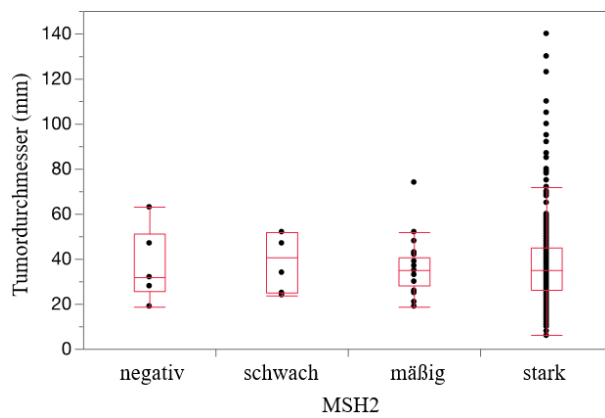
Auch diese Analyse wurde auf die größte Untergruppe der n=528 Adenokarzinome des Pankreas beschränkt. Die Daten zur MMR-Immunhistochemie und zur Tumorgroße waren von 461 (MLH1), 462 (PMS2), 457 (MSH2) und 457 (MSH6) Tumoren verfügbar. Der Vergleich der Färbeintensität bzw. des Expressionsniveaus der MMR-Marker mit der Tumorgroße ergab keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt.



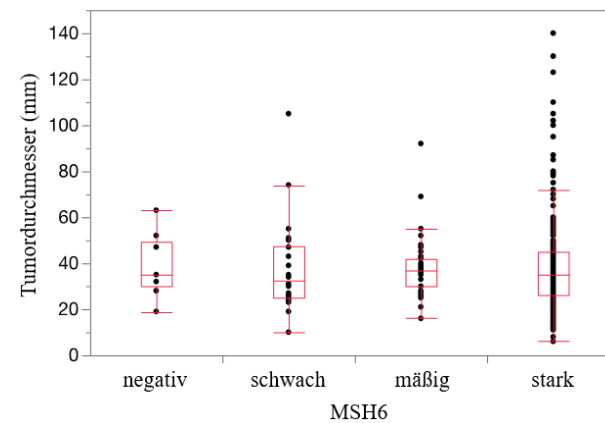
MMR	Färbung	n	Tumordurchmesser (mm)
			Mittelwert ± Standardabweichung
MLH1 p=0,5518	negativ	5	47,6 ± 8,3
	schwach	25	37,8 ± 3,7
	mäßig	77	39,7 ± 2,1
	stark	354	37,6 ± 1



MMR	Färbung	n	Tumordurchmesser (mm)
			Mittelwert ± Standardabweichung
PMS2 p=0,5788	negativ	3	29,7 ± 10,7
	schwach	39	37,7 ± 3
	mäßig	82	40,2 ± 2
	stark	338	37,6 ± 1



MMR	Färbung	n	Tumordurchmesser (mm)
			Mittelwert ± Standardabweichung
MSH2 p=0,9632	negativ	6	36,8 ± 7,6
	schwach	6	39 ± 7,6
	mäßig	21	33,1 ± 4,1
	stark	424	38,1 ± 0,9



MMR	Färbung	n	Tumordurchmesser (mm)
			Mittelwert ± Standardabweichung
MSH6 p=0,9998	negativ	9	38,1 ± 6,2
	schwach	22	38,1 ± 4
	mäßig	44	38 ± 2,8
	stark	382	38,3 ± 1

Abbildung 12: Tumorgöße und Expressionsniveau von MMR-Proteinen.

3.2. CD8⁺-Lymphozytendichte

3.2.1. Auswertbarkeit

Die CD8⁺-Lymphozytendichte konnte von n=553 der n=599 Tumoren des Gewebearrays bestimmt werden. Die folgenden Analysen wurde auch auf die Untergruppe der Adenokarzinome des Pankreas beschränkt, bei denen in 487 von 528 Fällen (92,2 %) die CD8⁺-Lymphozytendichte ermittelt werden konnte. Beispiele für CD8⁺-Immunfärbungen und den dazugehörigen Messwerten sind in der Abbildung 13 gezeigt.

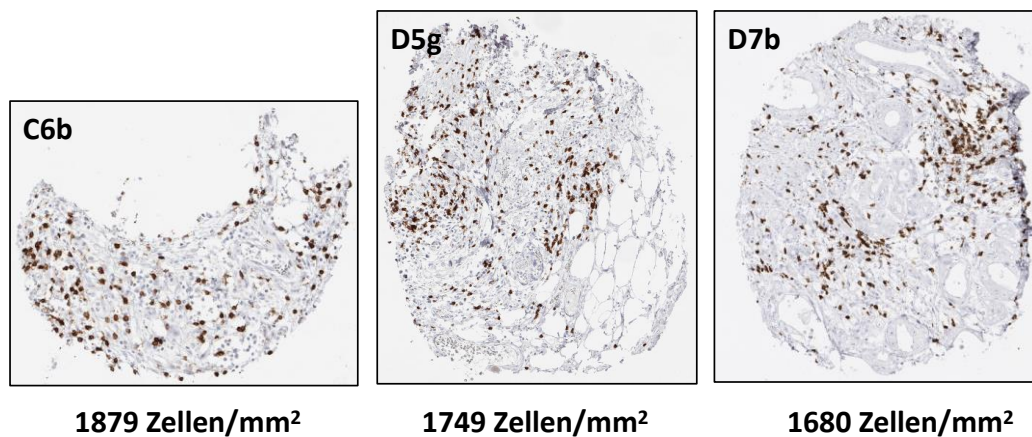


Abbildung 13: Beispiele von Gewebespots mit unterschiedlicher CD8⁺-Lymphozytendichte.

Die Häufigkeits-Verteilung der CD8⁺-Lymphozytendichte ist in der Abbildung 14 dargestellt. In etwa der Hälfte der Fälle wurden bis zu 100 CD8⁺-Zellen/mm² gezählt. In der Spitze fanden sich in einzelnen Spots jedoch auch über 1000 Zellen/mm². Im Durchschnitt wurden 221 CD8⁺-Zellen/mm² gezählt.

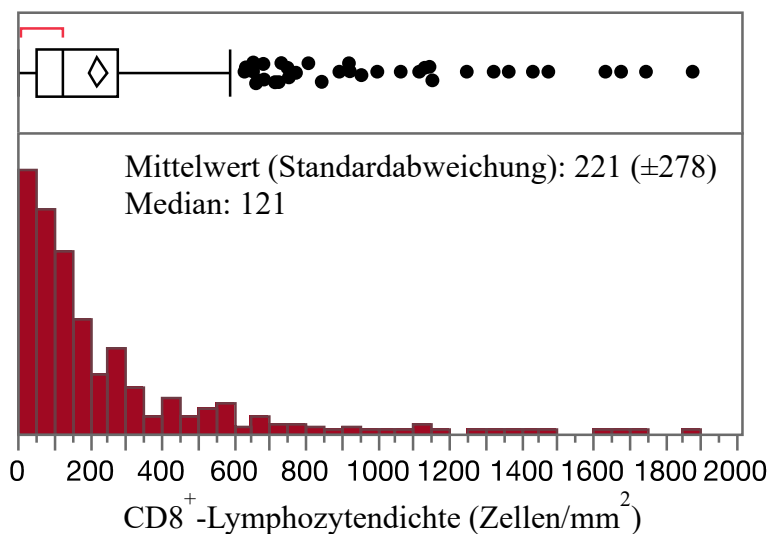


Abbildung 14: Verteilung der CD8⁺-Lymphozytendichte beim Pankreaskarzinom.

3.2.2. Vergleich der CD8⁺-Lymphozytendichte mit dem Tumorphänotyp

Auch für die nachfolgende Analyse wurde nur die größte Untergruppe der n=528 Adenokarzinome des Pankreas berücksichtigt. Der Zusammenhang der CD8⁺-Lymphozytendichte mit dem Tumorstadium (pT), dem Nodalstatus (pN), den Fernmetastasen (pM), Differenzierungsgrad und dem Status des chirurgischen Resektionsrandes (R-Status) sowie dem Tumordurchmesser ist in den Abbildungen 15-17 dargestellt. In keinem Fall ergaben sich statistisch signifikante Assoziationen.

