

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**BESTIMMUNG INFILTRIERENDER T-LYMPHOZYTEN
IM DUKTALEN PANKREASADENOKARZINOM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

DOMANTAS PETRICK
aus Klaipeda (Litauen)

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Wesch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Heiner Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2015

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 16.07.2015

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)	1
1.2	Die chronische Pankreatitis (CP)	1
1.3	Das Immunsystem.....	2
1.3.1	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ αβ-T-Zellen	3
1.3.2	γδ-T-Zellen.....	3
1.4	Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor-2 (HER-2/neu).....	5
1.5	Bispezifische Antikörper.....	5
2	Fragestellung.....	7
3	Material und Methoden.....	8
3.1	Ethikvotum.....	8
3.2	Patienten und Gewebe.....	8
3.3	Immunhistochemie.....	9
3.4	Immunhistochemischer Nachweis von γδ-T-Zellen	9
3.4.1	Verwendete Reagenzien und Geräte für die Immunhistochemie.....	10
3.4.2	Immunhistochemische Färbung der Gewebepräparate von PDAC- und CP-Patienten.....	11
3.4.3	Negative Kontrolle.....	12
3.4.4	Positive Kontrolle	12
3.5	Scoring-System	12
3.6	Statistische Analyse	13
4	Ergebnisse.....	14
4.1	Immunhistochemische Färbung von γδ-T-Zellen	14
4.2	Verteilung der T-Zellen in CP- und PDAC-Geweben	17
4.3	Lokalisation von CD3 ⁺ CD8 ⁺ γδ-T-Zellen im Stroma bzw. Gangepithel des Pankreasgewebes von CP- und PDAC-Patienten	21
4.4	Vergleich von T-Zellen im Stroma und Gangepithelien in CP- und PDAC-Präparaten.....	25
4.5	Korrelation von T-Zellen im Stroma von CP-Gewebe	26
4.6	Korrelation von T-Zellen im Stroma von PDAC-Gewebe	27

Inhaltsverzeichnis

4.7	Korrelation von T-Zellmarkern im PDAC-Gewebe unter Berücksichtigung des Tumor-Gradings	30
4.8	Korrelation von T-Zellen im PDAC-Gewebe mit dem Überleben	30
4.9	HER-2/neu Expression in CP- und PDAC-Gewebe	31
5	Diskussion.....	32
6	Zusammenfassung.....	41
7	Literaturverzeichnis	42
8	Publikationsliste.....	48
9	Danksagung.....	49
10	Lebenslauf.....	50
11	Erklärung.....	51

Abkürzungen

Abkürzungen

APZ	Antigen-präsentierende Zellen
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CP	Chronische Pankreatitis
HER-2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor-2/neu
HLA	Humanes Leukozytenantigen (engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HRP	Meerrettich – Peroxidase (engl. <i>Horseradish peroxidase</i>)
mAk	Monoklonaler Antikörper (engl. <i>monoclonal antibody</i>)
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom (engl. <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>)
SPSS	Statistik- und Analyse-Software
TZR	T-Zell-Rezeptor

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)

Das duktales Pankreasadenokarzinom (engl. *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) ist ein Karzinom der Bauchspeicheldrüse, an welchem im Jahr 2010 über 16.000 Menschen in Deutschland erkrankten (Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten). Das PDAC befindet sich an 4. Stelle von tödlichen Tumorerkrankungen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von $< 2\%$ (Siegel et al. 2012). Da der Tumor meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird, sind kurative Therapieoptionen auf weniger als 20% der Patienten beschränkt. Zudem zeigen die meisten PDAC-Patienten kein Ansprechen auf eine Strahlen- oder Chemotherapie, was die Prognose zusätzlich verschlechtert (Schneider et al. 2005). Somit kann eine wesentliche Verbesserung bei der Behandlung von PDAC-Patienten nur durch eine frühere Diagnose und durch bessere Therapieoptionen erzielt werden. Für beides ist die Identifizierung von verlässlichen Biomarkern von großer Bedeutung, welche die Unterscheidung zwischen PDAC von benignen Pankreaserkrankungen zulässt und zudem eine Verbesserung der Therapieoptionen ermöglicht. Die Mehrzahl der Pankreastumore entsteht aus dem Gangepithel und den Azinuszellen. Als Ursprung des PDAC wird daher das pankreatische Gangepithel mit intraepithelialen Neoplasien angesehen (Schneider et al. 2005). Das PDAC ist durch eine ausgeprägte desmoplastische Tumor-Mikroumgebung charakterisiert, welche mehr als 80% der kompletten Tumormasse ausmachen kann. Diese Tumor-Mikroumgebung gilt als vielversprechendes Ziel zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie von PDAC-Patienten. Das PDAC-Stroma setzt sich aus der extrazellulären Matrix, Fibroblasten, Myofibroblasten sowie diversen Immunzellen u.a. mit suppressiven Eigenschaften zusammen (Farrow und Evers 2002, Kleff et al. 2007).

1.2 Die chronische Pankreatitis (CP)

Die chronische Pankreatitis (CP) ist durch eine anhaltende Entzündung und durch irreversible morphologische Umbauvorgänge der Bauchspeicheldrüse gekennzeichnet. Dabei geht sie typischerweise mit Schmerzen und dauerhaftem Funktionsverlust einher (Lankisch 2001). Fokale Nekrosen und Fibrosen, intraduktale Steinbildung mit Gangerweiterung sowie in späteren Stadien ein Diabetes mellitus sind pathomorphologische Kennzeichen und

Komplikationen der CP (Etemad et al. 2001, Simon et al. 2001). Die Prävalenz der CP variiert aufgrund der Unterschiede in Studiendesign, Diagnosekriterien, Kultur und Geographie; in Europa und den Vereinigten Staaten liegt sie zwischen 0,2% und 0,6% und ist somit relativ selten (Lévy et al. 2006). Die jährliche Inzidenz wird auf etwa 7-10 pro 100.000 geschätzt (Andersen et al. 1982). Die ätiologische Risikofaktoren der CP sind Alkoholkonsum, Nikotinkonsum, erbliche Mutationen, duktale Obstruktion und Autoimmunfaktoren (Schneider et al. 2007).

Die CP wird als Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC betrachtet, da sie ebenfalls eine tiefgreifende Desmoplasie wie das PDAC zeigt (Farrow und Evers 2002, Kleeff et al. 2007). Trotz der starken Ähnlichkeit zwischen PDAC und CP entwickeln weniger als 5% der Patienten mit einer CP ein PDAC (Raimondi et al. 2010).

1.3 Das Immunsystem

Eine der Aufgaben des menschlichen Immunsystems ist es, den Körper vor transformierten Zellen zu schützen. Für die Erkennung von Tumorzellen sind sowohl Komponenten des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems notwendig (Okabe und Medzhitov 2014, Waldmann 2003).

Die adaptive Immunabwehr wird durch B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (T-Zellen) repräsentiert. Die T-Zellen exprimieren einen membrangebundenen T-Zell-Rezeptor (TZR), welcher der Erkennung von Antigenen dient, die von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert werden. Auf Grundlage ihrer Ko-Rezeptoren unterscheidet man $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen. $CD4$ wird von T-Helferzellen und $CD8$ von zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Zeitlmann et al. 2001, Gao und Jakobsen 2000, Gao et al. 2002).

Der TZR ist mit dem invarianten $CD3$ -Komplex verknüpft. Die Mehrzahl der T-Zellen tragen einen TZR, der sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt (Davis et al. 1998, Rudolph et al. 2006). 1-5% der T-Zellen des Blutes besitzen einen TZR, welcher aus einer γ - und einer δ -Kette besteht. $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Regel $CD4$ negativ, exprimieren aber ebenfalls den $CD3$ -Komplex und in etwa 30% auch $CD8$. Im Unterschied zu $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennt die Hauptpopulation humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen keine prozessierten Peptide, sondern niedermolekulare, phosphorylierte Metabolite des bakteriellen (nicht-Mevalonat) Stoffwechselweges der Isoprenoid Biosynthese (sogenannte Phosphoantigen, PAg) (Hayday 2000, Chien und Bonneville 2006). Aminobisphosphonate (n-BP) oder Alkylamine, die von

APZ aufgenommen werden, inhibieren die Farnesylpyrophosphat-Synthase in diesen und führen zur Akkumulation und Freisetzung von PAg, die $\gamma\delta$ -T-Zellen stimulieren (Hayday 2000, Hintz et al. 2001).

1.3.1 CD4⁺ und CD8⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen

CD4⁺ bzw. CD8⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennen prozessiertes Antigen in Form von kurzen Peptidfragmenten, die an HLA-Moleküle von APZ gebunden sind. CD4⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen erkennen meist Antigene aus endozytotischen Vesikeln in Verbindung mit HLA-Klasse II Molekülen, während CD8⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen zytosolische Antigene im Zusammenhang mit HLA-Klasse I Molekülen erkennen. Die Aktivierung des TZR/CD3 Komplexes auf T-Zellen nach Erkennung des Antigen/HLA-Komplexes auf APZ induziert u.a. die Expression von Rezeptoren (z.B. CD25, CD69), die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren, wie Granzyme und Perforin, und von Chemokinen und Zytokinen. CD4 und CD8 als Ko-Rezeptoren verstärken die Bindung HLA-Moleküle auf APZ und sind für die Antigen-spezifische Aktivierung wichtige Ko-Faktoren (Zamoyska 1998).

Abhängig von den erkannten Antigenen und dem umgebenden Zytokinmilieu differenzieren T-Zellen u.a. zu T-Helferzellen (T_{H1})/zytotoxischen T-Zellen (T_{C1}), T_{H2}/T_{C2}, oder regulatorischen T-Zellen (Treg) (Davis et al. 1998, Rudolph et al. 2006). Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) werden u.a. durch T_{H1}- und T_{C1}-Zellen produziert, ihre Funktion besteht in der Aktivierung von Makrophagen und Eliminierung intrazellulärer Krankheitserreger. T_{H2}- und T_{C2}-Zellen produzieren u.a. Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10). T_{H2}-Zellen spielen u.a. eine Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen und somit der Synthese von Immunglobulinen (humorale Abwehr) und Allergien (Romagnani 1992). T_{H17}-Zellen setzen IL-17, TNF- α und GM-CSF (von engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) frei und sind wichtig für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, während Treg die Aktivierung des Immunsystems supprimieren und dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren (Bettelli et al. 2006, Annunziato 2012). Virusinfizierte und entartete Zellen werden von CD8⁺ T-Zellen erkannt und eliminiert.

1.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen repräsentieren eine kleine Subpopulation der T-Lymphozyten, die u.a. eine Rolle in der Tumorabwehr spielen. Neben ihrer Fähigkeit Antigene zu präsentieren, stellen $\gamma\delta$ -T-

Zellen eine vielversprechende Zellpopulation für die Krebstherapie dar, da sie Tumorzellen in HLA-unabhängiger Weise abtöten können (Himoudi et al. 2012, Braza und Klein 2013). Wie andere T-Zellen umfassen $\gamma\delta$ -T-Zellen heterogene Subpopulationen, die sich auf der Grundlage von Oberflächenmarkern und Effektorfunktionen unterscheiden. 95% der im peripheren Blut vorkommenden $\gamma\delta$ -T-Zellen gesunder Erwachsener exprimieren als Variable TZR Element V γ 9 in Assoziation mit V δ 2, sogenannte V γ 9V δ 2-T-Zellen. Daneben existieren V δ 1-T-Zellen, welche weitgehend mit V γ 2, 3, 4, 5 oder 8 assoziiert sind und insbesondere in der Lunge, in der Haut und im Darm vorkommen (Kabelitz et al. 2005, Chiplunkar et al. 2009). Die Expression von V δ 3, 4, 5 und 6 ist beschrieben, jedoch ist die Funktion und Lokalisation dieser Subpopulationen im Menschen weitgehend unbekannt (Chien und Bonneville 2006).

Während PAg des prokaryontischen Nicht-Mevalonat Weges der Isoprenoid Biosynthese V γ 9V δ 2-T-Zellen aktivieren (Eberl et al. 2003), reicht die physiologische Konzentration der PAg des Mevalonat Stoffwechselweges in Eukaryonten nicht aus, um V γ 9V δ 2-T-Zellen zu stimulieren. Sowohl eine Dysregulation des Mevalonat Stoffwechsels in Tumorzellen als auch der Einsatz von Aminobisphosphonaten oder Alkylaminen führt zu einer Akkumulation von endogenem PAg (Gober et al. 2003, Roelofs et al. 2006). Endogen akkumuliertes PAg interagiert mit dem kostimulatorischen Molekül der B7 Familie CD277 (Butyrophilin-3), welches zur Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen führt (Harly et al. 2012, Kabelitz 2012). Neben ihrer Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen können aktivierte V γ 9V δ 2-T-Zellen mittels zytolytische Proteine wie Perforin, Granulysin die Lebensfähigkeit von z.B. extrazellulärem und intrazellulärem Tuberkulose Erregern reduzieren (Dieli et al. 2001).

Vorbefunde der Arbeitsgruppe Wesch/Kabelitz zeigten eine Zytotoxizität humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen gegen PDAC Zellen nach Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen mit PAg oder n-BP *in vitro*, welche durch den Einsatz von Toll-like-Rezeptor (TLR) Agonisten verstärkt werden konnte (Wrobel et al. 2007, Shojaei et al. 2009). TLR Agonisten werden bereits als Adjuvanzen für Impfstoffe oder in der Tumorthherapie eingesetzt (Connolly und O'Neill 2012). Eine Tumorreduktion und eine überlebenssteigernde Wirkung konnte auch *in vivo* nach wiederholtem adoptiven Transfer von aktivierten humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen plus n-BP/Interleukin-2 in SCID-Mäusen, welchen humane Pankreastumore appliziert wurden, beobachtet werden (Kabelitz et al. 2004). Mehrere Studien berichten auch über eine Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-

Lymphozyten mit dem n-BP Zoledronat und Interleukin-2 *in vivo* und einer partiellen Reduktion des Tumorwachstums z.B. bei Patienten mit Prostatakrebs (Dieli et al. 2007) oder Brustkrebs (Meraviglia et al. 2010b). Es zeigte sich jedoch, dass die repetitive Stimulation humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen mit n-BP *in vivo* zu deren Depletion führte (Braza und Klein 2013). Dies führte in der Arbeitsgruppe Wesch/Kabelitz zu der Idee, die zytotoxische Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen gegenüber PDAC Zellen durch den Einsatz bispezifischer Antikörper zu verstärken, was in Kapitel 1.5 näher beschrieben ist.

1.4 Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor-2 (HER-2/neu)

HER-2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. Das *HER-2/neu* Gen kodiert für einen Glykoproteinrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase Aktivität, die intrazellulär Phosphatgruppen an Tyrosinreste der intrazellulären Effektormoleküle koppelt und somit die Zellproliferation und Hemmung der Apoptose induziert (Olayioye 2001). Bei einer Überexpression wird HER-2/neu vermehrt durch unterschiedliche bis jetzt nicht vollständig erforschte Wachstumsfaktoren aktiviert.

Eine immunhistochemische Überexpression von HER-2/neu wurde in unterschiedlichen Tumoren nicht nur mit einer schlechter Prognose, sondern auch mit einer möglichen Rezeptor gerichteten Therapieoption assoziiert (Harder et al. 2012). Die Expression von HER-2/neu im PDAC ist mit 11% bis 45% in der Literatur beschrieben (Harder et al. 2012, Tsiambas et al. 2006, Yamanaka et al. 1993).

1.5 Bispezifische Antikörper

Ein bispezifischer Antikörper ist ein rekombinant hergestelltes Immunkonjugat, das durch die Fusion von zwei unterschiedlichen variablen Antikörperdomänen zwei unterschiedliche Antigene bindet und sie damit einander näherbringen kann. Hiermit ergibt sich eine viel versprechende Möglichkeit zur Zytotoxizitätssteigerung von T-Zellen in der Behandlung von Tumoren. Dabei wird ein Einzelketten-bispezifisches Antikörperkonstrukt zur Rekrutierung von Effektorzellen zu Tumorzellen verwendet (Bargou et al. 2008). Bispezifische Antikörper wie Blinatumomab mit einer Spezifität für CD3 auf T-Zellen und für CD19 auf Lymphomzellen oder leukämischen Zellen sind effektiv bei der Behandlung von hämatologischen Malignomen eingesetzt worden (Nagorsen et al. 2012, Klinger et al. 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nach adoptiven Zelltransfer humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen

mit einem neu entwickelten bispezifischen Antikörper (mit Spezifität für HER-2/neu auf PDAC Zellen und für den V γ 9 TZR auf $\gamma\delta$ -T-Zellen) eine Reduktion des Wachstums von humanen transplantierten Pankreastumoren in immundefizienten SCID-Mäusen zu beobachten war (Oberg et al. 2014). Das neu entwickelte bispezifische Antikörperkonstrukt [(Her2)₂xV γ 9] wurde im Labor der Kooperationspartner PD Dr. Peipp, Dr. Kellner, Prof. Dr. Gramatzki (Sektion für Stammzelltransplantation und Immuntherapie, UKSH, Campus Kiel) hergestellt.

2 Fragestellung

Einige Veröffentlichungen der letzten Jahre beschreiben, dass die Tumorgenese nicht nur durch genetische Veränderungen beeinflusst wird, sondern auch von der Tumormikroumgebung (Tumor-Stroma) geprägt wird. Das Tumor-Stroma umfasst ein zelluläres (z.B. Endothelzellen, Immunzellen, Myofibroblasten und aktivierte Sternzellen) und ein nicht-zelluläres Kompartiment (extrazelluläre Matrix). Seitdem bekannt ist, dass die gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und nicht neoplastischen Stromazellen die Tumorentstehung und Progression fördern (z.B. durch Verbesserung der Zellmigration, Metastasierung oder Chemoresistenz der Tumorzellen), ist das Tumor-Stroma als ein wichtiges therapeutisches Ziel identifiziert worden. Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist ebenso wie die chronische Pankreatitis (CP), die als Risikofaktor für eine PDAC Entwicklung angesehen wird, durch ein ausgeprägtes Stroma charakterisiert. In Anbetracht der Tatsache, dass aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen Tumorzellen z.B. des PDAC lysieren können (Kabelitz et al. 2004, Wrobel et al. 2007), stellte sich die Frage, inwiefern eine Infiltration des Stromas von PDAC- und CP-Patienten durch $CD3^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen oder $CD3^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen ($CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen) stattfindet. Es ergaben sich somit für die vorliegende Arbeit folgende Fragen bzw. Zielvorgaben:

- Ist im PDAC- und CP-Gewebe eine Infiltration von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu beobachten und wenn ja, korreliert diese mit dem klinischen Verlauf?
- Zur Bestimmung der $\gamma\delta$ -T-Zellinfiltration sollte die immunhistochemische $\gamma\delta$ -T-Zell Färbung etabliert werden.
- Können infiltrierende $CD3^+$ TZR $\gamma\delta$ bzw. $\alpha\beta$, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im PDAC-Gewebe im Vergleich zum CP-Gewebe nachgewiesen und quantifiziert werden?

Des Weiteren war es für den Einsatz bispezifischer Antikörper, welche selektiv an Tumorantigene wie HER-2/neu und an T-Zellen binden können, wichtig zu überprüfen, ob PDAC Zellen HER-2/neu exprimieren. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob der Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu in PDAC- und CP-Gewebe vergleichbar exprimiert wird. Es ergab sich dabei weitere folgende Frage:

- Exprimieren PDAC-Gewebe den Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu und korreliert diese Expression mit dem klinischen Verlauf?

3 Material und Methoden

3.1 Ethikvotum

Das Forschungsprojekt wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel und des Universitätsklinikums Tübingen (Referenznummer: AZ 110/99 und AZ D429/09) genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von allen Patienten eingeholt.

3.2 Patienten und Gewebe

Bauchspeicheldrüsengewebe wurde von Patienten während der Operation gewonnen. Die Aufarbeitung des PDAC-Gewebes und dessen Beurteilung wurden am Institut für Pathologie, UKSH, Campus Kiel (Prof. Dr. med. Röcken) durchgeführt. Die Bereitstellung des CP-Gewebes und die entsprechende Diagnostik hierzu wurden am Institut für Pathologie der Universität Tübingen (Prof. Dr. med. Sipos) durchgeführt. Zur Bestimmung von prognostischen Variablen für das häufigste Tumorstadium wurden nur PDAC-Patienten (n = 42) mit dem pathologisch gesicherten Tumorstadium pT3N1M0 eingeschlossen. Die Charakteristika aller CP- und PDAC-Patienten sind in Tabelle Nr. 1 zusammengefasst.

Tabelle Nr. 1: Eigenschaften von CP- und PDAC-Patienten

Parameter	
Anzahl der CP-Patienten	15
Durchschnittsalter (Bereich)	52 (40-69)
Geschlecht (männlich / weiblich)	13/2
Anzahl der PDAC-Patienten	42
Durchschnittsalter (Bereich)	65 (46-85)
Geschlecht (männlich / weiblich)	24/18
Tumorstadium (T)	T3
Lymphknotenbefall (N)	N1
Metastasen (M)	M0
Tumor-Grading	
G1 (gut differenziertes bösartiges Gewebe)	6
G2 (mäßig differenziertes bösartiges Gewebe)	23
G3 (schlecht differenziertes bösartiges Gewebe)	13

3.3 Immunhistochemie

Mit der immunhistochemischen Färbung werden spezifische Proteine (z.B. $\gamma\delta$ -TZR) mittels (monoklonaler) Antikörper (z.B. anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk), die mit einem Detektionssystem (Zweitantikörper + Chromogen) kombiniert werden, lichtmikroskopisch sichtbar gemacht (Abb. 1).

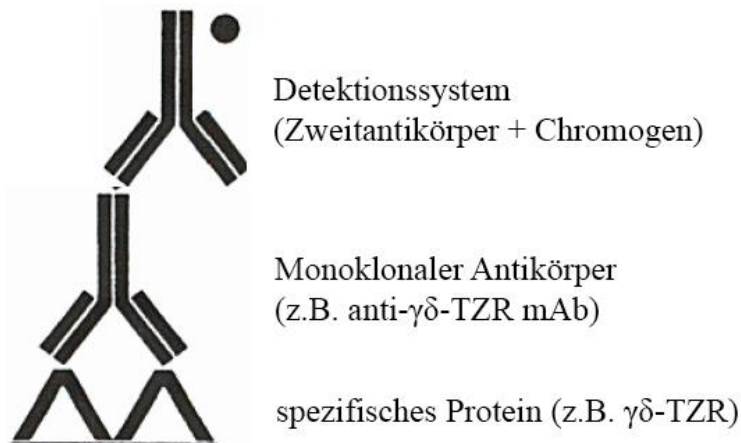


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der immunhistochemischen Färbung. Spezifisches Protein (z.B. $\gamma\delta$ -TZR) wird mit Hilfe eines (monoklonalen) Antikörpers (z.B. anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk), und einem Detektionssystem (Zweitantikörper + Chromogen) lichtmikroskopisch sichtbar gemacht.

Für die Immunhistochemie wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete serielle Schnitte verwendet. Für die Färbungen wurden folgende mAk verwendet:

- anti-CD3 (Klon SP7, Fisher Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland),
- anti-CD4 (Klon 4B12, Leica Novocastra, Wetzlar, Deutschland),
- anti-CD8 (Klon C8/144B, Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland),
- anti-HER-2/neu (Klon SP3, Fisher Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

Alle Färbungen wurden am Institut für Pathologie, UKSH, Campus Kiel in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Röcken durchgeführt. Dabei wurde ein voll automatisiertes Routineverfahren (Leica BOND-MAX System) verwendet (Helm et al. 2014, Oberg et al. 2014).

3.4 Immunhistochemischer Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Die Etablierung der $\gamma\delta$ -T-Zell Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Sebens, Institut für Experimentelle Medizin, UKSH, Campus Kiel. Dabei wurde als primärer Antikörper der monoklonale anti- $\gamma\delta$ -T-Zell Antikörper (Klon γ 3.20,

Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet, der sich zur Anwendung an Paraffin eingebettetem Gewebe eignet.

Der primäre Antikörper ist gegen das konstante γ -Segment des humanen T-Zell-Rezeptors (TZR) gerichtet. Die optimale Färbkonzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ wurde in Vorversuchen ermittelt. Unter dem Mikroskop zeigten die damit detektierten $\gamma\delta$ -T-Zellen einen roten Farbniederschlag, welcher für die Auswertung ausschlaggebend war. In den folgenden Unterpunkten sind die verwendeten Reagenzien sowie die Färbemethodik näher erläutert.

3.4.1 Verwendete Reagenzien und Geräte für die Immunhistochemie

- Alkohole 100%, 95%, 80%, 70%, 50% (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Antigen Retrieval Solution (Dako, pH 9,0) (Dako, Glostrup, Dänemark) diente der Epitopdemaskierung von formalinfixierten Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten
- BSA (*Bovine Serum Albumin* - Rinderserumalbumin) (Biomol, Hamburg, Deutschland)
 - 0,1% BSA Puffer = PBS + 0,1% BSA (0,1g/100ml)
 - 4% BSA Puffer = PBS + 4% BSA (4g/100ml)
- Carl Zeiss „Axioplan 2.0“ Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Dako AEC Substrate Chromogen (Dako, Carpinteria, Vereinigte Staaten)
- Destilliertes Wasser, Millipore Wasseraufbereitungssystem (Reinstwasser) (LS Orbital, Schwechat, Österreich)
- Eindeckgläser (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
- Glyceringelatine (Waldeck, Münster, Deutschland)
- Hämalun (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Isotyp-Kontrollantikörper (Maus IgG1, 3 $\mu\text{g/ml}$), (R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- Methanol (reinst) (Th. Geyer GmbH, Renningen, Deutschland)
- Miele - De Luxe M 686 – Mikrowelle (Miele, Gütersloh, Deutschland)
- PBS (Phosphate Buffered Saline), Puffer (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Primär-Antikörper: Paraffin gängiger anti-pan- $\gamma\delta$ -TZR mAk „Human TCR C γ M1 purified mAb“, Klon: γ 3.20, Isotyp: Maus IgG1, Konzentration 3 $\mu\text{g/ml}$, (Fisher Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

- Wasserstoffperoxid (3%) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol (Th.Geyer GmbH, Renningen, Deutschland)
- Zweitreagenz: EnVision+™ System, HRP (*Horseradish peroxidase*, Meerrettich Peroxidase), (Dako, Carpinteria, Vereinigte Staaten). Das HRP markierte Polymer ist an einem 2. Ak (anti-Maus) konjugiert.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung der Gewebepräparate von PDAC- und CP-Patienten

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte: Vor der immunhistochemischen Färbung mussten die in Paraffin eingebetteten Schnitte von (ihrem Einbettungsmedium) Paraffin getrennt werden, da dieses zu unerwünschten Hintergrundfärbungen führen kann. Die Schnitte wurden hierfür mit Xylol für 2 x 10 min. behandelt. Anschließend durchliefen die Gewebsschnitte eine absteigende Alkoholreihe (100% 2x 10 min.; 95%, 80%, 70%, 50% für jeweils 2 min.) zur Rehydrierung. Nach der Behandlung mit der Alkoholreihe wurden die Schnitte für 2 min. in destilliertes Wasser eingetaucht.
2. Spülvorgang: Die Schnitte wurden in 0,1% BSA-Puffer für 10 min. gespült.
3. Unterdrückung der Peroxidase: Es erfolgte eine Inkubation (10 min.) in 3% Wasserstoffperoxid in 100% Methanol. Durch diesen Vorgang wird die endogene Peroxidaseaktivität gehemmt. Nach Beendigung dieser Inhibition erfolgte erneut ein Waschvorgang 10 min. mit 0,1% BSA-Puffer.
4. Freilegen der Antigenstruktur durch Behandlung der Schnitte in einer Mikrowelle: Um eine Epitopdemaskierung von formalinfixierten Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten zu ermöglichen, wurden die Schnitte in der Lösung „Antigen Retrieval Solution“ 1:10 bei 150 Watt in der Mikrowelle (4 x 5 min.) behandelt. Anschließend wurden die Schnitte 10 min. auf Raumtemperatur abgekühlt.
5. Spülvorgang: Die Schnitte wurden in 0,1% BSA-Puffer für 3 x 5 min. gespült.
6. Serumblock mit 4% BSA Puffer für 20 min. in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur: Dieser Schritt ist wichtig, da es sonst zu einer unspezifischen Bindung der im nächsten Schritt folgenden Primärantikörper an stark geladene Kollagene und Bindegewebeelemente kommen könnte. Durch die Zugabe der 4% BSA Puffer, werden die elektrisch geladenen Gewebestellen besetzt.

7. Zugabe des Primärantikörpers: Der zuvor 1:50 verdünnte primäre anti- $\gamma\delta$ -TZR mAb („Human TCR C γ M1 purified mAb“, Klon: γ 3.20, Konzentration 3 μ g/ml) wurde auf die Schnitte gegeben. Es erfolgte nun eine Inkubation für 45 min. in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur.
8. Auftragen des Zweitreagenzes: Nach Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers durch Waschen der Schnitte mit 0,1% BSA-Puffer für 3 x 5 min. wurde das Zweitreagenz (EnVision+TM Maus, Meerrettich Peroxidase) aufgetragen und für 45 min. in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert.
9. Visualisierung unter Verwendung des AEC-Substrats (Dako): Es erfolgte ein Spülvorgang in 0,1% BSA-Puffer für 3 x 5 min. Nun wurden die Schnitte für 10 min. mit dem Dako AEC-Chromogen versehen. Dieser Schritt führte schließlich über einen Farbumschlag zur Darstellung positiver Antigen-Antikörper-Bindung.
10. Spülvorgang: Die Schnitte wurden im Leitungswasser für 2 x 5 min. gespült. Dann erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalaun für 1 min.
11. Einbetten: Nach dem Waschen in Wasser für 10 min. wurden die Präparate mit Kaiser`s Glyceringelatine fixiert.

3.4.3 Negative Kontrolle

In der negativ Kontrolle wurden die Schnitte anstatt mit einem primären Antikörper mit einem Isotypen-Kontrollantikörper (Maus IgG1, 3 μ g/ml) und einem Zweitreagenz markiert, dabei zeigte sich keine Färbung.

3.4.4 Positive Kontrolle

Als positive Kontrollen wurde ein $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphom- und ein Tonsillen-Präparat, welche freundlicherweise von Prof. Dr. med. Klapper und Prof. Dr. med. Röcken (Institut für Pathologie, UKSH, Campus Kiel) zu Verfügung gestellt wurden, verwendet.

3.5 Scoring-System

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte mittels eines *Scoring* Systems. Dabei wurden die positiven Zellen in Prozent in Bezug auf das Stroma des Schnittes angegeben. Als Stroma wurde das komplette CP bzw. PDAC Pankreasgewebe ohne Azinus Zellen, Epithelien, lymphatisches Gewebe und Blutgefäße definiert. Um die Objektivität der Auswertung zu

steigern, wurden die Schnitte dreimal unabhängig voneinander beurteilt und zum Schluss ein Mittelwert der ermittelten *Scores* errechnet. Das *Scoring*-System ist für die einzelnen Variablen in Tabelle Nr. 2 zusammengefasst. Die Evaluation, die Bewertung und das Fotografieren der Schnitte erfolgte mit dem Carl Zeiss „Axioplan 2.0“ Mikroskop und mit der PC-Software „AxioCam Rel. 4.8“.

Tabelle Nr. 2: *Scoring*-System zur Bewertung des Stromas und Epithels in CP- und PDAC-Gewebeschnitten

$\gamma\delta$ -T-Zellen	0 \triangleq keine $\gamma\delta$ -T-Zellen 1 \triangleq weniger als 1% positive Zellen
CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen	1 \triangleq 1-10% positive Zellen 2 \triangleq 11-50% positive Zellen 3 \triangleq 51-90% positive Zellen
Verhältnis von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ T-Zellen	0 \triangleq CD4 ⁺ entspricht der CD8 ⁺ T-Zell-Zahl 1 \triangleq CD4 ⁺ mehr als CD8 ⁺ T-Zellen 2 \triangleq CD8 ⁺ mehr als CD4 ⁺ T-Zellen
Für HER-2/neu	0 \triangleq keine positive Zellen 1 \triangleq HER-2/neu positive Zellen vorhanden

3.6 Statistische Analyse

Die statische Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Freitag-Wolf (Institut für Medizinische Informatik und Statistik des UKSH, Campus Kiel) und Herrn Dr. Helm (Institut für Experimentelle Medizin, UKSH, Campus Kiel). Alle Ergebnisse wurden kategorisiert und als absolute und relative Häufigkeit dargestellt, die zwischen den Gruppen mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen wurde. Die Assoziation zwischen Stroma- und Gangepithel-verwandten Parametern innerhalb des Pankreasgewebes von CP- und PDAC-Patienten wurde durch den Chi-Quadrat-Test analysiert und geprüft. Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier-Methode bestimmt und mögliche Einflussfaktoren mit dem Log-Rank-Test identifiziert. Alle Tests wurden bei einem Signifikanzniveau von 5% ohne Anpassung auf multiple Testung durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 17.0.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Färbung von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erfolgte die Etablierung der spezifischen $\gamma\delta$ -T-Zell-Färbung. Um die Spezifität der neu etablierten immunhistochemischen $\gamma\delta$ -T-Zell-Färbung zu überprüfen, erfolgte eine Kontrollfärbung. Dabei wurden 2 von 42 untersuchten PDAC-Präparaten (Abb. 2), ein $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphom-Präparat (Abb. 3 A-C) und ein Tonsillen-Präparat als Positiv-Kontrollen (Abb. 3 D-F) jeweils mit dem anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk (Klon γ 3.20, 3 μ g/ml) oder dem Isotyp-Kontrollantikörper (IgG1, 3 μ g/ml) gefärbt. Als weitere Kontrolle wurden die Schnitte nur mit dem Zweitreagenz gefärbt (Abb. 2 C + F, Abb. 3 C + F). Bei der Färbung mit dem anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk fanden sich in jedem Präparat rotgefärbte positive $\gamma\delta$ -T-Zellen (Abb. 2 A, D; Abb. 3 A, D). In der Färbung mit dem Isotyp-Kontrollantikörper (Abb. 2 B, E; Abb. 3 B, E) und nur mit dem Zweitreagenz (Abb. 2 C, F; Abb. 3 C, F) fanden sich hingegen keine positiven $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diese Färbungen zeigen, dass die neu etablierte $\gamma\delta$ -T-Zell Färbung spezifisch ist.

Eine Zusammenfassung der Kontroll-Färbung ist in der Tabelle Nr. 3 erstellt.

Tabelle Nr. 3: Zusammenfassung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Kontroll-Färbung

Präparat Antikörper	1. PDAC (Abb. 2 A-C)	2. PDAC (Abb. 2 D-F)	$\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphom (Abb. 3 A-C)	Tonsille (Abb. 3 D-F)
1. AK. (Abb. 2 A, D) (Abb. 3 A, D)	positiv	positiv	positiv	positiv
Isotyp-AK. (Abb. 2 B, E) (Abb. 3 B, E)	negativ	negativ	negativ	negativ
Zweitreagenz (Abb. 2 C, F) (Abb. 3 C, F)	negativ	negativ	negativ	negativ

1. AK.: Paraffin-gängiger pan $\gamma\delta$ -TZR mAk Klon γ 3.20 (Konzentration: 3 μ g/ml). **Isotyp-AK.:** Isotyp-Kontrollantikörper (IgG1, Konzentration 3 μ g/ml). Zweitreagenz (EnVision+™ System, HRP).