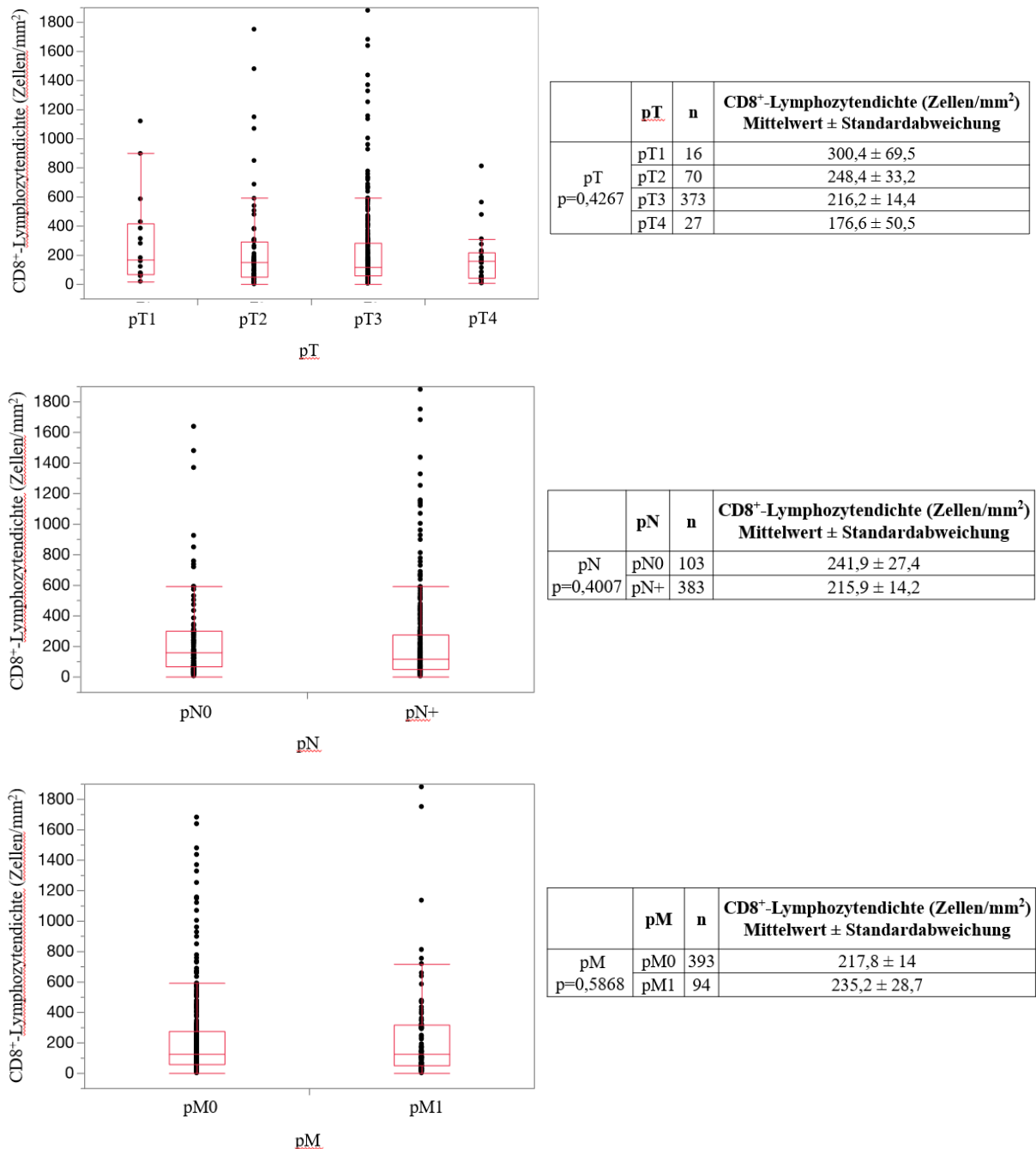
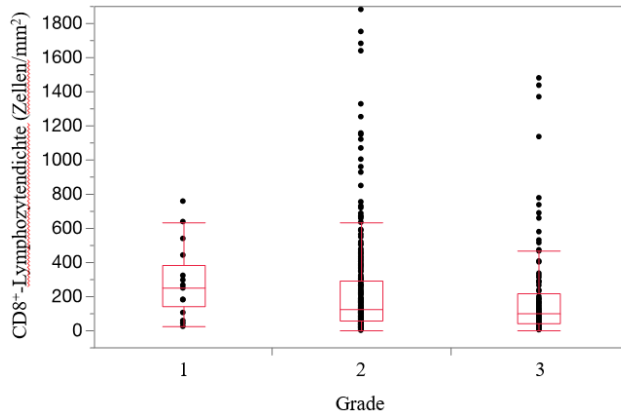
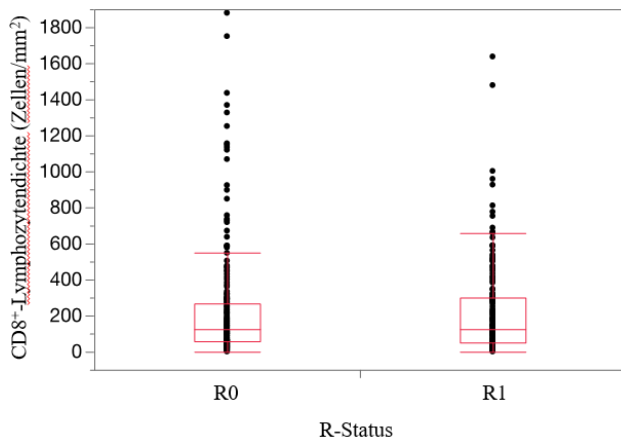


Abbildung 15: CD8⁺-Lymphozytendichte und Tumorphänotyp (pT, pN und pM).



	Grad	n	CD8 ⁺ -Lymphozytendichte (Zellen/mm ²) Mittelwert ± Standardabweichung
Grad p=0,5298	1	17	279,8 ± 67,8
	2	344	223,6 ± 15,1
	3	105	201,9 ± 27,8



	R-Status	n	CD8 ⁺ -Lymphozytendichte (Zellen/mm ²) Mittelwert ± Standardabweichung
R-Status p=0,6984	R0	246	227,3 ± 17,7
	R1	203	217 ± 19,5

Abbildung 16: CD8⁺-Lymphozytendichte, Differenzierungsgrad und R-Status.

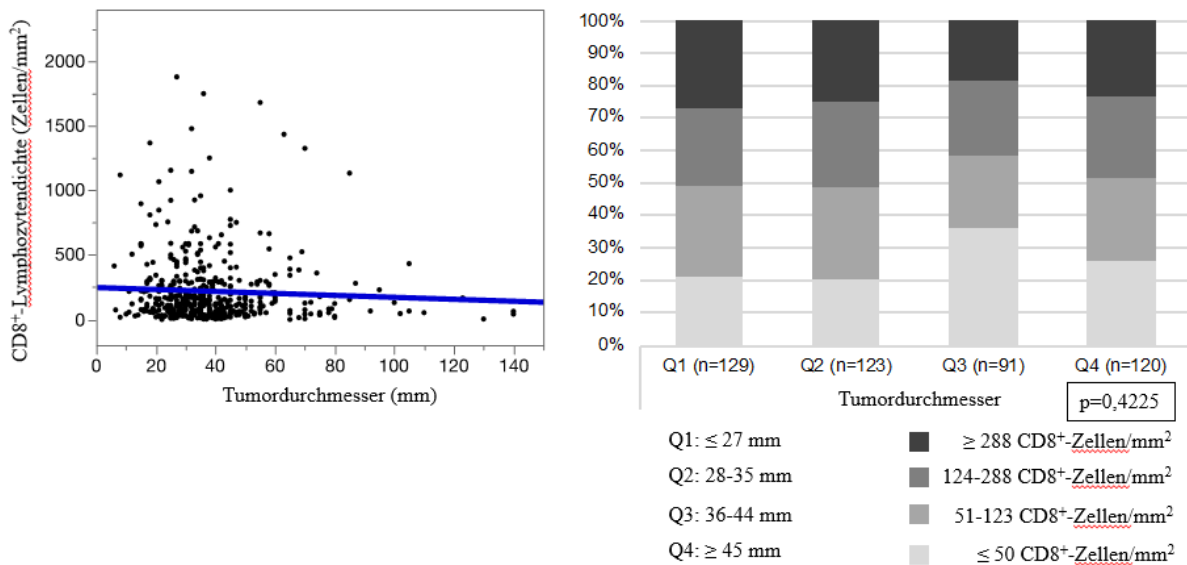


Abbildung 17: CD8⁺-Lymphozytendichte und Tumorgröße.

Links: Vergleich der numerischen Rohdaten; Rechts: Vergleich nach Gruppierung der numerischen Rohdaten in kategoriale Werte (Quartilen: Q1 bis Q4).

3.2.3. Vergleich der CD8⁺-Lymphozytendichte mit der Färbung der MMR-Marker

Auch diese Analyse wurde auf die größte Untergruppe der n=528 Adenokarzinome des Pankreas beschränkt. Die Daten zur MMR-Immunhistochemie und zur CD8⁺-Lymphozytendichte waren von 471 (MLH1), 468 (PMS2), 465 (MSH2) und 471 (MSH6) Tumoren verfügbar. Der Vergleich der CD8⁺-Lymphozytendichte mit der Expressionsstärke der 4 MMR-Proteine ergab keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Diese Daten sind in der Abbildung 18 zusammengefasst.