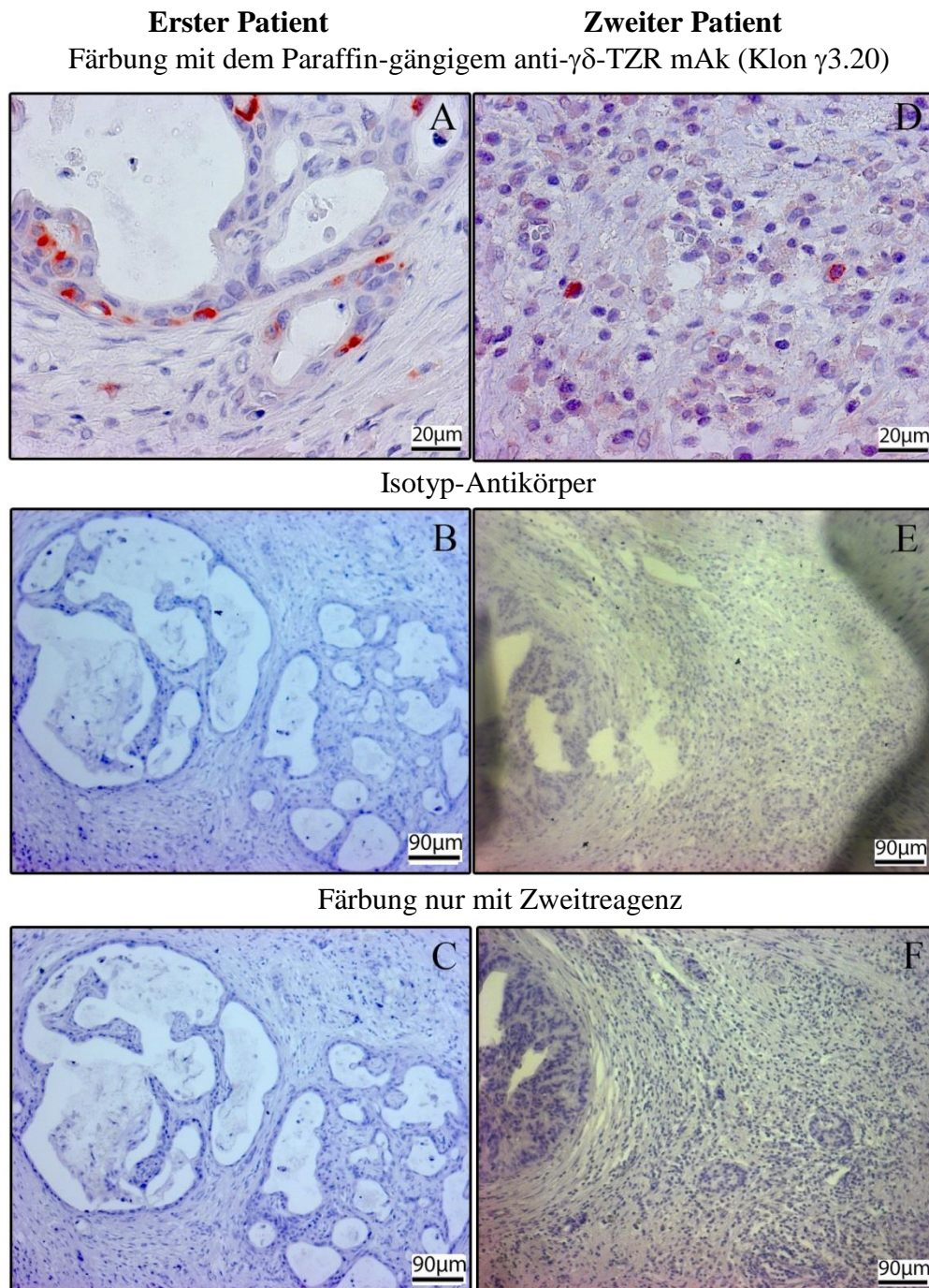


Abb. 2: Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen im PDAC-Gewebe. A-C: Erster Patient. D-F: Zweiter Patient. Serienmäßige Färbung des in Paraffin eingebetteten PDAC-Gewebes von zwei Patienten mit A, D: anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk (rotgefärbte $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der basalen Schicht des Epithelganges und im Stroma zusehen); B, E: Isotyp-Kontrollantikörper (keine positiven Zellen sichtbar); C, F: nur mit Zweitreagenz (keine positiven Zellen sichtbar).

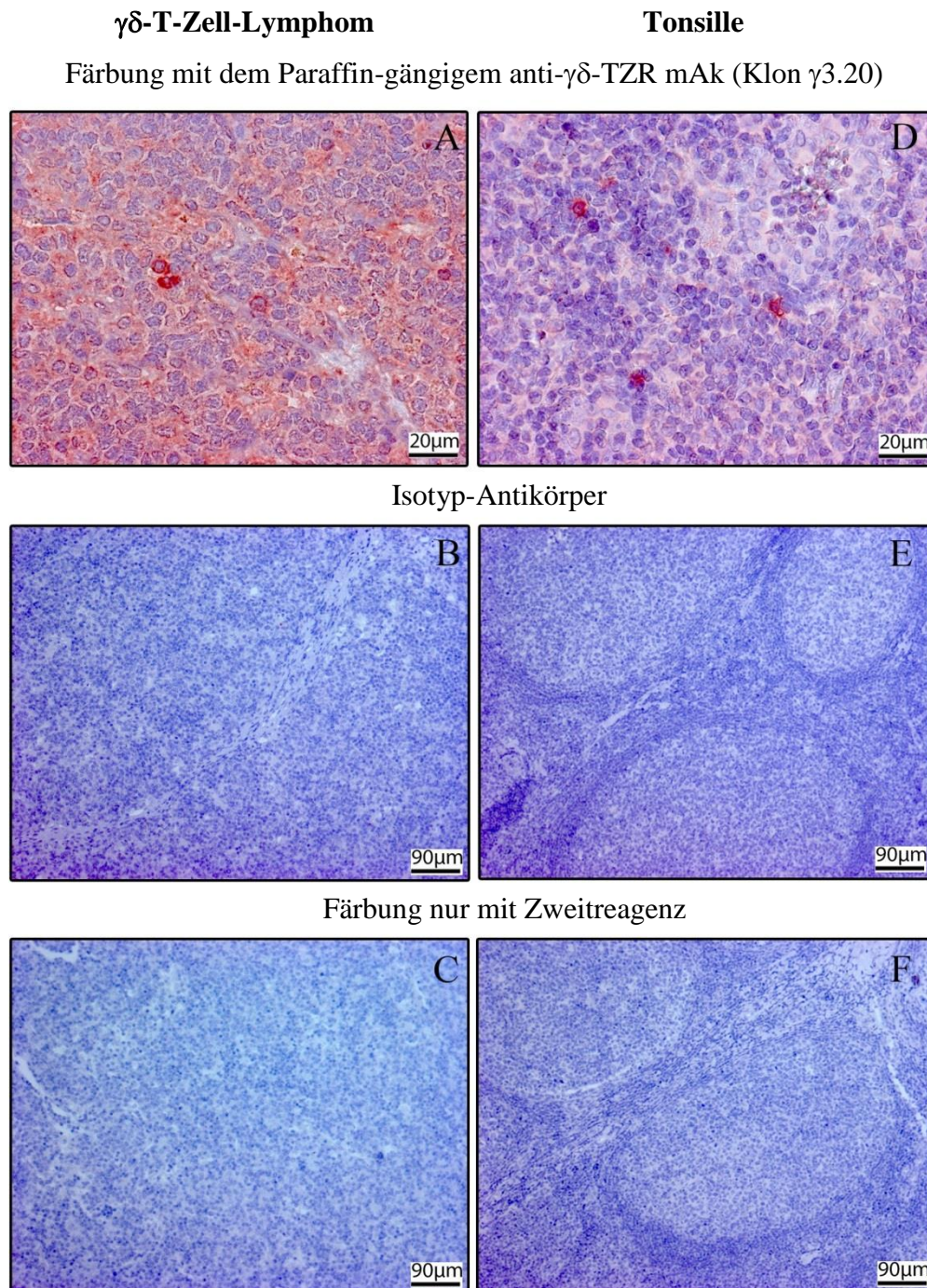


Abb. 3: Nachweis von $\gamma\delta$ -T-Zellen im $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphom und in der Tonsille. A-C: Serienmäßige Färbung des in Paraffin eingebetteten $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphoms und D-F: der Tonsille mit: anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk (A, D, Pfeile deuten auf positive $\gamma\delta$ -T-Zellen hin); Isotyp-Kontrollantikörper (B, E, keine positiven Zellen sichtbar); nur mit Zweitreagenz (C, F, keine positiven Zellen sichtbar)

4.2 Verteilung der T-Zellen in CP- und PDAC-Geweben

Präparate von 42 PDAC und 15 CP Patienten, die mit spezifischen immunhistochemischen Färbungen für die T-Zell Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8 und den $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor (für $\gamma\delta$ -T-Zellen) gefärbt wurden, konnten ausgewertet werden. Sowohl $\gamma\delta$ - als auch $\alpha\beta$ -T-Zellen exprimieren CD3 auf ihrer Oberfläche. $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren im Unterschied zu $\alpha\beta$ -T-Zellen kein CD4 und nur ~ 30% der $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren CD8 (Neves et al. 2010). Die Verteilung wird unabhängig von der Oberflächenexpression des TZR $\alpha\beta$ betrachtet, da $\gamma\delta$ -T-Zellen nur einen kleinen Prozentsatz (1-10%) der CD3 T-Zellen ausmachen (Wesch et al. 2011). Die Ergebnisse werden zunächst in zwei Tabellen (Tabelle Nr. 4 und 5) aufgelistet. Es ist jeweils der Mittelwert des *Scores* von drei unabhängigen Beurteilungen dargestellt.

Tabelle Nr. 4: *Scoring* der einzelnen Parameter in CP-Präparate

Nr.	$\gamma\delta$ -TZR	CD3	CD4	CD8	CD4:CD8
1	0	2	2	2	1
2	0	2	2	2	2
3	1	2	1	1	1
4	1	2	2	2	1
5	1	2	2	2	1
6	1	3	2	2	2
7	1	3	2	2	2
8	1	2	2	2	1
9	1	3	2	*	*
10	0	2	2	2	1
11	1	2	2	2	1
12	1	2	2	2	1
13	1	3	2	2	2
14	1	3	2	2	2
15	1	2	2	2	2

* CD8-Präparat war nicht auswertbar. Für die Tabellen Nr. 4 (CP) und Nr. 5 (PDAC) gilt das *Scoring*-System: für $\gamma\delta$ -T-Zellen (0 $\hat{=}$ keine $\gamma\delta$ -T-Zellen, 1 $\hat{=}$ weniger als 1% positive $\gamma\delta$ -T-Zellen in Bezug auf das Stroma); für CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen (1 $\hat{=}$ 1-10% positive Zellen in Bezug auf das Stroma, 2 $\hat{=}$ 11-50% positive Zellen, 3 $\hat{=}$ 51-90% positive Zellen); Für das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen (0 $\hat{=}$ CD4=CD8, 1 $\hat{=}$ CD4>CD8, 2 $\hat{=}$ CD8>CD4); Für HER-2/neu (0 $\hat{=}$ keine positive Zellen, 1 $\hat{=}$ HER-2/neu positive Zellen). Das Überleben in Monaten ist für die PDAC-Patienten in Tabelle Nr. 5 aufgeführt.

Tabelle Nr. 5: *Scoring* der einzelnen Parameter in PDAC-Präparate

Nr.	$\gamma\delta$ -TZR	CD3	CD4	CD8	CD4:CD8	Überleben in Monaten
1	1	2	2	2	2	4
2	0	3	2	2	1	108
3	1	2	2	1	1	54
4	0	2	1	2	2	103
5	1	2	1	1	2	52
6	1	2	2	1	2	44
7	0	2	1	2	2	44
8	1	2	2	2	2	44
9	1	2	1	2	2	39
10	0	2	2	1	1	14
11	0	2	2	2	0	16
12	1	2	1	2	2	38
13	1	3	2	2	1	37
14	0	2	1	1	0	35
15	1	2	2	2	1	33
16	0	2	2	1	1	0
17	0	2	1	2	2	30
18	0	1	1	1	0	1
19	1	1	1	1	2	24
20	1	2	1	2	2	22
21	0	2	1	2	2	16
22	0	2	2	2	1	13
23	1	2	1	2	2	12
24	1	2	1	2	2	12
25	1	2	1	2	2	9
26	0	1	1	1	2	8
27	1	2	2	2	2	7
28	0	2	2	2	2	6
29	1	1	1	1	2	6
30	0	2	1	2	2	6
31	0	1	1	1	2	5
32	1	2	1	2	2	5
33	1	2	2	1	0	5
34	1	3	2	2	1	4
35	1	2	2	2	1	2
36	0	2	2	2	1	1
37	0	2	2	2	1	1
38	0	2	1	2	2	1
39	0	2	2	1	1	1
40	1	2	1	2	2	23
41	0	2	2	2	1	35
42	0	3	2	2	1	31

Scoring siehe Tabelle Nr. 4

Um die Verteilung der T-Zellpopulationen im Vergleich zwischen der CP- und dem PDAC-Präparaten deutlicher zu machen, wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Der Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen in den CP-Präparaten, in welchen $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden konnten, war größer im Stroma von CP-Präparaten (Abb. 4A) als bei PDAC-Präparaten (Abb. 4B). Da alle $\gamma\delta$ -T-Zellen das Oberflächenmolekül CD3 exprimieren, deutet der hohe Prozentsatz an CD3 daraufhin, dass nicht nur $\gamma\delta$ -T-Zellen, sondern insbesondere $CD3^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen vorkamen. Die Anzahl der $CD3^+$ T-Zellen war in CP-Präparaten (Abb. 4C) größer als in PDAC-Präparaten (Abb. 4D).

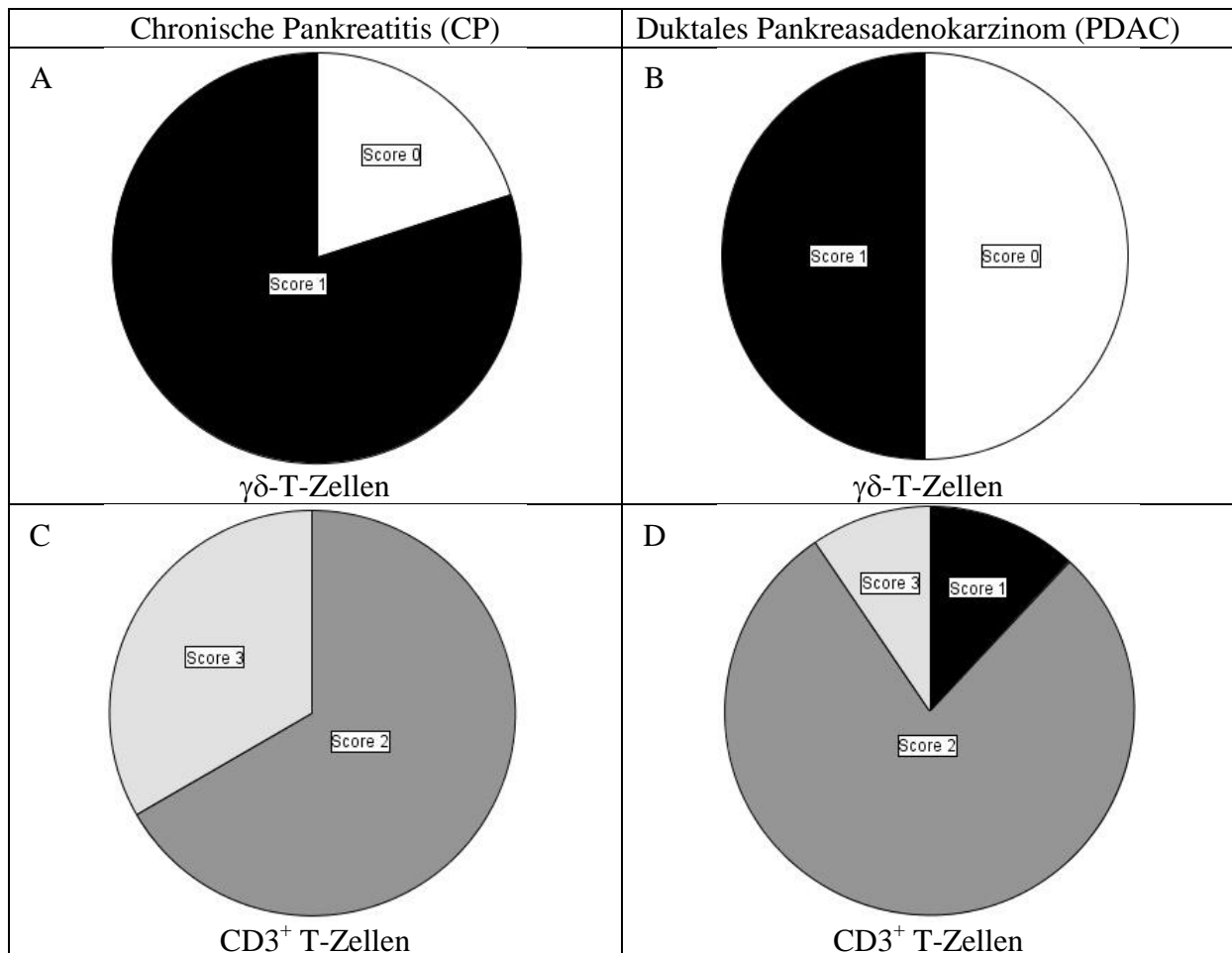


Abb. 4: Verteilung der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der $CD3^+$ T-Zellen in CP- und PDAC-Präparaten. Die Tortendiagramme zeigen die $\gamma\delta$ -T-Zellhäufigkeit in CP-Präparaten (A) und in PDAC-Präparaten (B). Für $\gamma\delta$ -T-Zellen galt folgendes *Scoring*-System (0 $\hat{=}$ keine $\gamma\delta$ -T-Zellen, 1 $\hat{=}$ weniger als 1% positive $\gamma\delta$ -T-Zellen in Bezug auf das Stroma). In den Tortendiagrammen ist die Anzahl der $CD3^+$ T-Zellen in CP-Präparaten (C) und in PDAC-Präparaten (D) dargestellt. Für $CD3^+$ T-Zellen galt folgendes *Scoring*-System (1 $\hat{=}$ 1-10% positive Zellen in Bezug auf das Stroma, 2 $\hat{=}$ 11-50% positive Zellen, 3 $\hat{=}$ 51-90% positive Zellen).

Der Prozentsatz von $CD4^+$ T-Zellen war in CP-Präparaten (Abb. 5A) größer als in PDAC-Präparaten (Abb. 5B). $CD8^+$ T-Zellen waren häufiger in CP-Präparaten (Abb. 5C) zusehen als in PDAC-Präparaten (Abb. 5D).

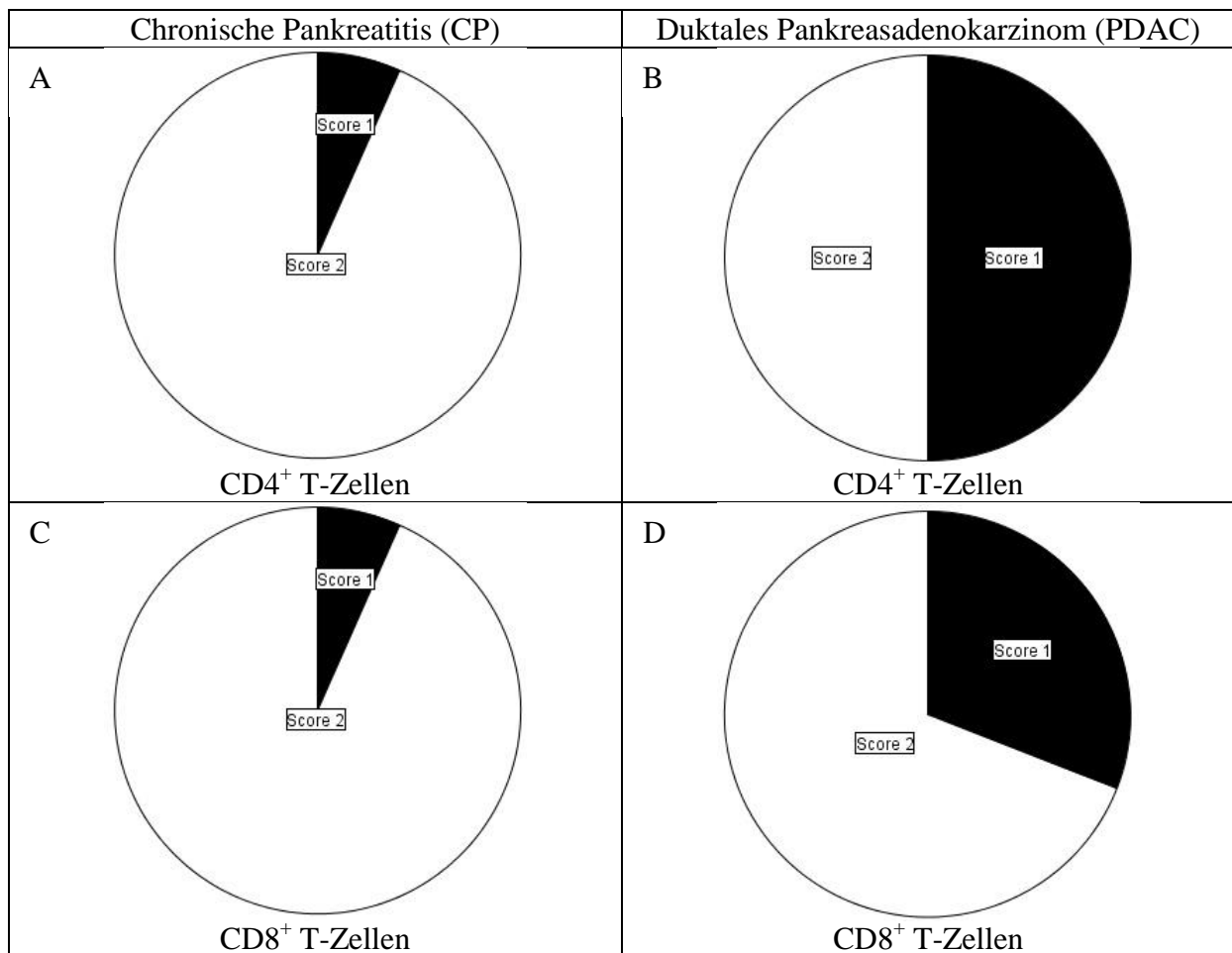


Abb. 5: Verteilung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in CP- und PDAC-Präparaten. Die Tortendiagramme zeigen die $CD4^+$ (A, B) und $CD8^+$ (C, D) T-Zellhäufigkeiten in CP-Präparaten (A, C) und in PDAC-Präparaten (B, D). Für die Auswertung wurde folgendes *Scoring*-System verwendet: 1 $\hat{=}$ 1-10% positive Zellen in Bezug auf das Stroma, 2 $\hat{=}$ 11-50% positive Zellen in Bezug auf das Stroma.

Bei der Bestimmung des Verhältnisses von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurde folgendes festgestellt: $CD8^+$ T-Zellen kamen im Verhältnis zur $CD4^+$ T-Zellen häufiger in PDAC-Präparaten (Abb. 6B, schwarz) als in CP-Präparaten (Abb. 6A) vor.

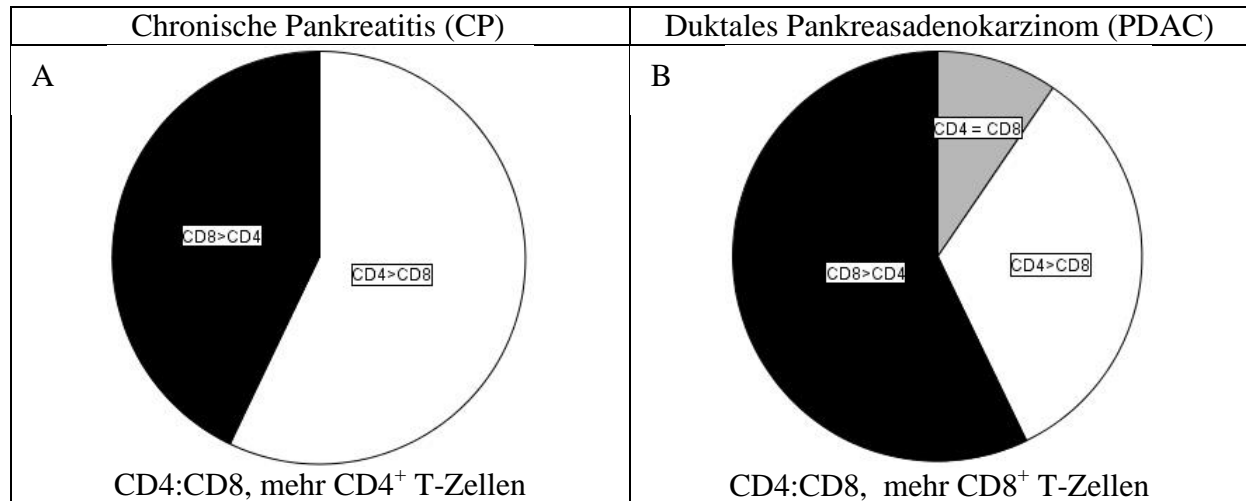


Abb. 6: Bestimmung des Verhältnisses von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen in CP- versus PDAC-Präparaten. Die Tortendiagramme zeigen das Verhältnis von $CD4^+$ T-Zellen zu $CD8^+$ T-Zellen in CP-Präparaten (A) und in PDAC-Präparaten (B).

4.3 Lokalisation von $CD3^+$ $CD8^+$ $\gamma\delta$ -T-Zellen im Stroma bzw. Gangepithel des Pankreasgewebes von CP- und PDAC-Patienten

An Hand serieller Schnitte wurde abgeklärt, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen in Bereichen des Gewebes lokalisiert sind, in welchen vermehrt auch $CD3^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen vorkamen. Aufgrund der geringeren Anzahl von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu den restlichen nicht $\gamma\delta$ -T-Zellen in dem Gewebe von Patienten mit beiden Bauchspeicheldrüsenerkrankungen, verwendeten wir das bereits erwähnte *Scoring*-System ($0 \triangleq$ keine $\gamma\delta$ -T-Zellen, $1 \triangleq$ weniger als 1% $\gamma\delta$ -T-Zellen) für $\gamma\delta$ -T-Zellen. In Anbetracht der Tatsache, dass alle $\gamma\delta$ -T-Zellen $CD3$ und einige zusätzlich $CD8$ exprimieren, haben wir die Anzahl der gefärbten $CD3$ - und $CD8$ -positiven Zellen in seriellen Schnitten, in welchen $\gamma\delta$ -T-Zellen zu finden waren, mit dem gleichen Scoringssystem analysiert. Wie in Tabelle Nr. 6 und 7 gezeigt ist, beobachteten wir, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen, wie auch $CD3^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, in den gleichen Bereich des Stromas und des Gangepithels beider Pankreaserkrankungen zu finden waren (Abb. 7).

Die Abb. 7 A-C zeigt dies für den $\gamma\delta$ -TZR, $CD3$ und $CD8$ für einen repräsentativen PDAC Spender und die Abb. 7 D-F entsprechend einen weiteren repräsentativen PDAC Spender. In

Pankreasgewebe von CP-Patienten zeigte sich eine vergleichbare Verteilung (Tab. 6). Dies ist konform mit der Tatsache, dass alle $\gamma\delta$ -T-Zellen CD3 exprimieren und fast alle zytotoxischen $\gamma\delta$ -T-Zellen auch CD8 exprimieren. Ferner sammelten sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen im PDAC-Gewebe stärker im Gangepithel und im Stroma in der Nähe des Gangepithels an (Abb. 8 III), während sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen im CP-Gewebe vor allem im Stroma und fern von Gangepithelen ansammelten (Abb. 8 II), (Tabelle Nr. 6 und 7). Dies ist näher im nächsten Kapitel 4.4 erläutert.

Tabelle Nr. 6: Assoziation zwischen Stroma- und Gangepithel-Parameter im Pankreasgewebe von CP-Patienten

Variable CP	Code	A	B	C	D	E	F
$\gamma\delta$ -T/ Stroma	A		< 0.01	< 0.01	0.02	0.02	0.02
CD3+/ Stroma	B			< 0.01	0.02	0.02	0.02
CD8+/ Stroma	C				0.02	0.02	0.02
$\gamma\delta$ -T/ Gang	D					< 0.01	< 0.01
CD3+/ Gang	E						< 0.01
CD8+/ Gang	F						

Tabelle Nr. 7: Assoziation zwischen Stroma- und Gangepithel-Parameter im Pankreasgewebe von PDAC-Patienten

Variable PDAC	Code	A	B	C	D	F	G
$\gamma\delta$ -T/ Stroma	A		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
CD3+/ Stroma	B			< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
CD8+/ Stroma	C				< 0.01	< 0.01	< 0.01
$\gamma\delta$ -T/ Gang	D					< 0.01	< 0.01
CD3+/ Gang	E						< 0.01
CD8+/ Gang	F						

Die Signifikanzen (P-Werte) wurden in Tabelle Nr. 6 und 7 mit dem Chi-Quadrat Test berechnet.

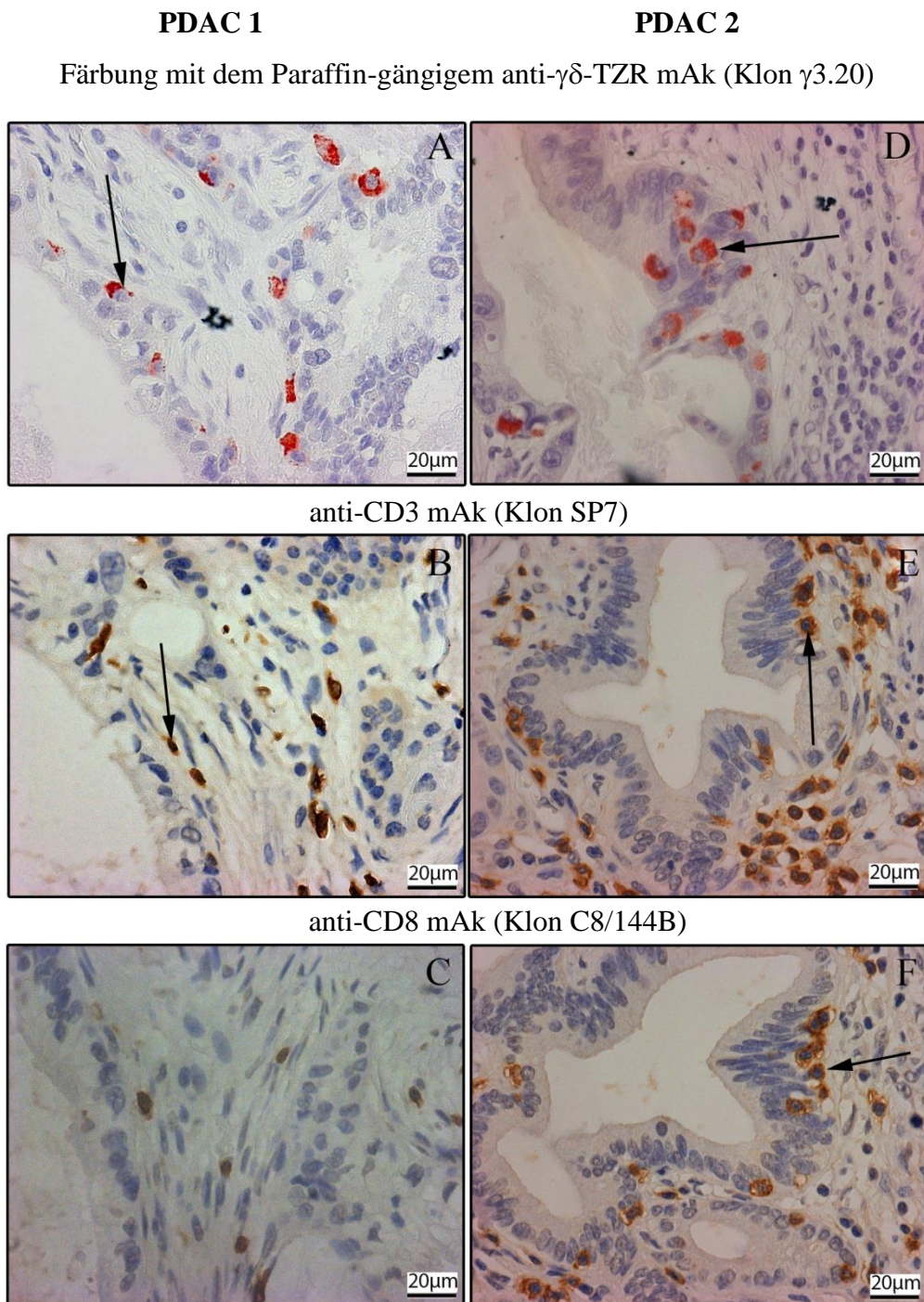


Abb. 7: Vergleich von $\gamma\delta$ -T-Zellen und $CD3^+$, $CD8^+$ T-Zellen im PDAC-Gewebe. A-C: erster repräsentativer PDAC-Patient. D-F: zweiter repräsentativer PDAC-Patient. Serielle Färbung des in Paraffin eingebetteten PDAC-Gewebes mit A, D: anti- $\gamma\delta$ -TZR mAk (Klon $\gamma 3.20$); B, E: anti-CD3 mAk (Klon SP7); C, F: anti-CD8 mAk (Klon C8/144B). Die Pfeile deuten auf $\gamma\delta$ -T-Zellen (A, D), $CD3^+$ T-Zellen (B, E) und $CD8^+$ T-Zellen (F) hin.