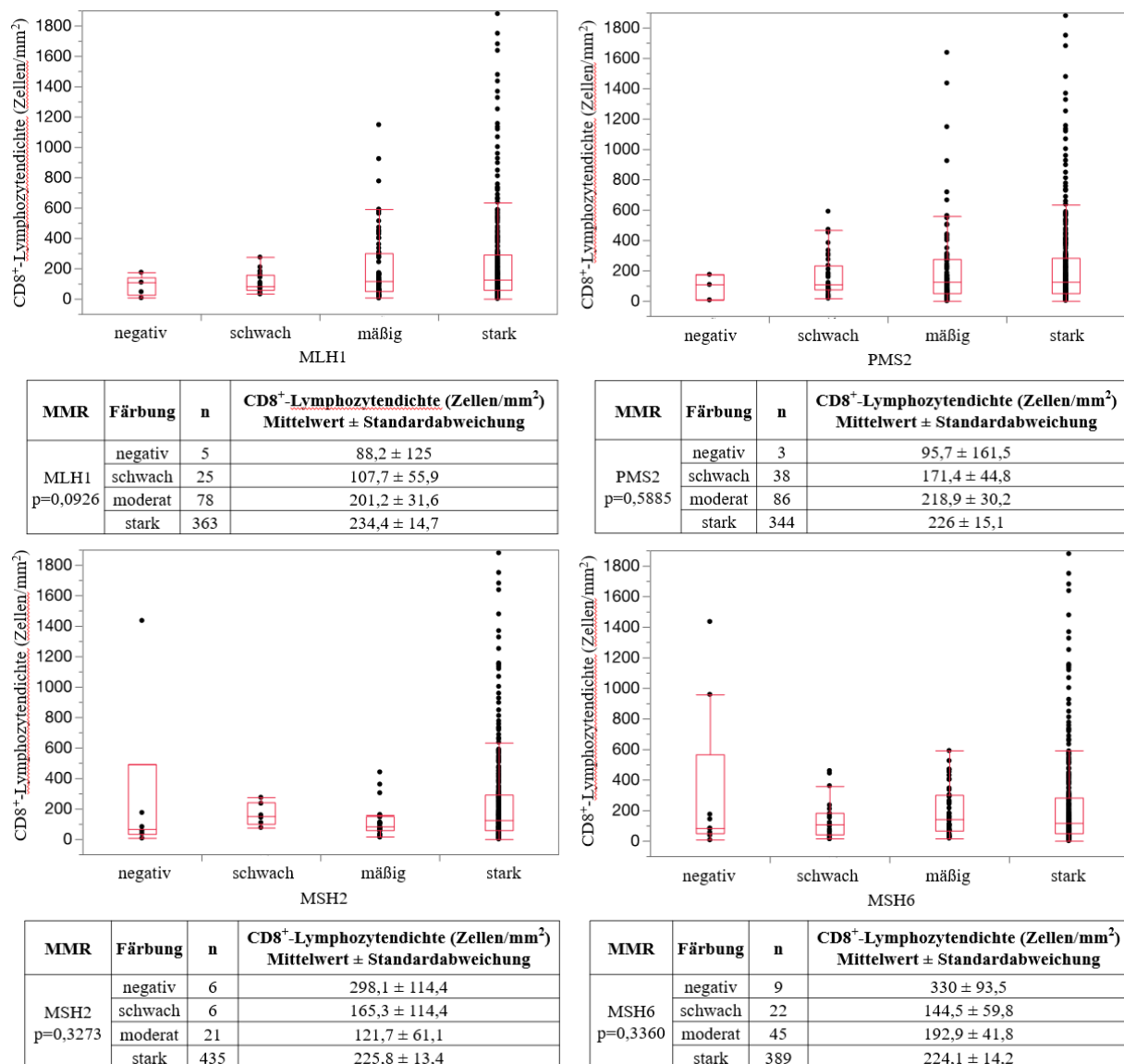
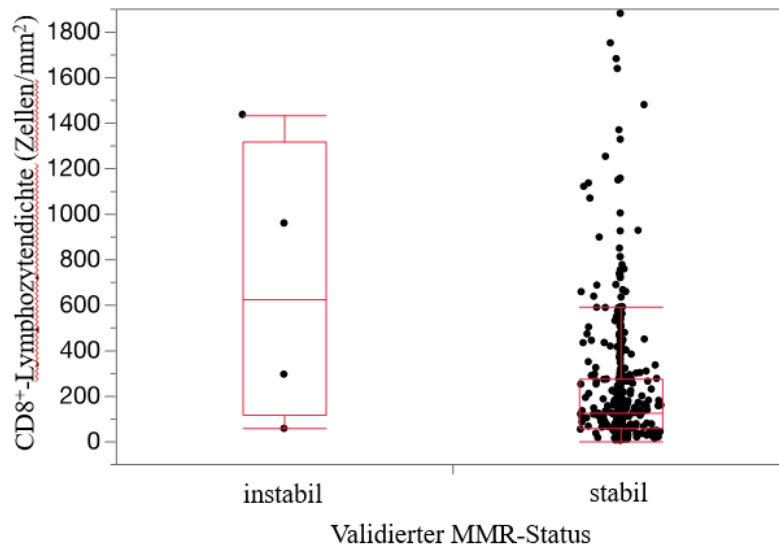


Abbildung 18: CD8⁺-Lymphozytendichte und Expressionsniveau von MMR-Proteinen.

Der MMR-Status dagegen war hochsignifikant mit der CD8⁺-Lymphozytendichte assoziiert (p=0,002). Die n=4 Tumoren mit MMR-Defekten hatten eine mittlere CD8⁺-Lymphozytendichte von 685 Zellen/mm², während Tumoren mit stabilem Status im Mittel nur

217 Zellen/mm² aufwiesen (Abbildung 19). Interessanterweise zeigte innerhalb der 4 mikrosatelliteninstabilen Tumoren derjenige Fall mit dem "diskrepananten" Analyse-Ergebnis (Koordinate A-B51, MSH6-Defekt in der MMR-Immunhistochemie aber Mikrosatelliten-PCR-stabil, siehe Tabelle 17) die zweithöchste CD8⁺-Lymphozytendichte von 957,5 Zellen/mm². Dagegen war der Tumor mit der geringsten CD8⁺-Lymphozytendichte (55,3 Zellen/mm²) übereinstimmend in beiden Analysen instabil.



MMR-Status	n	CD8 ⁺ -Lymphozytendichte (Zellen/mm ²)
		Mittelwert ± Standardabweichung
instabil	4	685,178 ± 139,23
stabil	458	217,918 ± 13,01

p=0,0020

Abbildung 19: MMR-Status und CD8⁺-Lymphozytendichte.

4. Diskussion

Insgesamt 599 Pankreasmalignome – darunter 528 Adenokarzinome des Pankreas, 60 Adenokarzinome der Papilla Vateri, 7 Azinuszellkarzinome des Pankreas und 4 andere seltene Pankreasmalignome – wurden in der vorliegenden Studie auf das Vorliegen einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mit dem *Tissue-Microarray* (TMA) untersucht. Die Untersuchung ergab einen *Mismatch-Reparatur* (MMR)-Defekt bzw. eine MSI in 4 von 528 reinen Adenokarzinomen des Pankreas (0,76 %), während die anderen Pankreastumoren keine Befunde zeigten, die auf eine MSI hindeuteten. Diese Häufigkeit passt gut zu der MSI-Prävalenz von Adenokarzinomen des Pankreas, die von mehreren Studien unter Verwendung ähnlicher Methoden beschrieben worden waren. Laghi et al. hatten in 1 von 338 (0,3 %) (Laghi et al., 2012), Connor et al. in 4 von 255 (1,6 %) (Connor et al., 2017), Lupinacci et al. in 8 von 513 (1,6 %) (Lupinacci et al., 2018) und Hu et al. in 7 von 833 (0,8 %) (Hu et al., 2018) Adenokarzinomen des Pankreas eine MSI gefunden (Luchini et al., 2021). Unsere Untersuchungen in Kombination mit den früheren Studien machen deutlich, dass die MSI beim Pankreaskarzinom ein seltenes Ereignis ist, welche in ca. 1 % der Fälle vorkommt. Für diese Annahme spricht, dass eine Vielzahl der neueren Studien die MSI mit verschiedenen Methoden (Immunhistochemie, PCR, *Next Generation Sequencing*) bestimmt hatten und übereinstimmend eine Prävalenz in diesem Bereich (ca. 1 %) identifiziert hatten. Frühere Studien, welche deutlich höhere MSI-Raten gefunden hatten, hatten meisten nur eine Methode verwendet und Kriterien angewendet, welche nicht genau den aktuell Üblichen entsprechen (Luchini et al., 2021).

In der vorliegenden Studie ist hervorzuheben, dass bei 1 von 4 immunhistochemisch eindeutig MMR-defizienten Tumoren die PCR-Analyse keine MSI nachweisen konnte. Dies schließt eine MSI im Tumor (Koordinate A-B51) nicht aus, denn der für die MSI-Analyse verwendete MMR-Marker vom Bethesda-Panel wurde zum MSI-Nachweis bei Kolonkarzinomen entwickelt (Boland et al., 1998). Studien haben gezeigt, dass die Art der von der MSI betroffenen Mikrosatelliten gewebespezifisch variabel sein kann und möglicherweise abhängig von der gewebespezifischen Genaktivität (Hause et al., 2016). Auch die hohe Anzahl von CD8⁺-Lymphozyten (>900 Zellen/mm²) in dem einen Tumor (Koordinate A-B51) mit MSH6-Verlust, aber fehlendem Nachweis einer MSI auf der molekularen Ebene spricht dafür, dass es sich bei dem Fall um einen echten mikrosatelliteninstabilen Tumor handelt. Möglicherweise ist der immunhistochemische Nachweis eines MMR-Proteinverlustes im Pankreaskarzinom der PCR-Analyse mit Bethesda-Panel vorzuziehen.

Zwei der kürzlich durchgeführten Studien an 513 (Lupinacci et al., 2018) bzw. 833 (Hu et al., 2018) Fällen hatten den klinischen Verlauf der mikrosatelliteninstabilen mit dem diejenigen von nicht mikrosatellitenstabilen Adenokarzinomen des Pankreas verglichen und keine prognostische Bedeutung von MSI gefunden (Lupinacci et al., 2019, Luchini et al., 2021). Dennoch hat die Studie von Grant et al. im Jahr 2021 gezeigt, dass die Patient:innen mit MMR-defizienten Pankreaskarzinomen eine bessere Prognose nach einer chirurgischen Resektion haben (Grant et al., 2021). Es muss dabei beachtet werden, dass die Fallzahl von diesen 3 Studien mit 7 (Hu et al., 2018), 8 (Lupinacci et al., 2018) und 9 (Grant et al., 2021) mikrosatelliteninstabilen Pankreaskarzinomen so klein waren, dass keine finale Schlussfolgerung zur Prognoserelevanz von MSI/MMR-Defekten gezogen werden kann. Auch in der vorliegenden Studie war die Anzahl der mikrosatelliteninstabilen Tumoren mit n=4 zu klein, um eine klinische Korrelation zu untersuchen.

Die Untersuchung einer großen Anzahl von Tumoren wurde in der vorliegenden Studie durch die Verwendung der TMA-Methode ermöglicht. Die TMA-Methode weist im Vergleich zu konventionellen Untersuchungen unter Verwendung von jeweils einem Großschnitt pro Tumor substantielle Vorteile auf (Camp et al., 2008). Insbesondere die ökonomischen Aspekte sind erheblich (Camp et al., 2008). Diese Studie an insgesamt 599 Tumoren erforderte lediglich die Herstellung von jeweils einem Schnitt aus den 2 TMA-Blöcken pro Untersuchung und eine minimale Menge an Reagenzien. Auch der Geschwindigkeitsgewinn ist enorm. Alle Färbungen dieser Studie konnten an einem Tag durchgeführt werden und die manuellen Auswertungen durch einen Pathologen (4 x 599 Tumoren) dauerten weniger als 2 Stunden. Die TMA-Methode erlaubt auch eine Standardisierung immunhistochemischer Untersuchung (Camp et al., 2008). Alle Färbungen werden unter absolut identischen Bedingungen durchgeführt. Dies betrifft nicht nur die Parameter, die in einem Färbeautomat standardisiert werden können, wie die Temperaturen, die Inkubationsdauer und die Art der Reagenzien, sondern auch sogenannte weiche Parameter, wie die Schnittdicke und das Schnittalter, die ebenfalls einen Einfluss auf die Färbeintensität ausüben (Camp et al., 2008, Libard et al., 2019). Dies gilt besonders für das Schnittalter sowie für die Zeitdauer zwischen Herstellung eines Schnittes und der Durchführung der immunhistochemischen Färbung (Mirlacher et al., 2004). Studien haben gezeigt, dass bereits eine Lagerung eines Schnittes von ca. 2 Wochen bei vielen Antikörpern zu einer substantiellen Reduktion der Färbeintensität führt (Mirlacher et al., 2004). Bei TMA-Studien ist es einfach, die Herstellung aller für eine Studie vorgesehenen TMA-Schnitte an einem Tag durchzuführen und die gesamten TMA-Schnitte an einem anderen Tag zu färben. Dies ermöglicht eine für alle Gewebeproben standardisierte Schnittlagerungszeit. Im Gegensatz dazu

wäre dies bei einer konventionellen Studie, die sich aufgrund der zeitintensiven Schnittherstellung und Färbung über mehrere Tage bis Wochen erstrecken würde, nicht ohne weiteres möglich (Camp et al., 2008). Ein weiterer Vorteil der TMA-Methode liegt in der standardisierten Gewebemenge, welche pro Patient:innen ausgewertet wird (Camp et al., 2008, Kononen et al., 1998). Die Auswertung der Färbeintensität wird dadurch erleichtert, dass alle möglichen Färbeintensitäten jeweils auf einem TMA-Schnitt vertreten sind, sodass die einzelne Präparate auch ohne weiteres miteinander verglichen werden können und eine präzisere vergleichende Beurteilung vorgenommen werden kann (Camp et al., 2008).