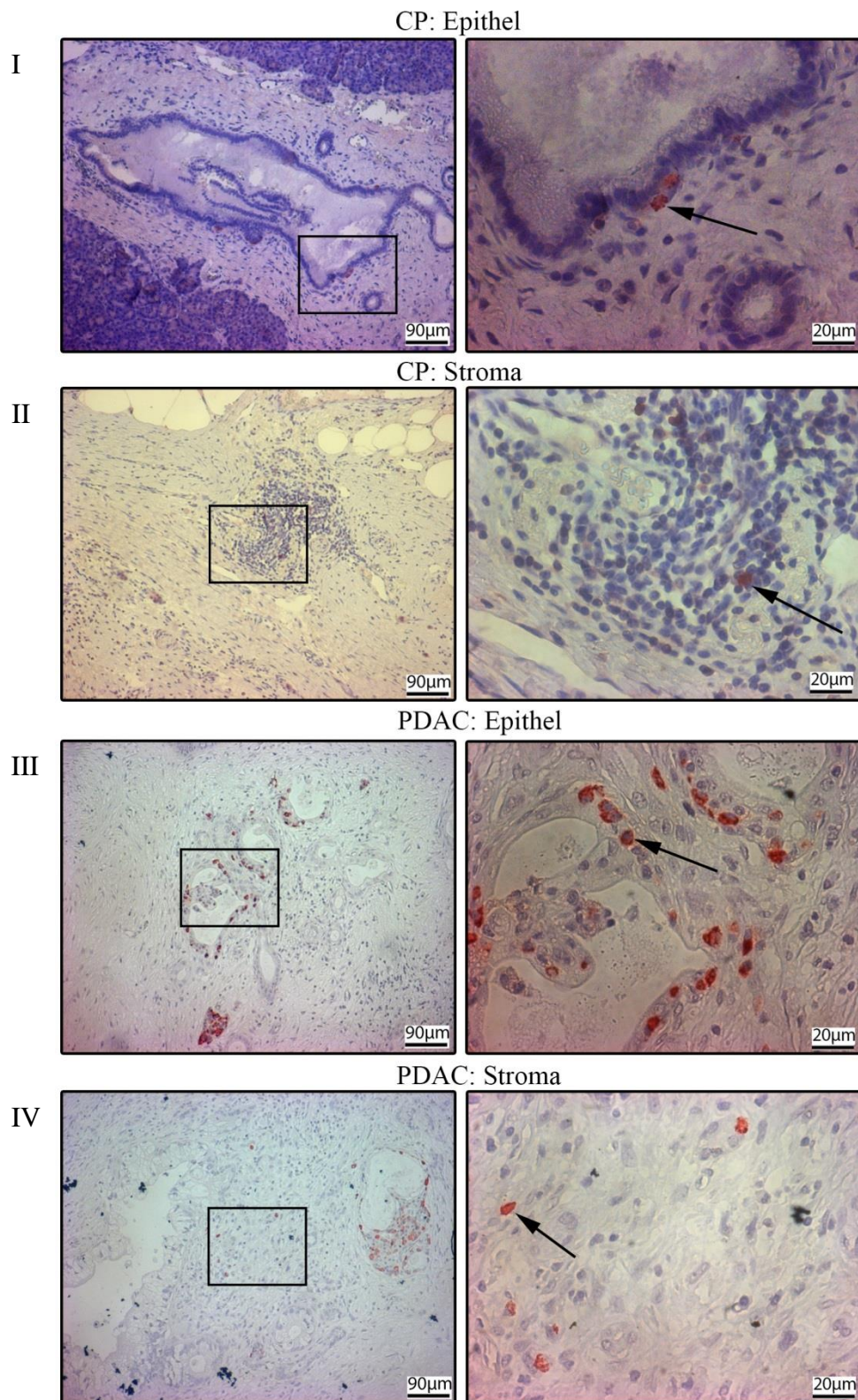


Abb. 8: Vergleich von $\gamma\delta$ -T-Zellen im CP- und PDAC-Gewebe. Gezeigt ist die Verteilung der $\gamma\delta$ -T-Zellen in Paraffinschnitten von CP-Präparaten im Epithel (I) und Stroma (II) sowie die Verteilung im PDAC-Präparaten im Epithel (III) und Stroma (IV). Die Graphiken auf der rechten Seite zeigen die entsprechende Ausschnittsvergrößerung, die mit einem Quadrat in den Graphiken der linken Seite gekennzeichnet ist.

4.4 Vergleich von T-Zellen im Stroma und Gangepithelien in CP- und PDAC-Präparaten

Die Verteilung bzw. Lokalisation von $\gamma\delta$ -T-Zellen und weiteren Oberflächenmolekülen (CD3, CD4, CD8) wurde, wie zum Teil in Abb. 7 und für alle Spender in Tabelle Nr. 8 gezeigt, im Stroma bzw. im Gangepithel in 42 PDAC-Präparaten im Vergleich zu 15 CP-Präparaten bestimmt. Im Stroma waren $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wesentlich häufiger in CP-Präparaten im Vergleich zum PDAC zu finden (Tabelle Nr. 8). Des Weiteren wurden im Stroma $\gamma\delta$ -T-Zellen häufiger in CP- (12/15, 80% der Präparate, *Score* 1) als in PDAC-Präparaten (21/42, 50% der Präparate, *Score* 1) gesehen. $\gamma\delta$ -T-Zellen, die benachbart oder innerhalb zu dem Gangepithel zu sehen waren, wurden auch häufiger in CP- (10/15, 67% der Präparate) als in PDAC-Präparaten (18/42, 43% der Präparate) detektiert. Allerdings war die Dichte der $\gamma\delta$ -T-Zellen stärker in PDAC- als in CP-Präparaten ausgeprägt. Die Ergebnisse zeigten Unterschiede zwischen dem Stroma der CP- und PDAC-Präparaten. Das desmoplastische Stroma von PDAC beinhaltet eine geringere Anzahl von $CD8^+$ und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass das Stroma sich grundlegenden Änderungen während der Progression von CP zum PDAC unterzieht.

Tabelle Nr. 8: Vergleich von Stroma verwandten Parametern im Pankreasgewebe von CP- und PDAC-Patienten

Variablen	CP (n=15)	PDAC (n=42)	P-Wert
Stroma	Zahl der Fälle (<i>Score</i>)	Zahl der Fälle (<i>Score</i>)	
CD3 ⁺ / Stroma	0 (1) 10 (2) 5 (3)	5 (1) 33 (2) 4 (3)	0.051
CD8 ⁺ / Stroma	1 (1) 13 (2) *	13 (1) 29 (2)	0.151
CD4 ⁺ / Stroma	1 (1) 14 (2)	21 (1) 21 (2)	< 0.01
$\gamma\delta$ -T-Z/ Stroma	3 (0) 12 (1)	21 (0) 21 (1)	0.067
$\gamma\delta$ -T-Z/ In Gangnähe	5 (0) 10 (1)	24 (0) 18 (1)	0.141

Scoring-System: für $\gamma\delta$ -T-Zellen (*Score* 0 $\hat{=}$ keine $\gamma\delta$ -T-Zellen, *Score* 1 $\hat{=}$ weniger als 1% $\gamma\delta$ -T-Zellen); für CD3-, CD8-, CD4-T-Zellen (*Score* 1 $\hat{=}$ 1-10% positive Zellen in Bezug auf das Stroma des Schnittes, *Score* 2 $\hat{=}$ 11-50% positive Zellen, *Score* 3 $\hat{=}$ 51-90% positive Zellen). Der *Score* ist in Klammern angezeigt.

*Ein Präparat war nicht auswertbar.

P-Wert: Vergleich zwischen Gruppen (Gruppe 1: CP, Gruppe 2: PDAC) mit Chi-Quadrat-Test mittels SPSS.

4.5 Korrelation von T-Zellen im Stroma von CP-Gewebe

Tabelle Nr. 9 zeigt die statistische Betrachtung einer möglichen Korrelation der T-Zellen von CP-Präparaten. Die folgende Korrelation war am auffälligsten: eine niedrige Anzahl (*Score 2* bei 10 Fällen, *Score 3* bei 4 Fällen) der $CD3^+$ T-Zellen (A) wurde mit einer Dominanz von $CD4^+$ T-Zellen über $CD8^+$ T-Zellen (D) assoziiert. Abb. 9 verdeutlicht die Dominanz von $CD4^+$ T-Zellen über $CD8^+$ T-Zellen bei einer niedriger Anzahl (*Score 2*) der T-Zellen. Bei einer höheren Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen überwiegt der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen.

Tabelle Nr. 9: Assoziation der T-Zellen im Stroma von CP-Gewebe

Variablen	Code	A	B	C	D
CD3+/Stroma	A	X	ns	ns	0.015
CD8+/Stroma	B		X	ns	ns
CD4+/Stroma	C			X	ns
CD4+: CD8+ Verhältnis	D				X

ns: nicht signifikant; P-Werte wurden mit dem Chi-Quadrat Test mittels SPSS bestimmt

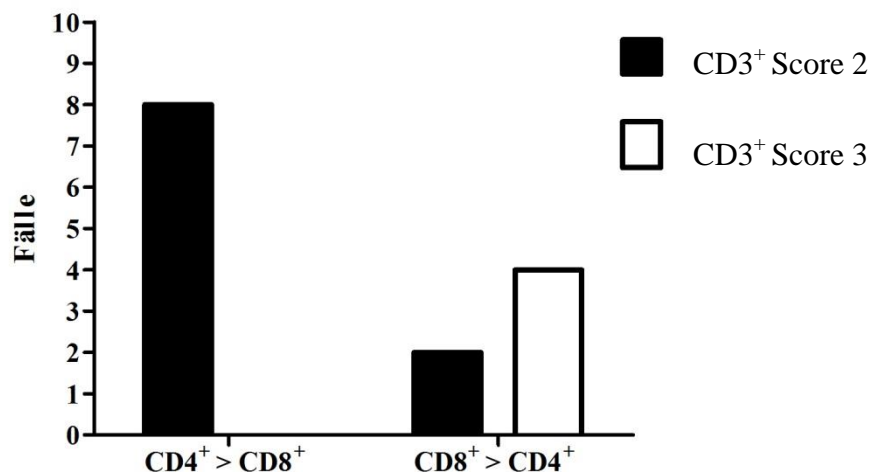


Abb. 9: Grafische Darstellung der Assoziation von $CD3^+$ T-Zellen zum $CD4/CD8$ Verhältnis. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Fälle ($n = 14$) von CP-Präparaten, in denen die $CD4/CD8$ Verhältnisse $CD4 > CD8$ und $CD8 > CD4$ bei einer niedrigen Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen (schwarzer Balken, *Score 2*, $n = 10$) und einer hohen Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen (weißer Balken, *Score 3*, $n = 4$) betrachtet werden.

4.6 Korrelation von T-Zellen im Stroma von PDAC-Gewebe

In der Tabelle Nr. 10 wurde verglichen, ob die T-Zellen im Stroma der PDAC-Präparate mit einander korrelieren.

Folgende Assoziationen waren signifikant:

1. Eine hohe Anzahl der CD3⁺ T-Zellen (A) mit einer hohen Anzahl an CD8⁺ T-Zellen (B) (Abb. 10)
2. Eine hohe Anzahl der CD3⁺ T-Zellen (A) mit den CD4⁺ T-Zellen (C) (Abb. 11)
3. *Score 2* der CD3⁺ T-Zellen (A) mit einer Dominanz der CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen (D) (Abb. 12)
4. Eine niedrige Anzahl der CD4⁺ T-Zellen (C) (*Score 1*) mit einer Dominanz der CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen (D) (Abb. 13)

Tabelle Nr. 10: Assoziation der T-Zellen im Stroma von PDAC-Gewebe

Variablen	Code	A	B	C	D
CD3+/Stroma	A	X	<0.01	0.011	0.028
CD8+/Stroma	B		X	ns	ns
CD4+/Stroma	C			X	<0.01
CD4+: CD8+ Verhältnis	D				X

ns: nicht signifikant; P-Werte wurden mit dem Chi-Quadrat Test mittels SPSS bestimmt

Eine hohe Anzahl der CD3⁺ T-Zellen (*Score 2* und *3*) korrelierte mit einer hohen Anzahl an CD8⁺ T-Zellen (*Score 2*) (Abb. 10).

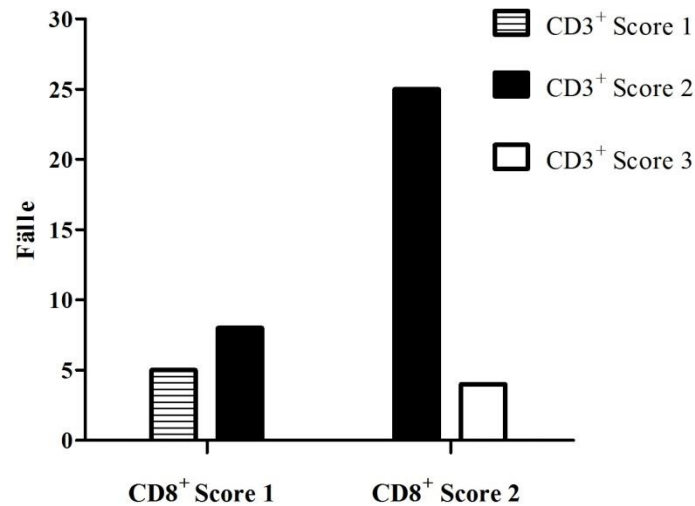


Abb. 10: Grafische Darstellung der Assoziation von CD3⁺ T-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen im Stroma. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Fälle ($n = 42$) von PDAC-Präparaten, in denen die Assoziation von CD8⁺ T-Zellen (*Score 1* und *2*) zu CD3⁺ T-Zellen (*Score 1*: schraffierter Balken; *Score 2*: schwarzer Balken; *Score 3*: weißer Balken) dargestellt ist.

CD3⁺ T-Zellen (*Score 2*) korrelierten mit den CD4⁺ T-Zellen (*Score 1* und *2*) (Abb. 11).

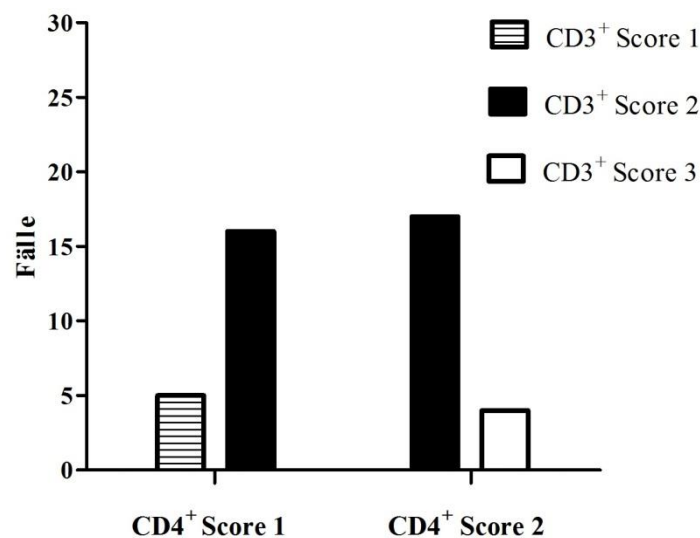


Abb. 11: Grafische Darstellung der Assoziation von CD3⁺ T-Zellen zu CD4⁺ T-Zellen im Stroma. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Fälle ($n = 42$) von PDAC-Präparaten, in denen die Assoziation von CD4⁺ T-Zellen (*Score 1* und *2*) zu CD3⁺ T-Zellen (*Score 1*: schraffierter Balken; *Score 2*: schwarzer Balken; *Score 3*: weißer Balken) dargestellt ist.

Score 2 der CD3⁺ T-Zellen korreliert mit der Dominanz der CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen (Abb. 12).

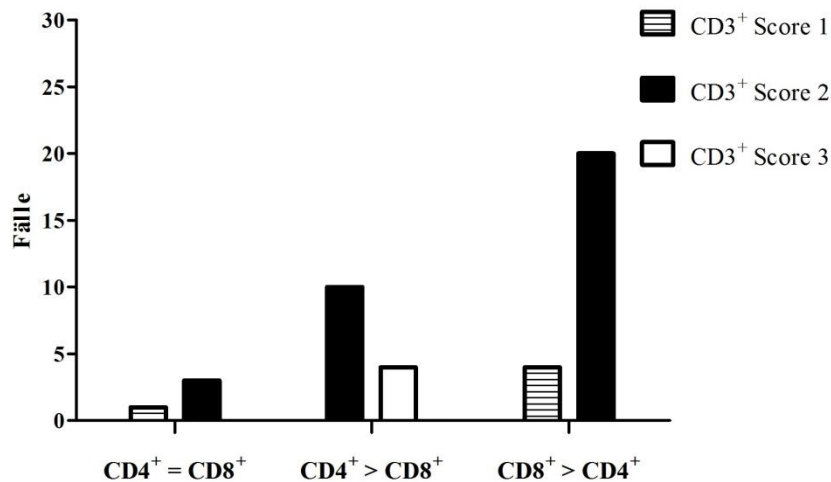


Abb. 12: Grafische Darstellung der Assoziation von CD3⁺ T-Zellen zum CD4/CD8 Verhältnis. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Fälle (n = 42) von PDAC-Präparaten, in denen die Assoziation von CD4/CD8 Verhältnis (CD4 = CD8, CD4 > CD8 und CD8 > CD4) zu CD3⁺ T-Zellen (Score 1: schraffierter Balken; Score 2: schwarzer Balken; Score 3: weißer Balken) dargestellt ist.

Eine niedrige Anzahl der CD4⁺ T-Zellen (Score 1) korreliert mit der Dominanz der CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen (Abb. 13).

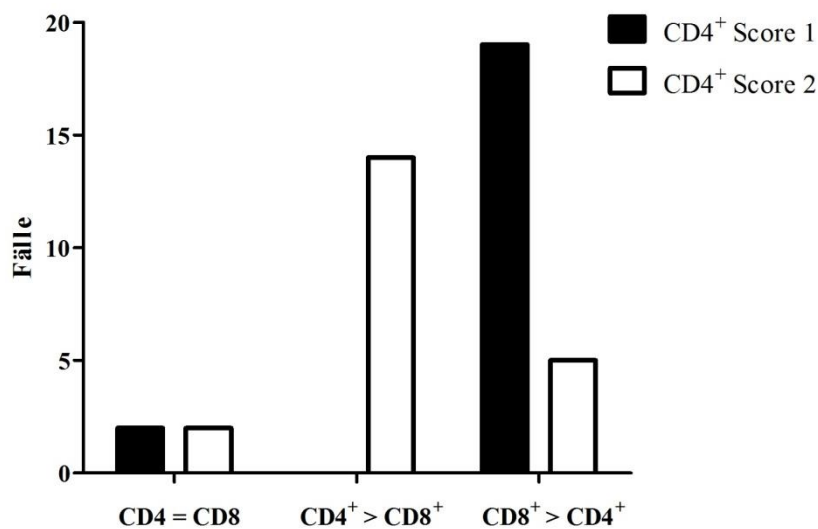


Abb. 13: Grafische Darstellung der Assoziation von CD4⁺ T-Zellen zum CD4/CD8 Verhältnis. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Fälle (n = 42) von PDAC-Präparaten, in denen die Assoziation von CD4/CD8 Verhältnis (CD4 = CD8, CD4 > CD8 und CD8 > CD4) zu CD4⁺ T-Zellen (Score 1: schwarzer Balken; Score 2: weißer Balken) dargestellt ist.

4.7 Korrelation von T-Zellmarkern im PDAC-Gewebe unter Berücksichtigung des Tumor-Gradings

Um zu klären, ob die Enddifferenzierung von Tumorzellen mit Veränderungen der untersuchten T-Zellen im Stroma assoziiert ist, wurde das Stroma in CP- und PDAC-Geweben unter Berücksichtigung des *Gradings* beim PDAC verglichen. Gut differenzierte (G1) Tumore unterschieden sich signifikant von CP-Gewebe nur in der Zahl von $CD4^+$ T-Zellen, die im PDAC-Gewebe weniger vorkamen. Die Zahl der $CD8^+$ T-Zellen war in schlecht differenzierten (G3) Tumoren wesentlich reduziert, jedoch nicht in gut (G1) und mäßig (G2) differenzierten Tumoren. Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass nicht nur das Tumor-Epithel, sondern auch die T-Zellen im Stroma in gut differenzierten (G1) PDAC-Gewebe mehr Ähnlichkeiten zu CP-Gewebe besitzen als in mäßig (G2) oder schlecht differenziertem (G3) Tumorgewebe (Daten nicht gezeigt).

4.8 Korrelation von T-Zellen im PDAC-Gewebe mit dem Überleben

Schließlich wurde die Beziehung zwischen T-Zellen im Stroma von PDAC-Gewebe und dem Überleben der Patienten untersucht. Eine höhere Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen in PDAC-Präparaten korrelierte mit einem längeren Überleben der Patienten (Abb. 14). Ferner korrelierte ein höheres Alter zum Zeitpunkt der Diagnose/Operation mit einer deutlich kürzeren Überlebenszeit.

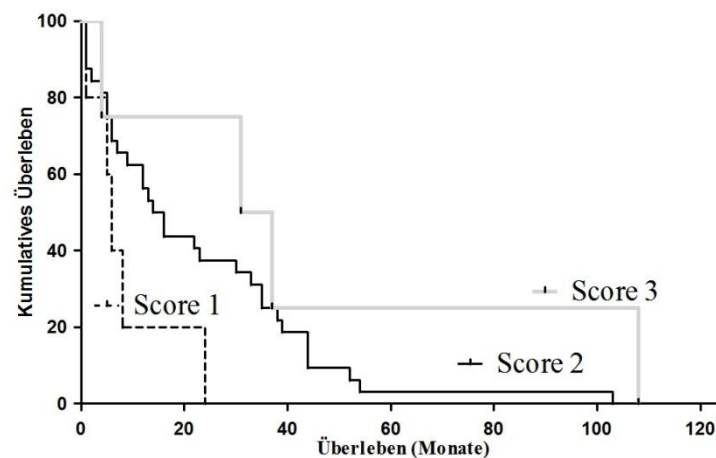


Abb. 14: Korrelation zwischen $CD3^+$ T-Zellen und Überleben in PDAC. Die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zeigt die Korrelation der Anzahl von $CD3^+$ T-Zellen mit dem Überleben der Patienten. Dabei galt folgendes *Scoring*-System (1 $\hat{=}$ 1-10% positive $CD3^+$ Zellen in Bezug auf das Stroma, 2 $\hat{=}$ 11-50% $CD3^+$ Zellen, 3 $\hat{=}$ 51-90% $CD3^+$ Zellen).

4.9 HER-2/neu Expression in CP- und PDAC-Gewebe

Für den möglichen Einsatz bispezifischer Antikörper, welche selektiv an Tumorantigene wie HER-2/neu und an T-Zellen binden können, war es wichtig zu überprüfen, ob PDAC Zellen HER-2/neu exprimieren und ob HER-2/neu bereits unter entzündlichen Bedingungen in verstärktem Ausmaß im pankreatischen Gangepithel nachzuweisen ist. Bei der Auswertung von 15 CP- und 42 PDAC-Präparaten bezüglich des Oberflächenmoleküls HER-2/neu war keine spezifische membranständige Expression zu sehen, wie exemplarisch für 2 PDAC-Präparaten in Abb. 15 gezeigt ist. Es zeigte sich nur eine unspezifische Färbung des Zytoplasmas von Gangepithel in den unterschiedlichen Abschnitten der Präparate beider Erkrankungen. Stichproben wurden gemeinsam mit Prof. Dr. med. Röcken (Direktor des Instituts für Pathologie, UKSH, Campus Kiel) begutachtet, woraufhin die Unspezifität der Färbung bestätigt wurde. Somit wurde die Expression von HER-2/neu für CP- und PDAC-Präparaten mit einem *Score* von 0 (keine positive Zellen) eingestuft. Für diese Färbungen wurde der HER2-/neu Antikörper Klon SP3 (von ThermoScientific mit einer 1:60 Verdünnung) verwendet.

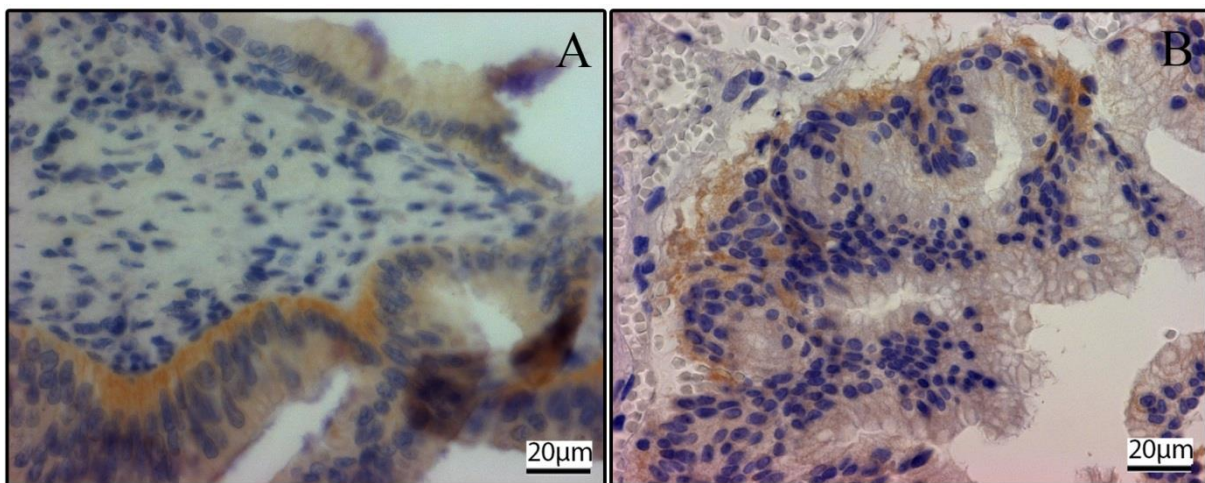


Abb. 15: Expression von HER-2/neu im PDAC-Gewebe. Färbung mit HER-2/neu Antikörper (Klon SP3). Gezeigt sind 2 exemplarische PDAC-Präparate (A und B). Man sieht Stroma und Gangepithel, wobei das Epithel stellenweise braun gefärbt ist.

5 Diskussion

Die Therapie des PDAC stellt eine große Herausforderung dar. Fehlende oder unspezifische Frühsymptome und ungenügende Vorsorgeuntersuchungen führen dazu, dass das PDAC meist erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert wird. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung hat das PDAC in den meisten Fällen bereits Gefäße und benachbarte Organe infiltriert und ist hämatogen metastasiert. Ein weiteres Problem in der Behandlung dieser Erkrankung liegt in der ausgeprägten Resistenz gegenüber einer Chemotherapie. Gemcitabin als Standardtherapie für das PDAC kann die Überlebensrate nur mäßig verlängern. Das PDAC besitzt zahlreiche Mechanismen, um sich der Chemotherapie zu entziehen und hat daher nach wie vor eine infauste Prognose (Schneider et al. 2005, Li et al. 2004). Die Bekämpfung dieser Widerstandsmechanismen stellt daher eine aussichtsreiche Strategie zur Verbesserung des therapeutischen Ansprechens des PDAC und damit eine Verbesserung der Prognose für die Patienten dar.

Eine Gen-Expressionsanalyse von 316 Genen (z.B. Gene des Wnt-Signalwegs: *SFRP1*, *WNT5a*) ergab bereits, dass sich das Stroma in CP deutlich von dem des PDAC unterscheidet (Pilarsky et al. 2008). Insgesamt hat die vorliegende Arbeit dazu beigetragen Unterschiede in der Stroma-Zusammensetzung von CP- und PDAC-Patienten zu detektieren. Im Einzelnen waren in den CP-Präparaten CD4⁺-, CD8⁺- und $\gamma\delta$ -T-Zellen häufiger zu finden als in den PDAC-Präparaten.

In seriellen Schnitten konnte gezeigt werden, dass die $\gamma\delta$ -T-Zellen in den gleichen Bereichen des Stromas und des Gangepithels beider Pankreaserkrankungen zu finden waren, wie auch CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Allerdings war die Dichte der $\gamma\delta$ -T-Zellen stärker in PDAC- als in CP-Präparaten ausgeprägt. Ferner sammelten sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen im PDAC-Gewebe stärker im Gangepithel und im Stroma in der Nähe des Gangepithels an, während sich die $\gamma\delta$ -T-Zellen im CP-Gewebe vor allem im Stroma und fern von Gangepithelien ansammelten. Die vermehrte Dichte und die Nähe zu Gangepithelien von $\gamma\delta$ -T-Zellen in PDAC im Unterschied zu CP könnte durch die Änderungen der Stroma-Zusammensetzung während der Progression zu einem invasiven PDAC erklärt werden. Die $\gamma\delta$ -T-Zell-Infiltration könnte durch die hohe Produktion des Chemokins CXCL12 von Karzinom-assoziierten Fibroblasten erklärt werden (Matsuo et al. 2009). Viey und Kollegen berichteten zuvor über eine CXCL12-vermittelte Regulation der $\gamma\delta$ -T-Zell-Migration zu Nierenkarzinomen (Viey et al. 2008). Unsere

Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass der spezifische CXCL12-Rezeptor CXCR4 sehr stark von $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert wird (Glatzel et al. 2002).

$\gamma\delta$ -T-Zellen von CP-Patienten waren eher in den lymphatischen Follikel zu finden, was auf eine Rekrutierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen an den Ort der Entzündung hindeutet. Bei PDAC-Patienten wurden die $\gamma\delta$ -T-Zellen dagegen eher in der Nähe des Tumors lokalisiert. Die Anwesenheit von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Nähe der Tumorzellen und deren Lokalisation innerhalb des malignen Gangepithels von PDAC zeigt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen das PDAC infiltrieren. Obwohl $\gamma\delta$ -T-Zellen eine niedrige Frequenz im peripheren Blut von PDAC-Patienten (Oberge et al. 2014) und in den untersuchten Geweben zeigten, akkumulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen im Tumor im Gangepithel in der Nähe zu Tumorzellen von PDAC-Patienten. Diese Ansammlung von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Tumor selbst unterstreicht eine potenzielle Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Immunantwort gegen das PDAC. Im Gegensatz zu dem duktalem Epithel wurden mehr $CD3^+$ $\gamma\delta$ -TZR-negative T-Zellen im Stroma der Patienten mit PDAC lokalisiert. Die Lokalisierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen, nicht aber von $\alpha\beta$ -T-Zellen neben oder in dem duktalem Epithel legt nahe, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität möglicherweise als erste Verteidigungslinie fungieren oder mögliche immunsuppressive Barrieren des Tumors überwinden. Während $\gamma\delta$ -T-Zellen in ihrer Migration durch die für PDAC charakteristische immunsuppressive desmoplastische Mikroumgebung anscheinend nicht eingeschränkt sind, ist eine Einschränkung ihrer funktionellen Aktivität auf Grund der schlechten Prognose nicht von der Hand zu weisen. Regulatorische T-Zellen und Myofibroblasten, die für ihre immunsuppressive Funktion auch bezüglich $\gamma\delta$ -T-Zellen bekannt sind (Farrow und Evers 2002), kommen entsprechend häufiger in PDAC als in CP vor (Helm et al. 2014).

Eines der charakteristischen Merkmale des PDAC ist das Vorhandensein eines dichten desmoplastischen Stromas, das aus mesenchymalen Zellen, wie Fibroblasten und pankreatischen Sternzellen sowie myeloiden Suppressorzellen (MDSC engl. *Myeloid derived suppressor cells*) oder suppressiven Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), besteht (Capietto et al. 2011a, Evans und Costello 2012, Ruffell et al. 2012). Vermutlich wird dadurch das Eindringen von zytotoxischen T-Lymphozyten in den Tumor durch das Stroma verhindert. Somit könnte eine effiziente Steigerung der zytotoxischen Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen die immunsuppressive Wirkung des Stromas möglicherweise überwinden (Oberge et al. 2014). Die Behandlung von Patienten mit PDAC mit Gemcitabin, die Standard-Therapie für das PDAC, kann myeloide Suppressorzellen inhibieren, indem die Kreuz-Präsentation der

Tumor-assoziierten Antigenen durch dendritische Zellen verbessert wird (Soeda et al. 2009, Suzuki et al. 2005). Der genaue Wirkmechanismus myeloider Suppressorzellen oder von Gemcitabin auf $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde noch nicht untersucht. Allerdings wurde häufig über Gemcitabin-Resistenzen sowie Rezidive auf Basis von Restbesiedlung durch Krebsstammzellen des PDAC berichtet (Sugarbaker et al. 2011, Wang et al. 2011). Somit ist die Bekämpfung der immunsuppressiven Tumorumgebung und der Tumor-Stammzellen eine vielversprechende Möglichkeit, um eine Chemotherapie-Resistenz von Patienten mit PDAC zu überwinden (Bednar and Simeone 2011, Liles et al. 2011). So wurde zum Beispiel eine erhöhte $\gamma\delta$ -T-Zell-Zytotoxizität nach der Behandlung mit anderen chemotherapeutischen Mitteln wie Etoposid, Cisplatin, Doxorubicin und Vincristin in Kombination mit Aminobisphosphonaten (z.B. Zoledronat und Pamidronat) bei Burkitt Lymphomzelllinien, Prostata-, Kolorektalen-, Brustadeno-, Lungen- und Harnblasenkarzinomzelllinien beschrieben (Matarollo et al. 2007). Es wurde gezeigt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen menschliche Darmkrebs-Stammzellen lysieren können, was einen zusätzlichen Vorteil für eine $\gamma\delta$ -T-Zell-basierte Immuntherapie bieten könnte (Todaro et al. 2009). Außerdem könnten Strategien zur Beseitigung oder Unterdrückung regulatorischer T-Zellen und Myofibroblasten von Vorteil sein. Das Tumorwachstum fördert die Expansion von $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen, die Immunreaktionen unterdrücken können und somit möglicherweise das Tumorüberleben fördern (Kunzmann et al. 2009). Es wurde eine erhöhte Zahl von regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen Karzinomen (multiples Myelom, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, metastasierendes Nierenzellkarzinom, metastatisches maligne Melanom, metastasiertes kolorektale Karzinom, metastasierendes Brustkarzinom) gefunden, welche die Effektorfunktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen inhibieren (Kunzmann et al. 2009). Unabhängig von der inhibitorischen Funktion von regulatorischen T-Zellen auf $\gamma\delta$ -T-Zellen, ist zur Ausübung der Effektorfunktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen deren repetitive Stimulation *in vivo* notwendig (Kabelitz et al. 2004, Kunzmann et al. 2009).

Eine repetitive Stimulation der $V\delta 2$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Phosphoantigene oder Aminobisphosphonate führt jedoch häufig zu einer Erschöpfung des $\gamma\delta$ -T-Zell-Pools, sodass neue oder modifizierte Stimulationsprotokolle erforderlich sind (Braza und Klein 2013). Das Kombinieren einer $\gamma\delta$ -T-Zell basierten Immuntherapie mit mAk bietet neuartige Perspektiven. Eine verbesserte Wirksamkeit gegen transplantierte, humane HER-2/neu⁺ Brustkrebszellen wurde nach dem adoptiven Transfer humaner *in vitro* expandierter $\gamma\delta$ -T-Zellen zusammen mit

dem humanisierten anti-HER-2/neu mAk (Trastuzumab) in SCID-Mäusen beschrieben (Capietto et al. 2011b). Eine Übersichtsarbeit fasste zusammen, dass die Kombination von $\gamma\delta$ -T-Zell basierten Immuntherapie mit mAk in der Regel ein erhebliches therapeutisches Potenzial für eine Vielzahl von Malignomen ausübt (Meraviglia et al. 2010a). Dabei zeigten Meraviglia und Kollegen ein erhebliches therapeutisches Potenzial für $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Behandlung von HER-2/neu-exprimierenden Brustkrebs sowie von B-Zell-Malignitäten durch Co-Applikation von therapeutischen mAk allein oder in Kombination mit Chemotherapie (Meraviglia et al. 2010b).