Der große Nachteil der TMA-Methode liegt darin, dass nicht alle Tumoren auswertbar sind. Es ist unvermeidbar, dass bei der Herstellung von TMAs einzelne Tumoren nicht getroffen werden oder das in einem Stroma-reichen Tumor keine epithelialen Tumoranteile erfasst werden (Camp et al., 2008). Darüber hinaus sind nicht alle in einem TMA-Block eingebrachten Stanzen gleich lang, denn die Länge der Stanzen ist von der Dicke des ursprünglichen „Spenderblockes“ abhängig (Camp et al., 2008, Behling and Schittenhelm, 2018). Die TMA-Blöcke enthalten Zylinder mit variabler Länge, die auch nicht alle immer gleich tief in dem „Empfängerblock“ eingebracht werden (Camp et al., 2008). Die ersten und vor allem letzten Schnitte, die von einem TMA-Block hergestellt werden, enthalten deswegen immer wieder leere Spots, d.h. leer bleibende TMA-Koordinaten (Behling and Schittenhelm, 2018). Ein Verlust von einzelnen Gewebeslots kann auch während der Färbeprozedur entstehen (Voduc et al., 2008). Konzeptuell ist auch die Tatsache, dass nur ein 0,6 mm messendes Gewebefragment pro Tumor zur Untersuchung gelang, ein Nachteil der TMA-Methode. Dies bedeutet naturgemäß eine eingeschränkte Repräsentativität der Untersuchung, sodass hochgradig heterogene Befunde bei einer TMA-Untersuchung gehäuft verpasst werden können (Behling and Schittenhelm, 2018, Camp et al., 2008). Zahlreiche Studien haben aber gezeigt, dass die Vorteile der TMA-Methode die Nachteile offenbar überwiegen (Behling and Schittenhelm, 2018, Camp et al., 2008, Jawhar, 2009). Alle etablierten molekularen Prognosefaktoren können auch an TMAs reproduziert werden (Behling and Schittenhelm, 2018, Camp et al., 2008). Beispielsweise haben die TMA-Studien beim Mammakarzinom eine hochgradige prognostische Bedeutung des HER2-Status, des Ki-67-Labeling-Indexes oder der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren ergeben (Al-Kuraya et al., 2004, Ruiz et al., 2006, Sauter et al., 2009) sowie beim Prostatakarzinom die starke prognostische Relevanz der PTEN-Deletion (Lotan et al., 2017, Kluth et al., 2015, Krohn et al., 2012).

In der vorliegenden Studie war es nicht das Hauptziel, die Beziehung eines molekularen Parameters zum klinischen Verlauf oder anderen klinisch pathologischen Parameter zu evaluieren. Vielmehr ging es darum in einer großen Anzahl von Tumoren eine kleine Untergruppe von Neoplasien zu identifizieren, die eine seltene molekulare Veränderung aufweisen. Die TMA-Methode ist hervorragend geeignet zur Identifizierung von „seltenen Ereignissen“, da mit verhältnismäßig geringem Aufwand eine sehr große Anzahl von Tumoren untersucht werden kann. Diese spezielle Eigenschaft von TMAs wurde von der UKE-Arbeitsgruppe schon mehrfach ausgenutzt. In einem Kollektiv von 15.531 Prostatakarzinomen konnten 42 (0,3 %) Fälle mit einer IDH1-Mutation identifiziert werden (Hinsch et al., 2018). Auch zum Thema MSI waren am UKE im Vorfeld mehrere Untersuchungen durchgeführt wurden, die ein analoges Design wie in dieser vorliegenden Studie aufweisen. So konnten in einem Kollektiv von 200 Prostatakarzinomen 7 (3,5 %) (Fraune et al., 2020b), bei 488 Harnblasenkarzinomen 5 (1,1 %) (Fraune et al., 2020c), bei 478 Ovarialkarzinomen 9 (1,8 %) (Fraune et al., 2020a) und bei 239 neuroendokrinen Neoplasien 3 (1,3 %) (Fraune et al., 2020d) mikrosatelliteninstabile Tumoren gefunden werden. Die in allen früheren Studien und auch in der jetzigen Kohorte hohe Rate von den am TMA identifizierten mikrosatelliteninstabilen Tumoren zeigt, dass die TMAs für die Suche nach MSI geeignet sind. Somit wäre es theoretisch denkbar, die TMAs auch diagnostisch einzusetzen. Zu diesem Zweck könnten von allen neu diagnostizierten Tumoren jeweils eine oder mehrere Gewebestanzten in einen TMA-Block eingebracht werden und nach Fertigstellung eines TMA-Blockes könnte ein Kollektiv von neu diagnostizierten Tumoren auf eine MSI und andere seltene therapierelevante molekulare Veränderungen untersucht werden. In einer Pilotstudie (Burandt et al., 2014) war dieses Konzept am UKE vor Jahren ausgetestet wurden und es konnten dabei mehrere unerwartet HER2-positive Tumoren identifiziert werden.

Während diese vorliegende Studie die bisher angenommene Prävalenz der MSI von ca. 1 % beim Pankreaskarzinom bestätigt, ergeben sich auch zwei relevante neue Aspekte. Beide deuten darauf hin, dass der Nachweis einer MSI beim Pankreaskarzinom eine klinische Relevanz haben könnte. Der erste neue Aspekt handelt um eine Homogenität der MMR-Defekten/MSI im Tumorgewebe des Pankreas. Einerseits könnte dies darauf hinweisen, dass die MSI sich beim Pankreaskarzinom zwar selten entwickelt, aber wenn sie vorkommt, meist früh in der Karzinogenese entsteht. Andererseits würde das Fehlen einer Heterogenität von MSI beim Pankreaskarzinom dafür sprechen, dass die therapeutische Relevanz der MSI für einen gesamten Tumor gilt. Das heißt, dass eine spezifische Therapie für ein mikrosatellitenstabiles Tumorgewebe wohl die gesamte Tumormasse treffen wird.

Der zweite neue Aspekt ist die signifikante Beziehung zwischen dem Vorliegen eines MMR-Proteinverlustes und einer im Tumor erhöhten Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten. Dieser Befund passt zu den Ergebnissen in anderen Tumorarten wie dem Magen-, Endometrium- oder Kolonkarzinome, wo eine große Lymphozytenmenge im Tumor als Hinweis auf eine mögliche MSI gilt (Chang et al., 2018, Yamashita et al., 2018). Die hohe Lymphozytenmenge im Tumor dürfte dadurch bedingt sein, dass die hohe Anzahl von Mutationen in einem MMR-defizienten Tumor zu einer vermehrten immunogenen Proteinveränderungen in den Tumorzellen führt und dementsprechend zu einer stärkeren immunologischen Reaktion (Le et al., 2015). Tatsächlich gilt eine hohe Lymphozytenmenge im Tumor bei vielen Tumorarten auch als ein günstiges Prognosezeichen, was ebenfalls durch die besonders starke immunologische Reaktion auf dem Tumor zu erklären ist (Liu et al., 2019). Die hohe Anzahl von Lymphozyten in den MMR-defizienten Pankreaskarzinomen könnte auch als Anhaltspunkt dafür gesehen werden, dass die Tumorzellen zumindest partiell vom Immunsystem als fremd erkannt werden, sodass es zu einer messbaren Reaktion des Immunsystems kommt. Dieser Befund könnte darauf hindeuten, dass eine Aktivierung des Immunsystems durch die Immuncheckpoint-Inhibitoren in diesen Tumoren einen klinischen Effekt ausüben könnte. Tatsächlich war in der Zulassungsstudie von Pembrolizumab bei einigen mikrosatelliteninstabilen Pankreaskarzinomen ein klinischer Effekt erzielt worden (Le et al., 2017).

In einer früheren Studie an Prostatakarzinomen hatte die UKE-Arbeitsgruppe die Expressionsstärke von MMR-Proteinen quantifiziert und gefunden, dass eine besonders starke Expression der MMR-Proteine mit einer ungünstigen Patientenprognose und einer vermehrten genetischen Instabilität der betroffenen Tumoren assoziiert war (Wilczak et al., 2017). Letzteres war auch wegen einer hochsignifikanten Beziehung zwischen der Expressionsstärke von MMR-Proteinen und dem Vorhandensein mehrerer chromosomalen Deletionen gefolgt worden (Wilczak et al., 2017). Eine Beziehung zwischen einer hohen MMR-Proteinexpression und einer erhöhten genetischen Instabilität wäre dadurch zu erklären, dass die Entstehung einer Vielzahl von genomischen Schäden eine vermehrte Expression von MMR-Proteinen bedingen könnte (Wilczak et al., 2017). Um zu klären, ob die Expressionsstärke der MMR-Proteine auch beim Pankreaskarzinom eine klinische Relevanz aufweisen könnte, wurde die Expressionsstärke dieser Proteine mit dem Tumorphänotyp verglichen. Das völlige Fehlen einer Korrelation zwischen MMR-Proteinexpressionsstärke und dem Tumorphänotyp spricht aber gegen eine relevante praktische Bedeutung der Intensität der immunhistochemischen Färbungen beim Pankreaskarzinom.

Zusammengefasst bestätigen die Daten dieser Untersuchung eine geringe Häufigkeit von MSI beim Pankreaskarzinom, welche bei ca. 1-2 % liegt (Luchini et al., 2021). Die signifikante Vermehrung von Lymphozyten in MMR-defizienten Tumoren spricht dafür, dass die MMR-Defekte tatsächlich einen messbaren Einfluss auf die Reaktion des Immunsystems auf die betroffenen Tumoren ausübt. Zusammen mit den viel versprechenden Daten aus der Zulassungsstudie für Pembrolizumab an mikrosatelliteninstabile Tumoren spricht dies für eine mögliche Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren beim mikrosatelliteninstabilen Pankreaskarzinom (Le et al., 2017, Marcus et al., 2019). Angesicht der meist dramatischen klinischen Verläufe dieses hoch gefährlichen Karzinoms erscheint eine routinemäßige immunhistochemische Untersuchung auf MMR-Gendefekte beim Pankreaskarzinom indiziert, wie von der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) schon empfohlen wurde (Sohal et al., 2020).

5. Zusammenfassung

Praktisch alle Patient:innen mit Pankreaskarzinom benötigen im Laufe ihrer Erkrankung eine systemische Therapie. Eine neue vielversprechende Option ist dabei eine Therapie mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab, die für Pankreaskarzinome mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zugelassen ist. Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Klärung der Häufigkeit der MSI beim Pankreaskarzinom und die Beantwortung der Frage, ob die MSI in betroffenen Tumoren homogen oder heterogen vorkommt. Darüber hinaus sollte die Beziehung zwischen MSI und der Dichte tumorinfiltrierender CD8⁺-Lymphozyten bestimmt werden. Für die Untersuchung wurde ein *Tissue Microarray* (TMA) verwendet, der aus 528 Adenokarzinomen des Pankreas, 60 Adenokarzinomen der Papilla Vateri, 7 Azinuszellkarzinomen des Pankreas und 4 anderen seltenen Pankreasmalignomen besteht. Die TMA-Schnitte wurden immunhistochemisch auf die Expression der *Mismatch* Reparatur (MMR)-Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 sowie CD8 zum Nachweis zytotoxischer Lymphozyten untersucht. Während die Expression der MMR-Proteine manuell durch einen Pathologen ausgewertet wurden, wurden die Dichte der CD8⁺-Lymphozyten mit einer digitalen Analyseprogramm (HALO™) automatisch vorgenommen. Die Untersuchung führte zur Identifizierung von insgesamt 6 Adenokarzinomen des Pankreas, die am TMA Anzeichen für das Vorliegen einer MSI aufwiesen. Die nachfolgende Validierung an Großschnitten bestätigte das Vorliegen eines MMR-Defektes immunhistochemisch in 4 der 6 Fälle. 3 dieser Fälle zeigten auch in der PCR-Untersuchung eine MSI (*MSI-high*). 1 der 4 immunhistochemisch MMR-defizienten Tumoren war auf der DNA-Ebene mikrosatellitenstabil. Alle 4 Fälle mit MMR-Defekten zeigten den Defekt in der gesamten Tumormasse (insgesamt 19 Blöcke wurden untersucht), sodass die Defekte sich in allen Tumoren als komplett homogen erwiesen. Der MMR-Defekt war signifikant mit einer hohen Lymphozytenmenge assoziiert. Die durchschnittliche Anzahl von CD8⁺-Lymphozyten in den 4 mikrosatelliteninstabilen Tumoren beträgt $685,178 \pm 139,23$ Zellen/mm² und bei mikrosatellitenstabilen Tumoren $217,918 \pm 13,01$ Zellen/mm² ($P = 0,0009$). Die Dichte der CD8⁺-Lymphozyten und die Intensität der MMR-Proteinexpression waren unabhängig voneinander und korrelierten auch nicht mit dem Tumorphänotyp (TNM-Stadien, Differenzierungsgrad und Resektionsstatus). Aus den Daten wird gefolgert, dass die MSI bei Adenokarzinome des Pankreas in 0,76 % der Fälle (4/528) vorkommt. Die signifikante Beziehung zu einer erhöhten Lymphozytenzahl spricht für einen funktionellen relevanten Effekt der MSI auf das Immunsystem beim Pankreaskarzinom. Dies passt zur Annahme, dass mikrosatelliteninstabile Pankreaskarzinome von einer Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren profitieren könnten.

6. Summary

Practically all patients with pancreatic cancer require systemic therapy during the course of their disease. A new promising option is a therapy with an immune checkpoint inhibitor pembrolizumab, which is approved for pancreatic cancers with microsatellite instability (MSI). The aim of this study was to clarify the frequency of MSI in pancreatic cancer and to answer the question of whether MSI occurs homogeneously or heterogeneously in the affected tumors. In addition, the relationship between MSI and the density of tumor-infiltrating CD8⁺-lymphocytes should be determined. A tissue microarray (TMA) consisting of 528 pancreatic adenocarcinomas, 60 adenocarcinomas of the papilla of Vater, 7 acinar cell carcinomas of the pancreas and 4 other rare pancreatic carcinomas was used for this study. The TMA sections were examined immunohistochemically for the expression of the mismatch repair (MMR)-proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 as well as CD8 to detect cytotoxic lymphocytes. While the expression of the MMR proteins was evaluated manually by a pathologist, the density of the CD8⁺-lymphocytes was determined automatically using a digital analysis program (HALO™). The investigation led to the identification of a total of 6 adenocarcinomas of the pancreas, which showed signs of the presence of MSI on the TMA. Subsequent validation on large sections confirmed the presence of an MMR defect immunohistochemically in 4 of the 6 cases. 3 of these cases also showed an MSI (MSI-high) in the PCR examination. 1 of the 4 immunohistochemically MMR-deficient tumors was microsatellite stable at the DNA level. All 4 cases with MMR defects showed the defect in the entire tumor mass (a total of 19 blocks were examined), so the defects were found to be completely homogeneous in all tumors. The MMR defect was significantly associated with a high lymphocyte count. The mean number of CD8⁺-lymphocytes in the 4 tumors with MSI is 685.178 ± 139.23 cells/mm² and in microsatellite stable tumors 217.918 ± 13.01 cells/mm² ($P = 0.0009$). The density of CD8⁺-lymphocytes and the intensity of MMR-protein expression were independent of each other and also did not correlate with the tumor phenotype (TNM stages, grade of differentiation and resection status). From the data it is concluded that MSI occurs in 0.76 % of pancreatic adenocarcinomas (4/528). The significant relationship to an increased number of lymphocytes speaks for a functionally relevant effect of MSI on the immune system in pancreatic cancers. This fits with the assumption that pancreatic cancers with MSI could benefit from therapy with immune checkpoint inhibitors.

7. Literaturverzeichnis

- ADEL, N. 2019. Current treatment landscape and emerging therapies for pancreatic cancer. *Am J Manag Care*, 25, S3-S10.
- AL-KURAYA, K., SCHRAML, P., TORHORST, J., TAPIA, C., ZAHARIEVA, B., NOVOTNY, H., SPICHTIN, H., MAURER, R., MIRLACHER, M., KOCHLI, O., ZUBER, M., DIETERICH, H., MROSS, F., WILBER, K., SIMON, R. & SAUTER, G. 2004. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8534-40.
- ANAND, D., LALL, C., BHOSALE, P., GANESHAN, D. & QAYYUM, A. 2016. Current update on primary pancreatic lymphoma. *Abdom Radiol (NY)*, 41, 347-55.
- AWMF. 2021. *S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom - Langversion 2.0* [Online]. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH), AWMF Registernummer: 032-010OL. Available: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-010OL.html> [Accessed 04.03.2022].
- BACHER, J. W., FLANAGAN, L. A., SMALLEY, R. L., NASSIF, N. A., BURGART, L. J., HALBERG, R. B., MEGID, W. M. & THIBODEAU, S. N. 2004. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers*, 20, 237-50.
- BAUDRIN, L. G., DELEUZE, J. F. & HOW-KIT, A. 2018. Molecular and Computational Methods for the Detection of Microsatellite Instability in Cancer. *Front Oncol*, 8, 621.
- BEHLING, F. & SCHITTENHELM, J. 2018. Tissue microarrays - translational biomarker research in the fast lane. *Expert Rev Mol Diagn*, 18, 833-835.
- BOLAND, C. R., THIBODEAU, S. N., HAMILTON, S. R., SIDRANSKY, D., ESHLEMAN, J. R., BURT, R. W., MELTZER, S. J., RODRIGUEZ-BIGAS, M. A., FODDE, R., RANZANI, G. N. & SRIVASTAVA, S. 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58, 5248-57.
- BONNEVILLE, R., KROOK, M. A., KAUTTO, E. A., MIYA, J., WING, M. R., CHEN, H. Z., REESER, J. W., YU, L. & ROYCHOWDHURY, S. 2017. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. *JCO Precis Oncol*, 2017.
- BURANDT, E., SCHREIBER, M., STEIN, A., MINNER, S., CLAUDITZ, T. S., BOKEMEYER, C., JANICKE, F., FISCH, M., IZBICKI, J. R., KNECHT, R., SAUTER, G. & STAHL, P. R. 2014. Continuous tissue microarray based identification of cancers with homogeneous target expression for successful targeted therapy in clinical routine practice. *Genes Chromosomes Cancer*, 53, 228-39.
- CAMP, R. L., NEUMEISTER, V. & RIMM, D. L. 2008. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol*, 26, 5630-7.