Das Design von bispezifischen Antikörpern (mit einer Spezifität für Tumorantigene und CD3 auf T-Zellen) induziert eine maximale Aktivierung von T-Zellen (Baeuerle et al. 2009). Bispezifische Antikörper zeigten im Vergleich zu mAk ein höheres zytolytisches Potenzial, eine höhere Spezifität und eine niedrigere Immunogenität aufgrund der reduzierten Anzahl an humanen anti-Maus Antikörpern (Glorius et al. 2013).

Trotz widersprüchlicher Resultate zur HER-2/neu Expression in PDAC Gewebeschnitten und eigener negativer Ergebnisse wurde zur Generierung eines bispezifischen Antikörpers anti-HER-2/neu verwendet. Eine deutliche Expression von HER-2/neu auf allen getesteten PDAC-Zelllinien veranlasste unsere Gruppe zu diesem Schritt. Es wurde der bispezifische Antikörper [(Her2)₂xV γ 9] mit einer Spezifität für HER-2/neu auf PDAC Zellen und für den V γ 9 TZR auf $\gamma\delta$ -T-Zellen entwickelt. *In vitro* Versuche zeigten, dass die zytotoxische Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen gegenüber PDAC durch [(Her2)₂xV γ 9] gesteigert werden konnte (Oberg et al. 2014). Ferner konnte auch *in vivo* eine Steigerung der Zytotoxizität von $\gamma\delta$ -T-Zellen festgestellt werden (Oberg et al. 2014). Hierfür wurden immundefiziente Mäuse, die mit PDAC Zellen subkutan inokuliert worden waren, anschließend repetitiv mit $\gamma\delta$ -T-Zellen in Kombination mit bispezifischen Antikörpern behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass bei PDAC tragenden Tieren nach Behandlung mit $\gamma\delta$ -T-Zellen und dem bispezifischen Antikörper [(Her2)₂xV γ 9] eine signifikante Tumorreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte (Oberg et al. 2014). Bispezifische Antikörper stellen somit ein Werkzeug dar, mit deren Hilfe die $\gamma\delta$ -T-Zell-Zytotoxizität *in vitro* als auch *in vivo* im Vergleich zu Phosphoantigenen bzw. Bisphosphonaten zusätzlich gesteigert werden kann.

Ein ausgeprägtes Stroma zeichnet CP und PDAC aus und ist wahrscheinlich für die Entstehung und Progression des PDAC verantwortlich (Farrow und Evers 2002, Kleeff et al. 2007, Protti und Monte 2013, Ino et al. 2013, Oberg et al. 2014). In dieser Arbeit wurden die

T-Zellen im Stroma von CP- und PDAC-Gewebe unter Berücksichtigung des Differenzierungsstatus (*Grading*) der Tumore verglichen. Obwohl in dieser Arbeit nur eine begrenzte Anzahl von Fällen untersucht wurde, lässt diese Analyse deutlich erahnen, dass gut differenzierte Tumore noch einige Gemeinsamkeiten mit CP-Gewebe haben, während mäßig oder schlecht differenzierten Tumoren sich signifikant von CP unterscheiden.

Experimentelle Nachweise *in vitro* und *in vivo* heben die Rolle von Stromazellen bei der Initiierung und Progression von PDAC hervor (Schäfer et al. 2012, Olive et al. 2009, Hartel et al. 2004, Mürköster et al. 2004). Eine große Anzahl von Stromazellen wie regulatorische T-Zellen, Makrophagen und Myofibroblasten wurden mit kurzem Überleben von PDAC-Patienten assoziiert (Kurahara et al. 2011, Kurahara et al. 2013, Hiraoka et al. 2006, Protti und Monte 2013, Ino et al. 2013). Jedoch wurden alle diese Studien mit einer heterogenen Patientenkohorte (T1 bis T4) durchgeführt. Im Gegensatz dazu versuchte die vorliegende Arbeit die prognostische Bedeutung der verschiedenen stromaassoziierten Variablen der PDAC-Patienten mit einem definierten, und zwar dem meist operiertem Stadium T3N1M0 zu untersuchen. Lediglich bei Patienten mit einem Alter unter 65 Jahre konnte zum Zeitpunkt der Operation ein signifikant längeres Überleben verzeichnet werden. Darüber hinaus korrelierte eine hohe Zahl der CD3⁺ T-Zellen mit einem verbesserten Überleben der Patienten. Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass keine der ermittelten Variablen ein geeigneter prognostischer Marker bei Patienten in diesem Stadium ist. Um diese Feststellung zu untermauern sind natürlich weitere Analysen von größeren Patientengruppen nötig. Man könnte spekulieren, dass die Bestimmung der Zusammensetzung des Stromas und die in dieser Arbeit erfassten T-Zellsubpopulationen gut für die Vorhersage einer therapeutischen Antwort geeignet sind, wie es z.B. für Brustkrebspatienten gezeigt wurde (DeNardo et al. 2011). In der Studie von DeNardo und Kollegen wurde gezeigt, dass die Blockade einer Makrophagen-Rekrutierung durch Antagonisten des Kolonie-stimulierenden-Faktor-1-Rezeptors (*CSF1R*) in Kombination mit einer Chemotherapie und eine dadurch verstärkte zytotoxische Kapazität von CD8⁺ T-Zellen (vermehrte Ausschüttung von Perforinen, Granzyme, Interferon- γ), das primäre Tumorwachstum, die Metastasen-Bildung signifikant verringerten und das Überleben von den Brustkrebs-tragenden Mäusen verbesserten (DeNardo et al. 2011). Man könnte z.B. bei PDAC-Patienten, bei denen $\gamma\delta$ -T-Zell Infiltration vorhanden ist, gezielt die $\gamma\delta$ -T-Zellen stimulieren und somit die Tumorlyse einleiten.

Der Erfolg einer $\gamma\delta$ -T-Zell basierten Immuntherapie erfordert jedoch ein profundes Wissen über die Zahl und Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen des Patienten. Unsere Arbeitsgruppe hat ein System etabliert, welches die Bestimmung der absoluten $\gamma\delta$ -T-Zellzahl in kleinen Volumina von heparinisiertem Vollblut erlaubt. Im Vergleich zu der absoluten Zellzahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blut von gesunden jungen Spendern waren V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit PDAC vermindert (Oberge et al. 2014). Mehrere Studien haben eine erniedrigte absolute Zellzahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit Karzinom beschrieben. Der exakte Vergleich mit altersgleichen gesunden Spendern zeigte jedoch, dass die absolute Zellzahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen aufgrund des Alters und nicht aufgrund der Krebserkrankung reduziert war (Oberge et al. 2014). Parallel zu der altersbedingten Abnahme der V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen konnte ein Anstieg von V δ 1- $\gamma\delta$ -T-Zellen bei älteren Spendern im Vergleich zu der jüngeren Kohorte beobachtet werden. V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen befinden sich hauptsächlich im Blut und V δ 1- $\gamma\delta$ -T-Zellen insbesondere in der Lunge, in der Haut und im Darm (Hinz et al. 1997, Kabelitz et al. 2005, Chiplunkar et al. 2009). Unsere Gewebeschnitte von CP- und PDAC-Patienten wurden mit einem pan- $\gamma\delta$ -T-Zell Antikörper gefärbt, d.h. es wurden alle $\gamma\delta$ -T-Zellen angefärbt. Interessant wäre die Unterscheidung von V δ 1- und V δ 2- $\gamma\delta$ -T-Zellen, um so aufzeigen zu können, welche Subpopulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen in PDAC infiltrieren. Bisher sind jedoch keine paraffin-gängigen anti-V δ 1- bzw. anti-V δ 2-mAk beschrieben.

Jeder betrachtete Schnitt bzw. jedes Präparat ist ein Unikat und nur bedingt mit weiteren Präparaten vergleichbar. Bei den Präparaten handelte es sich um serielle Schnitte. Der Unterschied der seriellen Schnitte zu einander lag von 3 μ m bis ca. 30 μ m, was bei der Betrachtung bzw. Auswertung der Zellverteilung und Präparat-Struktur einen großen Unterschied macht. Die definitive Feststellung der Verteilung von T-Lymphozyten und insbesondere der Bezug der unterschiedlichen Subpopulationen wie CD4, CD8 und $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einander war daher schwer definierbar. Obwohl die Präparate dreimal unabhängig voneinander beurteilt wurden und zum Schluss ein Mittelwert der ermittelten *Scores* errechnet wurde, handelt es sich um eine subjektive Auswertung und die Objektivität der Verteilung und der Bezug der T-Lymphozyten zueinander ist zu gering. Möglicherweise würde man bei einer erneuten Auswertung in einigen Präparaten abweichende *Scores* feststellen. Eine Steigerung der Objektivität könnte durch eine Computer gestützte Auswertung und eine gleichzeitige Färbung von CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- und $\gamma\delta$ -T-Zellen mit unterschiedlichen

Farbstoffen in einem Präparat erzielt werden. Dies wäre mit Fluoreszenzmikroskopie und unterschiedlichen Fluorochrom-Farbstoffen bei Kryoschnitt-Präparaten möglich.

Der genaue Wirkmechanismus von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist bei der Entstehung des PDAC noch nicht vollständig geklärt. Einige Autoren berichten sogar über die fördernde Wirkung von $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Entstehung von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien durch IL-17 Produktion (McAllister et al. 2014).

Die Expression des Wachstumsfaktorrezeptors HER-2/neu wurde in verschiedenen Tumorarten studiert, was zum Standard der therapeutischen Anwendung beim Brustkrebs führte. Kürzlich wurde die Kombination von Trastuzumab mit Chemotherapie als neue Standard-Option für Patienten mit HER-2/neu positivem fortgeschrittenem Magenkarzinom erwogen (Bang et al. 2010).

In vorliegender Doktorarbeit wurde zur immunhistochemischen Markierung von HER-2/neu der Klon SP3 verwendet, der in Ringversuchen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Röcken (Pathologie, UKSH, Campus Kiel) erfolgreich zur Mammakarzinom-Diagnostik verwendet wird (http://www.uni-kiel.de/path/public/files/QM/2011/2011_QuIP_HER2neu_Mamma_Immunhistochemie.pdf). Parallel zu den HER-2/neu Markierungen der seriellen Schnitte von PDAC-Gewebe wurden zur Qualitätssicherung der Immunfärbung Kontrollschnitte von Mammakarzinom-Gewebe durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Röcken angefertigt. Eine mögliche Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete negative Expression von HER-2/neu könnten Fixationsartefakte sein (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. med. Röcken). Methodische Probleme konnten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Röcken weitgehend ausgeschlossen werden. Eine weitere naheliegende Möglichkeit die fehlende HER-2/neu Expression zu erklären, kann das verwendete Spenderkollektiv sein. Es wurden ausschließlich PDAC-Patienten im Stadium T3N1M0 gefärbt. Im Vergleich zeigten nur die Stadien T1-3N0M0 des Magenadenokarzinoms eine HER-2/neu Expression (Jeung et al. 2012).

In der Literatur ist eine HER-2/neu Expression von 11-80% der PDAC-Gewebe beschrieben. 80% ist bei Betrachtung der Färbungen eher unwahrscheinlich, aber 11-45% wären denkbar (Harder et al. 2012, Yamanaka et al. 1993, persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. med. Röcken). Abgesehen davon wurde bei der Analyse von PDAC Zelllinien beobachtet, dass bei PancTu-I, Panc89, Colo357 Zelllinien HER-2/neu exprimiert wird (Oberg et al. 2014). Hierfür wurden allerdings Antikörper verwendet, die für die Durchflusszytometrie bzw. für

Westernblot, jedoch nicht für Immunhistochemische Färbungen geeignet sind. Ferner lieferten die Ergebnisse mit dem humanisierten Herceptin bzw. mit dem bispezifischen Antikörper [(Her2)₂xVγ9], welches als Zielantigen auf PDAC Zellen HER-2/neu erkennt *in vitro* und *in vivo* in immundefizienten Mäusen eindeutige Ergebnisse (Buechler et al. 2001, Buechler et al. 2005, Oberg et al. 2014).

Die Korrelation zwischen der manuellen immunhistochemischen Auswertung und Computergestützten automatischen Bildanalyse der HER-2/neu Expression ist bei Magentumoren 78% und bei Tumoren im gastroösophagealen Übergang 84% (Jeung et al. 2012). Diese Ergebnisse zeigen, dass automatische Bildanalysen bei gastroösophagealen Adenokarzinomen eine niedrige Korrelation zur manuellen Auswertung hat. Interessant wäre die automatische Bildanalyse bei PDAC-Präparaten durchzuführen und im Vergleich zu unseren Ergebnissen zu stellen. Die HER-2/neu immunhistochemische Färbung ist in gastroösophagealen Tumoren im Gegensatz zu Brustkrebs heterogen und zeichnet sich mit unvollständigen Membranfärbung aus (Jeung et al. 2012). Dieser Umstand könnte auch bei PDAC-Präparaten zutreffen. Aufgrund der histologischen und biologischen Unterschiede zwischen Brustkrebs und PDAC könnten PDAC-Präparate unterschiedliche HER-2/neu Immunreaktivitätsmuster in der lichtmikroskopischen immunhistochemischen Darstellung zeigen. Unsere Präparate offenbarten bezüglich der HER-2/neu Expression keine Membranfärbung. Jedoch konnte man in mehreren Präparaten eine unvollständige bzw. nur die basale Schicht betreffende Färbung sehen.

Eine weitere Ursache der nicht-membranständigen Anfärbung könnte auch sein, dass HER-2/neu im Rahmen des Antigen-*Shedding* sezerniert wird und daher nicht mehr membranständig vorliegt. Unter Antigen-*Shedding* wird das Abstoßen von Antigenen z.B. HER-2/neu verstanden (Arribas und Borroto 2002, Zhang und Pastan 2008). Beim Antigen-*Shedding* in Tumoren handelt es sich u.a. um einen *Immunescape*-Mechanismus.

Leider wurde bei der automatisierten Färbung im Rahmen unserer Untersuchungen ein anderer Antikörper als in der Harder et al. Publikation (Klon TAB250 Zymed) verwendet. Zugleich war das untersuchte Spenderkollektiv breiter (T1-4N0-1M1) (Harder et al. 2012) als in unseren Untersuchungen (T3N1M0).

Außerdem wurde von der Arbeitsgruppe von Harder und Kollegen keine weitere Analysen von anti-HER-2/neu Therapien bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom empfohlen, da die Kombination Trastuzumab und Capecitabin im Vergleich zu Capecitabin

alleine nicht in verbesserten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben resultierte (Harder et al. 2012). Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu überprüfen inwiefern Capecitabin in Kombination mit dem neu entwickelten bispezifischen Antikörper [(Her2)₂xVγ9] und einem adoptiven Transfer von $\gamma\delta$ -T-Zellen als Therapie für PDAC geeignet wäre.

Trotz der dringenden Notwendigkeit des verbesserten Verständnisses der möglichen immunsuppressiven Wirkung von Tumor-Mikroumgebung des Bauspeicheldrüsenkrebses auf $\gamma\delta$ -T-Zell-Effektor-Funktion, scheinen $\gamma\delta$ -T-Zellen ein vielversprechendes therapeutisches Werkzeug für die Behandlung von Patienten mit einem Pankreaskarzinom zu sein.

Zusammenfassend hat diese Arbeit klare quantitative und qualitative Unterschiede in dem Vorkommen von T-Zellen im Stroma bei CP- und PDAC-Patienten offenbart. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass sich das PDAC von der CP auf der Basis der untersuchten Parameter unterscheidet. Um die getesteten Parameter zuverlässig für eine Differenzierung zwischen CP und PDAC verwenden zu können, sind weitere Untersuchungen von mehreren Fällen sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Für die Mehrzahl der Patienten mit einem duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) besteht nach wie vor keine Aussicht auf eine Heilung. Dies ist maßgeblich bedingt durch das meist fortgeschrittene Krankheitsstadium bei Diagnosestellung sowie den intensiven Widerstand des Tumors gegenüber einer Chemotherapie. Charakteristisch für PDAC, aber auch für die chronische Pankreatitis (CP), die einen Risikofaktor für die Entstehung dieses Tumors darstellt, ist die starke desmoplastische Reaktion (Stroma). Ein Bestandteil des Stromas sind Immunzellen, deren Wirkung sowohl krankheitsfördernd als auch krankheitshemmend sein können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die spezifische immunhistochemische Färbung von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten etabliert und eine Infiltration von $\gamma\delta$ -T-Zellen im PDAC und bei der CP nachgewiesen. Gleichzeitig erfolgte die Quantifizierung von infiltrierenden $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T-Lymphozyten und die Auswertung der Expression des Wachstumsfaktorrezeptors HER-2/neu in beiden Pankreaserkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten wie auch $CD3^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten in den gleichen Bereichen des Stromas und des Gangepithels beider Pankreaserkrankungen zu finden waren. Allerdings war die Dichte der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten stärker im PDAC als in der CP ausgeprägt. Ferner sammelten sich die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im PDAC stärker im Gangepithel und im Stroma in der Nähe des Gangepithels an, während sie sich bei der CP vor allem im Stroma und fern von Gangepithelien ansammelten. Im Stroma waren $CD3^+$, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wesentlich häufiger in CP- im Vergleich zu PDAC-Gewebe zu finden. $CD8^+$ T-Zellen kamen im Verhältnis zu $CD4^+$ T-Zellen häufiger in PDAC- als in CP-Präparaten vor. Das Gegenteil galt für die $CD4^+$ T-Zellen, sie waren im Verhältnis zu $CD8^+$ T-Zellen häufiger in CP- als in PDAC-Präparaten zusehen. Bei der Auswertung der Expression bezüglich des Oberflächenmoleküls HER-2/neu (für Tumorzellen) war keine spezifische membranständige Expression zu sehen.