- CANNISTRÀ, M., RUGGIERO, M., ZULLO, A., SERAFINI, S., GRANDE, R. & NARDO, B. 2015. Metastases of pancreatic adenocarcinoma: A systematic review of literature and a new functional concept. *Int J Surg*, 21 Suppl 1, S15-21.
- CAPASSO, M., FRANCESCHI, M., RODRIGUEZ-CASTRO, K. I., CRAFA, P., CAMBIE, G., MIRAGLIA, C., BARCHI, A., NOUVENNE, A., LEANDRO, G., MESCHI, T., DE' ANGELIS, G. L. & DI MARIO, F. 2018. Epidemiology and risk factors of pancreatic cancer. *Acta Biomed*, 89, 141-146.
- CHANG, L., CHANG, M., CHANG, H. M. & CHANG, F. 2018. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 26, e15-e21.
- CHU, L. C., GOGGINS, M. G. & FISHMAN, E. K. 2017. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *Cancer J*, 23, 333-342.
- CIAMBELLA, C. C., BEARD, R. E. & MINER, T. J. 2018. Current role of palliative interventions in advanced pancreatic cancer. *World J Gastrointest Surg*, 10, 75-83.
- CONG, L., LIU, Q., ZHANG, R., CUI, M., ZHANG, X., GAO, X., GUO, J., DAI, M., ZHANG, T., LIAO, Q. & ZHAO, Y. 2018. Tumor size classification of the 8(th) edition of TNM staging system is superior to that of the 7(th) edition in predicting the survival outcome of pancreatic cancer patients after radical resection and adjuvant chemotherapy. *Sci Rep*, 8, 10383.
- CONNOR, A. A., DENROCHE, R. E., JANG, G. H., TIMMS, L., KALIMUTHU, S. N., SELANDER, I., MCPHERSON, T., WILSON, G. W., CHAN-SENG-YUE, M. A., BOROZAN, I., FERRETTI, V., GRANT, R. C., LUNGU, I. M., COSTELLO, E., GREENHALF, W., PALMER, D., GHANEH, P., NEOPTOLEMOS, J. P., BUCHLER, M., PETERSEN, G., THAYER, S., HOLLINGSWORTH, M. A., SHERKER, A., DUROCHER, D., DHANI, N., HEDLEY, D., SERRA, S., POLLETT, A., ROEHL, M. H. A., BAVI, P., BARTLETT, J. M. S., CLEARY, S., WILSON, J. M., ALEXANDROV, L. B., MOORE, M., WOUTERS, B. G., MCPHERSON, J. D., NOTTA, F., STEIN, L. D. & GALLINGER, S. 2017. Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol*, 3, 774-783.
- CONROY, T., DESSEIGNE, F., YCHOU, M., BOUCHE, O., GUIMBAUD, R., BECOUARN, Y., ADENIS, A., RAOUL, J. L., GOURGOU-BOURGADE, S., DE LA FOUCHARDIERE, C., BENNOUNA, J., BACHET, J. B., KHEMISSA-AKOUZ, F., PERE-VERGE, D., DELBALDO, C., ASSENAT, E., CHAUFFERT, B., MICHEL, P., MONTOTO-GRILLOT, C., DUCREUX, M., GROUPE TUMEURS DIGESTIVES OF, U. & INTERGROUP, P. 2011. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 364, 1817-25.
- CORRIE, P. G. 2011. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, 39, 717-722.
- CORTES-CIRIANO, I., LEE, S., PARK, W. Y., KIM, T. M. & PARK, P. J. 2017. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun*, 8, 15180.

- DARVIN, P., TOOR, S. M., SASIDHARAN NAIR, V. & ELKORD, E. 2018. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*, 50, 165.
- DE LA CHAPELLE, A. & HAMPEL, H. 2010. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 28, 3380-7.
- DE LA CRUZ, M. S., YOUNG, A. P. & RUFFIN, M. T. 2014. Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am Fam Physician*, 89, 626-32.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K., PENZKOFER, A., TREML, K., VOLLMER, G., WEG-REMERS, S., BARNES, B., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., GURUNG-SCHÖNFELD, I., HABERLAND, J., IMHOFF, M., KRAYWINKEL, K., STARKER, A., VON BERENBERG-GOSSLER, P. & WIENECKE, A. 2021. *Krebs in Deutschland für 2017/2018* [Online]. Robert Koch-Institut. Available: <https://edoc.rki.de/handle/176904/9042> [Accessed 18.02.2022].
- FITZGERALD, T. L., HICKNER, Z. J., SCHMITZ, M. & KORT, E. J. 2008. Changing incidence of pancreatic neoplasms: a 16-year review of statewide tumor registry. *Pancreas*, 37, 134-8.
- FRAUNE, C., ROSEBROCK, J., SIMON, R., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., KLUTH, M., BUSCHECK, F., HOFLMAYER, D., SCHMALFELDT, B., MULLER, V., WOLBER, L., WITZEL, I., PALUCHOWSKI, P., WILKE, C., HEILENKOTTER, U., VON LEFFERN, I., CLAUDITZ, T. S., WILCZAK, W., SAUTER, G., STEURER, S. & BURANDT, E. 2020a. High homogeneity of MMR deficiency in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 156, 669-675.
- FRAUNE, C., SIMON, R., HOFLMAYER, D., MOLLER, K., DUM, D., BUSCHECK, F., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., KLUTH, M., HINSCH, A., BURANDT, E., CLAUDITZ, T. S., WILCZAK, W., SAUTER, G. & STEURER, S. 2020b. High homogeneity of mismatch repair deficiency in advanced prostate cancer. *Virchows Arch*, 476, 745-752.
- FRAUNE, C., SIMON, R., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., KAHLER, C., KLUTH, M., HOFLMAYER, D., BUSCHECK, F., DUM, D., LUEBKE, A. M., BURANDT, E., CLAUDITZ, T. S., WILCZAK, W., SAUTER, G. & STEURER, S. 2020c. MMR deficiency in urothelial carcinoma of the bladder presents with temporal and spatial homogeneity throughout the tumor mass. *Urol Oncol*, 38, 488-495.
- FRAUNE, C., SIMON, R., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., KLUTH, M., BUSCHECK, F., AMIN, T., VIOL, F., FEHRLE, W., DUM, D., HOFLMAYER, D., BURANDT, E., CLAUDITZ, T. S., PEREZ, D., IZBICKI, J., WILCZAK, W., SAUTER, G., STEURER, S. & SCHRADER, J. 2020d. Homogeneous MMR Deficiency Throughout the Entire Tumor Mass Occurs in a Subset of Colorectal Neuroendocrine Carcinomas. *Endocr Pathol*, 31, 182-189.

- FREISSMUTH, M. 2016. *Pharmakologie und Toxikologie : Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- GONG, J., TULI, R., SHINDE, A. & HENDIFAR, A. E. 2016. Meta-analyses of treatment standards for pancreatic cancer. *Mol Clin Oncol*, 4, 315-325.
- GRANIER, C., DE GUILLEBON, E., BLANC, C., ROUSSEL, H., BADOUAL, C., COLIN, E., SALDMANN, A., GEY, A., OUDARD, S. & TARTOUR, E. 2017. Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer. *ESMO Open*, 2, e000213.
- GRANT, R. C., DENROCHE, R., JANG, G. H., NOWAK, K. M., ZHANG, A., BORGIDA, A., HOLTER, S., TOPHAM, J. T., WILSON, J., DODD, A., JANG, R., PRINCE, R., KARASINSKA, J. M., SCHAEFFER, D. F., WANG, Y., ZOGOPOULOS, G., BERRY, S., SIMEONE, D., RENOUF, D. J., NOTTA, F., O'KANE, G., KNOX, J., FISCHER, S. & GALLINGER, S. 2021. Clinical and genomic characterisation of mismatch repair deficient pancreatic adenocarcinoma. *Gut*, 70, 1894-1903.
- HAUSE, R. J., PRITCHARD, C. C., SHENDURE, J. & SALIPANTE, S. J. 2016. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med*, 22, 1342-1350.
- HAVEL, J. J., CHOWELL, D. & CHAN, T. A. 2019. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 19, 133-150.
- HENRIKSEN, A., DYHL-POLK, A., CHEN, I. & NIELSEN, D. 2019. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev*, 78, 17-30.
- HIDALGO, M. 2010. Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 362, 1605-17.
- HINSCH, A., BROLUND, M., HUBE-MAGG, C., KLUTH, M., SIMON, R., MOLLER-KOOP, C., SAUTER, G., STEURER, S., LUEBKE, A., ANGERER, A., WITTMER, C., NEUBAUER, E., GOBEL, C., BUSCHECK, F., MINNER, S., WILCZAK, W., SCHLOMM, T., JACOBSEN, F., CLAUDITZ, T. S., KRECH, T., TSOURLAKIS, M. C. & SCHROEDER, C. 2018. Immunohistochemically detected IDH1(R132H) mutation is rare and mostly heterogeneous in prostate cancer. *World J Urol*, 36, 877-882.
- HISHINUMA, S., OGATA, Y., TOMIKAWA, M., OZAWA, I., HIRABAYASHI, K. & IGARASHI, S. 2006. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg*, 10, 511-8.
- HU, Z. I., SHIA, J., STADLER, Z. K., VARGHESE, A. M., CAPANU, M., SALO-MULLEN, E., LOWERY, M. A., DIAZ, L. A., JR., MANDELKER, D., YU, K. H., ZERVOUDAKIS, A., KELSEN, D. P., IACOBUZIO-DONAHUE, C. A., KLIMSTRA, D. S., SALTZ, L. B., SAHIN, I. H. & O'REILLY, E. M. 2018. Evaluating Mismatch Repair Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. *Clin Cancer Res*, 24, 1326-1336.
- IGLESIAS-GARCIA, J., LARINO-NOIA, J. & DOMINGUEZ-MUNOZ, J. E. 2014. When to puncture, when not to puncture: Pancreatic masses. *Endosc Ultrasound*, 3, 91-7.

- INOUE, K., OHUCHIDA, J., OHTSUKA, T., NABAE, T., YOKOHATA, K., OGAWA, Y., YAMAGUCHI, K. & TANAKA, M. 2003. Severe localized stenosis and marked dilatation of the main pancreatic duct are indicators of pancreatic cancer instead of chronic pancreatitis on endoscopic retrograde balloon pancreatography. *Gastrointest Endosc*, 58, 510-5.
- JAWHAR, N. M. 2009. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*, 29, 123-7.
- KABACAOGLU, D., CIECIELSKI, K. J., RUESS, D. A. & ALGUL, H. 2018. Immune Checkpoint Inhibition for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Limitations and Future Options. *Front Immunol*, 9, 1878.
- KAMISAWA, T., WOOD, L. D., ITOI, T. & TAKAORI, K. 2016. Pancreatic cancer. *Lancet*, 388, 73-85.
- KANG, J., HWANG, I., YOO, C., KIM, K. P., JEONG, J. H., CHANG, H. M., LEE, S. S., PARK, D. H., SONG, T. J., SEO, D. W., LEE, S. K., KIM, M. H., HONG, S. M., SHIN, S. H., HWANG, D. W., SONG, K. B., LEE, J. H., KIM, S. C. & RYOO, B. Y. 2018. Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX as the first-line chemotherapy for patients with metastatic pancreatic cancer: retrospective analysis. *Invest New Drugs*, 36, 732-741.
- KIM, H. D. & PARK, S. H. 2019. Immunological and clinical implications of immune checkpoint blockade in human cancer. *Arch Pharm Res*, 42, 567-581.
- KLUTH, M., RUNTE, F., BAROW, P., OMARI, J., ABDELAZIZ, Z. M., PAUSTIAN, L., STEURER, S., CHRISTINA TSOURLAKIS, M., FISCH, M., GRAEFEN, M., TENNSTEDT, P., HULAND, H., MICHL, U., MINNER, S., SAUTER, G., SIMON, R., ADAM, M. & SCHLOMM, T. 2015. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer*, 137, 2354-63.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KREAMER, K. M. 2014. Immune Checkpoint Blockade: A New Paradigm in Treating Advanced Cancer. *J Adv Pract Oncol*, 5, 418-31.
- KROHN, A., DIEDLER, T., BURKHARDT, L., MAYER, P. S., DE SILVA, C., MEYER-KORNBLUM, M., KOTSCHAU, D., TENNSTEDT, P., HUANG, J., GERHAUSER, C., MADER, M., KURTZ, S., SIRMA, H., SAAD, F., STEUBER, T., GRAEFEN, M., PLASS, C., SAUTER, G., SIMON, R., MINNER, S. & SCHLOMM, T. 2012. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol*, 181, 401-12.
- LAGHI, L., BEGHELLI, S., SPINELLI, A., BIANCHI, P., BASSO, G., DI CARO, G., BRECHT, A., CELESTI, G., TURRI, G., BERSANI, S., SCHUMACHER, G., ROCKEN, C.,

- GRANTZDORFFER, I., RONCALLI, M., ZERBI, A., NEUHAUS, P., BASSI, C., MONTORSI, M., SCARPA, A. & MALESCI, A. 2012. Irrelevance of microsatellite instability in the epidemiology of sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*, 7, e46002.
- LAHUE, R. S., AU, K. G. & MODRICH, P. 1989. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 245, 160-4.
- LE, D. T., DURHAM, J. N., SMITH, K. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., AULAKH, L. K., LU, S., KEMBERLING, H., WILT, C., LUBER, B. S., WONG, F., AZAD, N. S., RUCKI, A. A., LAHERU, D., DONEHOWER, R., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., GRETEN, T. F., DUFFY, A. G., CIOMBOR, K. K., EYRING, A. D., LAM, B. H., JOE, A., KANG, S. P., HOLDHOFF, M., DANILOVA, L., COPE, L., MEYER, C., ZHOU, S., GOLDBERG, R. M., ARMSTRONG, D. K., BEVER, K. M., FADER, A. N., TAUBE, J., HOUSSEAU, F., SPETZLER, D., XIAO, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B., ANDERS, R. A. & DIAZ, L. A., JR. 2017. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357, 409-413.
- LE, D. T., URAM, J. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., KEMBERLING, H., EYRING, A. D., SKORA, A. D., LUBER, B. S., AZAD, N. S., LAHERU, D., BIEDRZYCKI, B., DONEHOWER, R. C., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., DUFFY, S. M., GOLDBERG, R. M., DE LA CHAPELLE, A., KOSHIJI, M., BHAIJEE, F., HUEBNER, T., HRUBAN, R. H., WOOD, L. D., CUKA, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ZHOU, S., CORNISH, T. C., TAUBE, J. M., ANDERS, R. A., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B. & DIAZ, L. A., JR. 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*, 372, 2509-20.
- LEE, H. T., LEE, S. H. & HEO, Y. S. 2019. Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology. *Molecules*, 24.
- LIBARD, S., CERJAN, D. & ALAFUZOFF, I. 2019. Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*, 151, 91-96.
- LIU, D., KEIJZERS, G. & RASMUSSEN, L. J. 2017. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res*, 773, 174-187.
- LIU, J. Y., YANG, G. F., CHEN, F. F. & PENG, C. W. 2019. Evaluating the prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumor: practice of a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Cancer Manag Res*, 11, 6815-6827.
- LOTAN, T. L., HEUMANN, A., RICO, S. D., HICKS, J., LECKSELL, K., KOOP, C., SAUTER, G., SCHLOMM, T. & SIMON, R. 2017. PTEN loss detection in prostate cancer: comparison of PTEN immunohistochemistry and PTEN FISH in a large retrospective prostatectomy cohort. *Oncotarget*, 8, 65566-65576.

- LU, F., PORUK, K. E. & WEISS, M. J. 2015. Surgery for oligometastasis of pancreatic cancer. *Chin J Cancer Res*, 27, 358-67.
- LUCHINI, C., BIBEAU, F., LIGTENBERG, M. J. L., SINGH, N., NOTTEGAR, A., BOSSE, T., MILLER, R., RIAZ, N., DOUILLARD, J. Y., ANDRE, F. & SCARPA, A. 2019. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol*.
- LUCHINI, C., BROSENS, L. A. A., WOOD, L. D., CHATTERJEE, D., SHIN, J. I., SCIAMMARELLA, C., FIADONE, G., MALLEO, G., SALVIA, R., KRYKLYVA, V., PIREDDA, M. L., CHENG, L., LAWLOR, R. T., ADSAY, V. & SCARPA, A. 2021. Comprehensive characterisation of pancreatic ductal adenocarcinoma with microsatellite instability: histology, molecular pathology and clinical implications. *Gut*, 70, 148-156.
- LUPINACCI, R. M., BACHET, J. B., ANDRE, T., DUVAL, A. & SVRCEK, M. 2019. Pancreatic ductal adenocarcinoma harboring microsatellite instability / DNA mismatch repair deficiency. Towards personalized medicine. *Surg Oncol*, 28, 121-127.
- LUPINACCI, R. M., GOLOUDINA, A., BUHARD, O., BACHET, J. B., MARECHAL, R., DEMETTER, P., CROS, J., BARDIER-DUPAS, A., COLLURA, A., CERVERA, P., SCRIVA, A., DUMONT, S., HAMMEL, P., SAUVANET, A., LOUVET, C., DELPERO, J. R., PAYE, F., VAILLANT, J. C., ANDRE, T., CLOSSET, J., EMILE, J. F., VAN LAETHEM, J. L., JONCHERE, V., ABD ALSAMAD, I., ANTOINE, M., RODENAS, A., FLEJOU, J. F., DUSETTI, N., IOVANNA, J., DUVAL, A. & SVRCEK, M. 2018. Prevalence of Microsatellite Instability in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Gastroenterology*, 154, 1061-1065.
- MARCUS, L., LEMERY, S. J., KEEGAN, P. & PAZDUR, R. 2019. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clin Cancer Res*.
- MARGINEAN, E. C. & MELOSKY, B. 2018. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? Part I-Colorectal Cancer: Microsatellite Instability, Testing, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*, 142, 17-25.
- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DURMULLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. 2004. Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-20.
- MURO, Y., SUGIURA, K., MIMORI, T. & AKIYAMA, M. 2015. DNA mismatch repair enzymes: genetic defects and autoimmunity. *Clin Chim Acta*, 442, 102-9.
- ODZE, R. D. & GOLDBLUM, J. R. 2009. *Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas*, Elsevier Health Sciences.

- OETTLER, H., NEUHAUS, P., HOCHHAUS, A., HARTMANN, J. T., GELLERT, K., RIDWELSKI, K., NIEDERGETHMANN, M., ZULKE, C., FAHLKE, J., ARNING, M. B., SINN, M., HINKE, A. & RIESS, H. 2013. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*, 310, 1473-81.
- PUSCEDDU, S., GHIDINI, M., TORCHIO, M., CORTI, F., TOMASELLO, G., NIGER, M., PRINZI, N., NICHETTI, F., COINU, A., DI BARTOLOMEO, M., CABIDDU, M., PASSALACQUA, R., DE BRAUD, F. & PETRELLI, F. 2019. Comparative Effectiveness of Gemcitabine plus Nab-Paclitaxel and FOLFIRINOX in the First-Line Setting of Metastatic Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*, 11.
- PUTRI, D. I. 2021. Bedeutung der MSI bei malignen Tumoren. *Studienarbeit*. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- RIAZY, M., KALLOGER, S. E., SHEFFIELD, B. S., PEIXOTO, R. D., LI-CHANG, H. H., SCUDAMORE, C. H., RENOUF, D. J. & SCHAEFFER, D. F. 2015. Mismatch repair status may predict response to adjuvant chemotherapy in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 28, 1383-9.
- RIGAU, V., SEBBAGH, N., OLSCHWANG, S., PARAF, F., MOURRA, N., PARC, Y. & FLEJOU, J. F. 2003. Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 [correction of hMLH6] immunostaining. *Arch Pathol Lab Med*, 127, 694-700.
- RUIZ, C., SEIBT, S., AL KURAYA, K., SIRAJ, A. K., MIRLACHER, M., SCHRAML, P., MAURER, R., SPICHTIN, H., TORHORST, J., POPOVSKA, S., SIMON, R. & SAUTER, G. 2006. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer*, 118, 2190-4.
- RYAN, D. P., HONG, T. S. & BARDEESY, N. 2014. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 371, 2140-1.
- SAUTER, G., LEE, J., BARTLETT, J. M., SLAMON, D. J. & PRESS, M. F. 2009. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol*, 27, 1323-33.
- SOHAL, D. P. S., KENNEDY, E. B., CINAR, P., CONROY, T., COPUR, M. S., CRANE, C. H., GARRIDO-LAGUNA, I., LAU, M. W., JOHNSON, T., KRISHNAMURTHI, S., MORAVEK, C., O'REILLY, E. M., PHILIP, P. A., PANT, S., SHAH, M. A., SAHAI, V., URONIS, H. E., ZAIDI, N. & LAHERU, D. 2020. Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*, JCO2001364.
- SOHAL, D. P. S., KENNEDY, E. B., KHORANA, A., COPUR, M. S., CRANE, C. H., GARRIDO-LAGUNA, I., KRISHNAMURTHI, S., MORAVEK, C., O'REILLY, E. M., PHILIP, P. A., RAMANATHAN, R. K., RUGGIERO, J. T., SHAH, M. A., URBA, S., URONIS, H. E., LAU,