Diese Arbeit weist auf die Bedeutung von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten bei einer möglichen Tumorthherapie gegenüber PDAC hin. Die Anwesenheit von $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der Nähe der Tumorzellen und deren Lokalisation innerhalb des malignen Gangepithels von PDAC unterstreicht deren potenzielle Rolle bei der Immunantwort.

7 Literaturverzeichnis

- Andersen BN, Pedersen NT, Scheel J, Worning H. 1982. Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen. *Scand J Gastroenterol*; 17:247-252.
- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. 2012. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol*; 33:505-512.
- Arribas J, Borroto A. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev*; 102:4627-4638.
- Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R. 2009. BiTE: teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther*; 11:22-30.
- Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rueschoff J, Kang YK, ToGA Trial Investigators. 2010. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*; 376:687-697
- Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, Noppeney R, Viardot A, Hess G, Schuler M, Einsele H, Brandl C, Wolf A, Kirchinger P, Klappers P, Schmidt M, Riethmüller G, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kufer P. 2008. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell- engaging antibody. *Science*; 321:974-977.
- Bednar F, Simeone DM. 2011. Pancreatic cancer stem cell biology and its therapeutic implications. *J Gastroenterol*; 46:1345-1352.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*; 441:235-238.
- Braza MS, Klein B. 2013. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br J Haematol*; 160:123-132.
- Buechler P, Reber HA, Buechler MC, Roth MA, Buechler MW, Friess H, Isacoff WH, Hines OJ. 2001. Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti HER2 antibody (herceptin). *J Gastrointest Surg*; 5:139-146.
- Buechler P, Reber HA, Eibl G, Roth MA, Buechler MW, Friess H, Isacoff WH, Hines OJ. 2005. Combination therapy for advanced pancreatic cancer using Herceptin plus chemotherapy. *Int J Oncol*; 27:1125- 1130.
- Capietto AH, Martinet L, Fournie JJ. 2011a. How tumors might withstand $\gamma\delta$ T-cell attack. *Cell Mol Life Sci*; 68:2433-2442.
- Capietto AH, Martinet L, Fournie JJ. 2011b. Stimulated $\gamma\delta$ T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. *J Immunol*; 187:1031-1038.
- Chien YH, Bonneville M. 2006. $\gamma\delta$ T cell receptors. *Cell Mol Life Sci*; 63:2089-2094.
- Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, Kabelitz D. 2009. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy*; 1:663-678
- Connolly DJ, O'Neill LA. 2012. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*; 12:510-518.

- Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. 1998. Ligand recognition by $\alpha\beta$ T cell receptors. *Annu Rev Immunol*; 16:523-544.
- DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhvani N, Keil SD, Junaid SA, Rugo HS, Hwang ES, Jirstrom K, West BL, Coussens LM. 2011. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*; 1:54-67.
- Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournié JJ, Krensky AM, Bonneville M, Peyrat MA, Caccamo N, Sireci G, Salerno A. 2001. Ranulytin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *J Infect Dis*; 184:1082-1085.
- Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, Roberts A, Buccheri S, D'Asaro M, Gebbia N, Salerno A, Eberl M, Hayday AC. 2007. Targeting human $\gamma\delta$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*; 67:7450-7457.
- Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas AK, Wiesner J, Jomaa H. 2003. Microbial isoprenoid biosynthesis and human $\gamma\delta$ T cell activation. *FEBS Lett*; 544:4-10.
- Etemad B, Whitcomb DC. 2001. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification and new genetic developments. *Gastroenterology*; 120:682-707.
- Evans A, Costello E. 2012. The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion. *Front Physiol*; 3:270.
- Farrow B, Evers BM. 2002. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol*; 10:153-169.
- Gao GF, Jakobsen BK. 2000. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today*; 21:630-636.
- Gao GF, Rao Z, Bell JI. 2002. Molecular coordination of $\alpha\beta$ T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol*; 23:408-413.
- Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D. 2002. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood $\gamma\delta$ T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V δ 2/V γ 9 $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol*; 168:4920-4929.
- Glorius P, Baerenwaldt A, Kellner C, Staudinger M, Dechant M, Stauch M, Beurskens FJ, Parren PW, Winkel JG, Valerius T, Humpe A, Repp R, Gramatzki M, Nimmerjahn F, Peipp M. 2013. The novel tribody [(CD20)(2)xCD16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of malignant B cells. *Leukemia*; 27:190-201.
- Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenö P, Mori L, De Libero G. 2003. Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med*; 197:163-168.
- Harder J, Ihorst G, Heinemann V, Hofheinz R, Moehler M, Buechler P, Kloeppe G, Röcken C, Bitzer M, Boeck S, Endlicher E, Reinacher-Schick A, Schmoor C, Geissler M. 2012. Multicentre phase II trial of trastuzumab and capecitabine in patients with HER2 overexpressing metastatic pancreatic cancer. *Br J Cancer*; 106:1033-1038.
- Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, Peigné CM, Mönkkönen H, Mönkkönen J, Li J, Kuball J, Adams EJ, Netzer S, Déchanet-Merville J, Léger A, Herrmann T, Breathnach R, Olive D, Bonneville M, Scotet E. 2012. Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*; 120:2269-2279.
- Hartel M, Di Mola FF, Gardini A, Zimmermann A, Di Sebastiano P, Guweidhi A, Innocenti P, Giese T, Giese N, Büchler MW, Friess H. 2004. Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg*; 28:818-825.

- Hayday AC. 2000. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*; 18:975-1026.
- Helm O, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg HH, Wesch D, Sebens S. 2014. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*; 9:e94357.
- Himoudi N, Morgenstern DA, Yan M, Vernay B, Saraiva L, Wu Y, Cohen CJ, Gustafsson K, Anderson J. 2012. Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J Immunol*; 188:1708-1716.
- Hintz M, Reichenberg A, Altincicek B, Bahr U, Gschwind RM, Kollas AK, Beck E, Wiesner J, Eberl M, Jomaa H. 2001. Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*; 509:317-322.
- Hinz T, Wesch D, Halary F, Marx S, Choudhary A, Arden B, Janssen O, Bonneville M, Kabelitz D. 1997. Identification of the complete expressed human T-cell receptor V repertoire by flow cytometry. *Int Immunol*; 9:1065-1072.
- Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*; 12:5423-5434.
- Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. 2013. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer*; 108:914-923.
- Jeung J, Patel R, Vila L, Wakefield D, Liu C. 2012. Quantitation of HER2/neu expression in primary gastroesophageal adenocarcinomas using conventional light microscopy and quantitative image analysis. *Arch Pathol Lab Med*; 136:610-617.
- Kabelitz D, Marischen L, Oberg HH, Holtmeier W, Wesch D. 2005. Epithelial defence by $\gamma\delta$ T cells. *Int Arch Allergy Immunol*; 137:73-81.
- Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M. 2004. Characterization of tumor reactivity of human V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T cells in vitro and in SCID mice *in vivo*. *J Immunol*; 173:6767-6776.
- Kabelitz D. 2012. CD277 takes the lead in human $\gamma\delta$ T-cell activation. *Blood*; 120:2159-2161.
- Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Löhr JM, Friess H. 2007. Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer*; 121:699-705.
- Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, Gökbuget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A, Stelljes M, Brüggemann M, Hoelzer D, Degenhard E, Nagorsen D, Baeuerle PA, Wolf A, Kufer P. 2012. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood*; 119:6226-6233.
- Kunzmann V, Kimmel B, Herrmann T, Einsele H, Wilhelm M. 2009. Inhibition of phosphoantigen-mediated $\gamma\delta$ T-cell proliferation by CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells. *Immunology*; 126:256-267.
- Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S. 2011. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*; 167:e211-219.
- Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S. 2013. M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration of regional lymph nodes is associated with nodal lymphangiogenesis and occult nodal involvement in pN0 pancreatic cancer. *Pancreas*; 42:155-159.

- Lankisch PG. 2001. Natural course of chronic pancreatitis. *Pancreatology*; 1:3-14.
- Lévy P, Barthet M, Mollard BR, Amouretti M, Marion-Audibert AM, Dyard F. 2006. Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroenterol Clin Biol*; 30:838-844.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. 2004. Pancreatic cancer. *Lancet*; 363:1049-1057.
- Liles JS, Arnoletti JP, Kossenkov AV, Mikhaylina A, Frost AR, Kulesza P, Heslin MJ, Frolov A. 2011. Targeting ErbB3-mediated stromal-epithelial interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*; 105:523-533.
- Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Tong Z, Guha S. 2009. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer*; 124:853-861.
- Mattarollo SR, Kenna T, Nieda M, Nicol AJ. 2007. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother*; 56:1285-1297.
- McAllister F, Bailey JM, Alsina J, Nirschl CJ, Sharma R, Fan H, Rattigan Y, Roeser JC, Lankapalli RH, Zhang H, Jaffee EM, Drake CG, Housseau F, Maitra A, Kolls JK, Sears CL, Pardoll DM, Leach SD. 2014. Oncogenic Kras activates a hematopoietic-to-epithelial IL-17 signaling axis in preinvasive pancreatic neoplasia. *Cancer Cell*; 25:621-637.
- Meraviglia S, Caccamo N, Guggino G, Tolomeo M, Siragusa S, Stassi G, Dieli F. 2010a. Optimizing tumor-reactive $\gamma\delta$ T cells for antibody-based cancer immunotherapy. *Curr Mol Med*; 10:719-726.
- Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, Todaro M, Buccheri S, Cicero G, La Mendola C, Guggino G, D'Asaro M, Orlando V, Scarpa F, Roberts A, Caccamo N, Stassi G, Dieli F, Hayday AC. 2010b. In vivo manipulation of V γ 9V δ 2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*; 161:290-297.
- Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. 2004. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1 β . *Cancer Res*; 64:1331-1337.
- Nagorsen D, Kufer P, Baeuerle PA, Bargou R. 2012. Blinatumomab: a historical perspective. *Pharmacol Ther*; 136:334-342.
- Neves PC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, de Santana MG, Mudd PA, Martins MA, Rakasz EG, Wilson NA, Watkins DI. 2010. CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+ T cells produce IFN- γ at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*; 28:8183-8188.
- Oberg HH, Peipp M, Kellner C, Sebens S, Krause S, Petrick D, Adam-Klages S, Röcken C, Becker T, Vogel I, Weisner D, Freitag-Wolf S, Gramatzki M, Kabelitz D, Wesch D. 2014. Novel bispecific antibodies increase $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Res*; 74:1349-1360.
- Okabe Y, Medzhitov R. 2014. How the immune system spots tumors. *Elife*; 3. doi: 10.7554/eLife.04476.
- Olayioye MA. 2001. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*; 3:385-389.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-

- Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*; 324:1457-1461.
- Pilarsky C1, Ammerpohl O, Sipos B, Dahl E, Hartmann A, Wellmann A, Braunschweig T, Löhr M, Jesenofsky R, Friess H, Wente MN, Kristiansen G, Jahnke B, Denz A, Rückert F, Schackert HK, Klöppel G, Kalthoff H, Saeger HD, Grützmann R. 2008. Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling. *J Cell Mol Med*; 12:2823-2835.
- Protti MP, De Monte L. 2013. Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients. *Front Physiol*; 4:210.
- Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. 2010. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 24:349-358.
- Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. 2006. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*; 12:6222-6230.
- Romagnani, S. 1992. Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int. Arch. Allergy Immunol*; 98:279-285.
- Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol*; 24:419-466.
- Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. 2012. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*; 33:119-126.
- Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts J-H, Korniienko O, Kiefel H, Moldenhauer G, Bachem MG, Kalthoff H, Altevogt P, Sebens S. 2012. Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. *Carcinogenesis*; 33:84-93.
- Schneider A, Löhr JM, Singer MV. 2007. The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *J Gastroenterol*; 42:101-119.
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM. 2005. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*; 128:1606-1625.
- Shojaei H, Oberg HH, Juricke M, Marischen L, Kunz M, Mundhenke C, Gieseler F, Kabelitz D, Wesch D. 2009. Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res*; 69:8710-8717.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2012. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*; 62:10-29.
- Simon P, Mayerle J, Weiss FU, Schnekenburger J, Domschke W, Lerch MM. 2001. Chronische Pankreatitis: Pathogenese, molekulare Pathophysiologie und genetische Veränderungen. *Chir Gastroenterol*; 17:278-281.
- Soeda A, Morita-Hoshi Y, Makiyama H, Morizane C, Ueno H, Ikeda M, Okusaka T, Yamagata S, Takahashi N, Hyodo I, Takaue Y, Heike Y. 2009. Regular dose of gemcitabine induces an increase in CD14+ monocytes and CD11c+ dendritic cells in patients with advanced pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol*; 39:797-806.
- Sugraker PH, Stuart OA, Bijelic L. 2011. Intraperitoneal gemcitabine chemotherapy treatment for patients with resected pancreatic cancer: rationale and report of early data. *Int J Surg Oncol*; 2011:161862.
- Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. 2005. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*; 11:6713-6721.

- Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, Meraviglia S, Orlando V, La Mendola C, Gulotta G, Salerno A, Dieli F, Stassi G. 2009. Efficient killing of human colon cancer stem cells by $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Immunol*; 182:7287–7296.
- Tsiambas E, Karameris A, Dervenis C, Lazaris AC, Giannakou N, Gerontopoulos K, Patsouris E. 2006. HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis. *JOP. J Pancreas (Online)*; 7:283-294.
- Viey E, Lucas C, Romagne F, Escudier B, Chouaib S, Caignard A. 2008. Chemokine receptors expression and migration potential of tumorinfiltrating and peripheral-expanded V γ 9V δ 2 T cells from renal cell carcinoma patients. *J Immunother*; 31:313–323.
- Waldmann TA. 2003. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*; 9:269-277.
- Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, Sarkar FH. 2011. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 8:27–33.
- Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. 2011. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci*; 68:2357-2370.
- Wrobel P, Shojaei H, Schittek B, Gieseler F, Wollenberg B, Kalthoff H, Kabelitz D, Wesch D. 2007. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human $\gamma\delta$ T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor-versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol*; 66:320-328.
- Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Büchler M, Kunz J, Beger HG, Korc M. 1993. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol*; 24(10):1127-1134.
- Zamoyska, R. 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr. Opin. Immunol*; 10:82-87.
- Zeitlmann L, Sirim P, Kremmer E, Kolanus W. 2001. Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4. *J Biol Chem*; 276:9123-9132.
- Zhang Y, Pastan I. 2008. High shed antigen levels within tumors: an additional barrier to immunoconjugate therapy. *Clin Cancer Res*; 14:7981-7986.

8 Publikationsliste

Oberg HH, Peipp M, Kellner C, Sebens S, Krause S, **Petric D**, Adam-Klages S, Röcken C, Becker T, Vogel I, Weisner D, Freitag-Wolf S, Gramatzki M, Kabelitz D, Wesch D. 2014. Novel bispecific antibodies increase $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Cancer Res*; 74:1349-1360.

Helm H, Mennrich R, **Petric D**, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg HH, Wesch D, Sebens S. 2014. Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*; 9:e94357.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. rer. nat. Daniela Wesch. Für ihr stetiges Engagement, die Formulierung des Dissertationsthemas, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie für ihre bewundernswerte gute Betreuung, die hervorragende Arbeitsatmosphäre und ihr immer offenes Ohr bin ich ihr sehr dankbar.

PD Dr. sc. hum. Hans-Heinrich Oberg und Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens danke ich besonders für die Bereitstellung der benötigten Mittel zur Durchführung der Doktorarbeit und für die hervorragende Betreuung während der Anfertigung der Arbeit.

Für die Einführung in die immunhistochemische Auswertung danke ich Herrn Ruben Menrich. Ein besonderes Dankeswort gilt auch Maike Witt-Ramdohr für die Einweisung bei der immunhistochemischen Färbung.

Danke an Dr. Sandra Freitag-Wolf und Dr. Ole Helm für die Hilfe bei der Statistik.

Ein herzliches Dankeschön auch an Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer für die Nutzung des „Axioplan 2.0“ Mikroskop.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Dieter Kabelitz für die Bereitstellung der Räumlichkeiten. Gleichzeitig bedanke ich mich beim Prof. Dr. med. Christoph Röcken für die Unterstützung bei Auswertung. Danke an Sandra Krüger für die Anfertigung der Schnitte.

Meinen Eltern, Vilma Danguolė Dielininkaitytė und Robert Petrick, danke ich, dass sie mir das Leben ermöglicht haben. Auch meinen Großeltern Irena Kalnėnienė, Danutė Regina Šimkienė, Helmut Petrick, Gediminas Šimkus, meinen Schwestern Dorija Petrick, Martha Petrick und meinem Bruder Šarūnas Širvinskas danke ich an dieser Stelle ganz herzlich.

Herzlichen Dank an alle, die mein Medizinstudium ermöglicht haben: Es war nicht umsonst!

„No hay mejor momento para ser feliz que ahora mismo“ für Dich Debbie Vazquez Otiniano.

10 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name, Vorname: Petrick, Domantas
Geburtsdatum: 29.10.1987
Geburtsort: Klaipeda, Litauen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09 / 1994 – 07 / 2006 Hermann-Sudermann-Gymnasium in Klaipeda, Litauen

Studium

10 / 2006 – 04 / 2014 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
07 / 2014 Approbation als Arzt
04 / 2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08 / 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

08 / 2012 – 12 / 2012 Urologie, Kantonsspital Olten, Klinik für Urologie, Ausbildungs Krankenhaus der Universität Bern, Schweiz
12 / 2012 – 04 / 2013 Chirurgie, Klinik für Allgemeine Chirurgie, Gefäßchirurgie und Thorax Chirurgie, Helios-Klinik Schleswig, Akademisches Lehrkrankenhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
04 / 2013 – 07 / 2013 Innere Medizin, UKSH, Campus Kiel

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Kiel, den 01.12.2014

gez. Domantas Petrick