- M. W. & LAHERU, D. 2018. Metastatic Pancreatic Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*, 36, 2545-2556.
- TOH, J., CHAPUIS, P. H., BOKEY, L., CHAN, C., SPRING, K. J. & DENT, O. F. 2017. Competing risks analysis of microsatellite instability as a prognostic factor in colorectal cancer. *Br J Surg*, 104, 1250-1259.
- UMAR, A., BOLAND, C. R., TERDIMAN, J. P., SYNGAL, S., DE LA CHAPELLE, A., RUSCHOFF, J., FISHEL, R., LINDOR, N. M., BURGART, L. J., HAMELIN, R., HAMILTON, S. R., HIATT, R. A., JASS, J., LINDBLOM, A., LYNCH, H. T., PELTOMAKI, P., RAMSEY, S. D., RODRIGUEZ-BIGAS, M. A., VASEN, H. F., HAWK, E. T., BARRETT, J. C., FREEDMAN, A. N. & SRIVASTAVA, S. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 96, 261-8.
- VASEN, H. F., WATSON, P., MECKLIN, J. P. & LYNCH, H. T. 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116, 1453-6.
- VIALE, G., TRAPANI, D. & CURIGLIANO, G. 2017. Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy. *Biomed Res Int*, 2017, 4719194.
- VINCENT, A., HERMAN, J., SCHULICK, R., HRUBAN, R. H. & GOGGINS, M. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet*, 378, 607-20.
- VODUC, D., KENNEY, C. & NIELSEN, T. O. 2008. Tissue microarrays in clinical oncology. *Semin Radiat Oncol*, 18, 89-97.
- VON HOFF, D. D., ERVIN, T., ARENA, F. P., CHIOREAN, E. G., INFANTE, J., MOORE, M., SEAY, T., TJULANDIN, S. A., MA, W. W., SALEH, M. N., HARRIS, M., RENI, M., DOWDEN, S., LAHERU, D., BAHARY, N., RAMANATHAN, R. K., TABERNERO, J., HIDALGO, M., GOLDSTEIN, D., VAN CUTSEM, E., WEI, X., IGLESIAS, J. & RENSCHLER, M. F. 2013. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*, 369, 1691-703.
- WAGNER, R., JR. & MESELSON, M. 1976. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 4135-9.
- WESTWOOD, A., GLOVER, A., HUTCHINS, G., YOUNG, C., BROCKMOELLER, S., ROBINSON, R., WORRILOW, L., WALLACE, D., RANKEILLOR, K., ADLARD, J., QUIRKE, P. & WEST, N. 2019. Additional loss of MSH2 and MSH6 expression in sporadic deficient mismatch repair colorectal cancer due to MLH1 promoter hypermethylation. *J Clin Pathol*, 72, 443-447.
- WILCZAK, W., RASHED, S., HUBE-MAGG, C., KLUTH, M., SIMON, R., BUSCHECK, F., CLAUDITZ, T. S., GRUPP, K., MINNER, S., TSOURLAKIS, M. C., MOLLER-KOOP, C., GRAEFEN, M., ADAM, M., HAESE, A., WITTMER, C., SAUTER, G., IZBICKI, J. R., HULAND, H., SCHLOMM, T., STEURER, S., KRECH, T. & LEBOK, P. 2017. Up-regulation

- of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. *Carcinogenesis*, 38, 19-27.
- WILDEN, S. M., LANG, B. M., MOHR, P. & GRABBE, S. 2016. Immune checkpoint inhibitors: a milestone in the treatment of melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*, 14, 685-95.
- WILDENBERG, J. & MESELSON, M. 1975. Mismatch repair in heteroduplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 2202-6.
- YAMASHITA, H., NAKAYAMA, K., ISHIKAWA, M., NAKAMURA, K., ISHIBASHI, T., SANUKI, K., ONO, R., SASAMORI, H., MINAMOTO, T., IIDA, K., SULTANA, R., ISHIKAWA, N. & KYO, S. 2018. Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. *Oncotarget*, 9, 5652-5664.
- ZHANG, L., SANAGAPALLI, S. & STOITA, A. 2018. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 24, 2047-2060.
- ZHANG, Y., YANG, J., LI, H., WU, Y., ZHANG, H. & CHEN, W. 2015. Tumor markers CA19-9, CA242 and CEA in the diagnosis of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 8, 11683-91.
- ZHAO, C., GAO, F., WENG, S. & LIU, Q. 2017. Pancreatic cancer and associated exosomes. *Cancer Biomark*, 20, 357-367.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit niemals zustande gekommen wären:

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter, für die Ermöglichung dieser Dissertation, die kompetente Einführung in das Gebiet der Pathologie und die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Bei Problemen stand er mir stets innerhalb kurzer Zeit hilfsbereit zur Seite. Dank seiner stets kompetenten Unterstützung fanden sich Antworten auf all meine Fragen und mir wurde ein zügiges Arbeiten und Vorankommen ermöglicht. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich stets positiv beeinflusst und ermutigt.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Ronald Simon, Frau Melanie Witt, Frau Karin Breitmeyer und Frau Dr. med. Anne Katrin Augustin bedanken. Sowohl ihre umfassende Betreuung als auch ihre Hilfsbereitschaft waren mir stets eine große Unterstützung.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter:innen des Instituts für Pathologie für die direkte und indirekte Unterstützung und die Zusammenarbeit, vor allem an das gesamte Team des TMA-Labors, Herrn PD. Dr. med. Christoph Fraune und Frau Dr. rer. nat. Claudia Hube-Magg.

Ferner danke ich Helena Pham für Ihre mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Meinen Eltern und meinen Brüdern möchte ich ganz besonders herzlich danken, die mich während des Verfassens dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums allzeit aufmerksam und liebevoll unterstützt haben. Meinem Ehemann danke ich von ganzem Herzen für seine uneingeschränkte Unterstützung, seine Liebe und die fortwährende Motivation. Darüber hinaus gilt mein Dank meinen besten Freundinnen sowie allen Verwandten, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt und immer wieder aufgeheitert haben. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich, der als wichtiger Teil zum Erfolg meines Studiums beigetragen hat.

9. Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten.

10.Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Die Daten meiner Dissertation sind auch in die Publikation von Fraune et. al. mit dem Titel "MMR Deficiency is Homogeneous in Pancreatic Carcinoma and Associated with High Density of Cd8-Positive Lymphocytes" (Annals of Surgical Oncology (2020) 27:3997–4006) eingegangen, wo allerdings irrtümlicherweise mein Name nicht in der Autorenliste stand. Eine Änderung der Autorenliste war nachträglich nicht möglich. Deswegen wurde eine Korrektur bzw. ein Erratum für die oben genannte Publikation hinzugefügt, in dem folgendes steht:

“Mrs. Devita Irene Putri contributed significantly to this study with results from her medical thesis.”

Dieses Erratum wurde am 21. April 2022 im Journal "Annals of Surgical Oncology" publiziert und ist in dieser Dissertation auf Seite 72 als Anhang zu finden.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:.....



CORRECTION

Correction to: MMR Deficiency is Homogeneous in Pancreatic Carcinoma and Associated with High Density of Cd8-Positive Lymphocytes

Christoph Fraune, MD¹, Eike Burandt, MD¹, Ronald Simon, PhD¹, Claudia Hube-Magg, PhD¹, Georgia Makrypidi-Fraune, PhD¹, Martina Kluth, PhD¹, Franziska Büscheck, MD¹, Doris Höflmayer, MD¹, Niclas Ch. Blessin¹, Tim Mandelkow¹, Wenchao Li¹, Daniel Perez, MD², Jakob R. Izbicki, MD², Waldemar Wilczak, MD¹, Guido Sauter, MD¹, Jörg Schrader, MD^{2,3}, Michael Neipp, MD⁴, Hamid Mofid, MD⁵, Thies Daniels, MD⁶, Christoph Isbert, MD⁷, Till S. Clauditz, MD¹, and Stefan Steurer, MD¹

¹Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ³I. Medical Department – Gastroenterology and Hepatology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁴General, Vascular and Visceral Surgery Clinic, Itzehoe Medical Center, Itzehoe, Germany; ⁵General, Visceral Thoracic and Vascular Surgery Clinic, Regio Clinic Pinneberg, Pinneberg, Germany; ⁶General, Visceral and Tumor Surgery Clinic, Albertinen Hospital, Hamburg, Germany; ⁷Department of General, Gastrointestinal and Colorectal Surgery, Amalie Sieveking Hospital, Hamburg, Germany

CORRECTION TO:

ANN SURG ONCOL (2020) 27:3997–4006
[HTTPS://DOI.ORG/10.1245/S10434-020-08209-Y](https://doi.org/10.1245/S10434-020-08209-Y)

The following acknowledgment was added to the original article:

Mrs. Devita Irene Putri contributed significantly to this study with results from her medical thesis.

OPEN ACCESS This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the

source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

The original article can be found online at <https://doi.org/10.1245/s10434-020-08209-y>.

© The Author(s) 2022

R. Simon, PhD
e-mail: R.Simon@uke.de

Published online: 21 April 2022