

Aus dem Institut für Experimentelle Medizin  
(Direktoriumssprecher: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Tholey)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Vergleichende Analyse von regulatorischen T-Zellen und der dukta-  
len Expression von FoxP3 und L1CAM in der chronischen Pankreatitis und dem  
dukta- len Pankreasadenokarzinom sowie deren Korrelation mit der  
Überlebenszeit**

**Inauguraldissertation**

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

vorgelegt von

**RUBEN MENNRICH**  
aus Lüneburg

Kiel  
2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Wesch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2016

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.07.2016

gez.: Prof. Dr. Hans-Jürgen Klomp

Teile dieser Arbeit wurden bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Helm O, **Mennrich R**, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schöfer H, Oberg H-H, Wesch D, Sebens S (2014) Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. PlosOne. 9(5):e94357

Grage-Griebenow E, Goebel L, Gorys A, Helm O, **Mennrich R**, Freitag-Wolf S, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S (2014) Regulatory T-cells and CD4+T-effector cells both mediate epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal epithelial cells. Oncol Res Treat 37(suppl1): 127

Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, **Mennrich R**, Freitag-Wolf S, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Wesch D, Kabelitz D, Sebens T, Schäfer H, Sebens S (2012) Das Adhäsionsmolekül L1CAM beeinflusst das Vorkommen regulatorischer T-Zellen im duktalem Pankreaskarzinom. Z Gastroenterol 50: 860

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das duktales Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.3	Symptomatik	1
1.1.4	Histopathologie und Stromazusammensetzung	2
1.1.5	Regulatorische T-Zellen	3
1.1.6	Pathogenese	5
1.1.7	Die chronische Pankreatitis als möglicher Ausgangspunkt des PDAC	6
1.1.8	Therapie	7
1.2	FoxP3 in epithelialen Geweben	9
1.3	Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM	10
1.4	Fragestellung der Arbeit	12
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>13</b>
2.1	Präparate und Bezugsquelle	13
2.2	Geräte	13
2.3	Software	14
2.4	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	14
2.5	Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen	15
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
3.1	Maschinelle Färbungen der Präparate	16
3.2	Manuelle Färbungen der Präparate	16
3.2.1	L1CAM	16
3.2.2	FoxP3	17
3.2.2.1	Etablierung der Färbemethode	17
3.2.2.2	Durchführung der Färbung	17
3.3	Bewertungsablauf der immunhistochemischen Färbungen	18
3.4	Orientierung in den Präparaten	18
3.5	Auswertung der Stroma-Färbungen	19
3.6	Auswertung der epithelialen Färbungen	20
3.7	Statistische Berechnungen	22
3.8	Schriftliches Verfassen und Bilder	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs	23
4.2	Ergebnisse der semiquantitativen Auswertungen	24

<b>4.3</b>	<b>Vergleich stromaler und duktaler/tumoraler Parameter zwischen CP und PDAC ...</b>	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>Vergleich der Ausprägung stromaler und epithelialer/tumoraler Parameter in CP und PDAC unter Berücksichtigung des Tumorgradings .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Interaktionen zwischen den stromalen und epithelialen/tumoralen Parametern .....</b>	<b>34</b>
4.5.1	Zusammenhang stromaler und epithelialer Parameter im CP-Gewebe .....	34
4.5.2	Zusammenhang stromaler und epithelialer/tumoraler Parameter im PDAC-Gewebe .....	35
<b>4.6</b>	<b>Einfluss der einzelnen Parameter auf die Überlebenszeit bei PDAC-Patienten .....</b>	<b>37</b>
<b>4.7</b>	<b>Einfluss der einzelnen Parameter auf das Überleben innerhalb von 24 Monaten .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>Anhang.....</b>		<b>54</b>
<b>I</b>	<b>Scores der mikroskopischen Auswertung (nach Dichotomisierung).....</b>	<b>54</b>
<b>II</b>	<b>Scores der mikroskopischen Auswertung (vor Dichotomisierung) .....</b>	<b>58</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>IV</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
<b>V</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>71</b>
<b>VI</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>72</b>
<b>VII</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>74</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) gehört mit knapp 16.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu den zehn häufigsten Krebsarten und stellt gleichzeitig die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache in Deutschland dar. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 8% bei den Männern und Frauen gehört das PDAC zu den Malignomen mit der negativsten Prognose.[1]

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Das PDAC ist mit über 90% die häufigste Form der exokrinen Pankreastumore und tritt insbesondere im höheren Lebensalter mit einem mittleren Erkrankungsgipfel zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr auf.[1, 2] Da Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr nur sehr selten vorkommen und gehäuft im Zusammenhang mit genetischen Faktoren stehen, gilt das fortgeschrittene Lebensalter als einer der wichtigsten Risikofaktoren.[3] Zusätzliche Risikofaktoren stellen ein langjähriger Tabakkonsum, ein krankhaft erhöhtes Körpergewicht (Adipositas) einhergehend mit einer lipidreichen Ernährung sowie ein chronischer Alkoholkonsum dar.[4]

Eine signifikante Erhöhung des Risikos ergibt sich sowohl beim Vorhandensein einer chronischen Bauchspeicheldrüsenentzündung als auch beim Diabetes mellitus.[5, 6] Zusätzlich belegen einzelne Studien eine gesteigerte Prävalenz bei Personen, deren Verwandte 1. Grades bereits an einem PDAC erkrankten.[7] Des Weiteren gibt es genetische Prädispositionen, an einem PDAC zu erkranken. Hierzu zählen insbesondere Patienten mit sogenannten tumorassoziierten genetischen Veränderungen, zu denen beispielsweise die familiären adenomatösen Polyposis (FAP), die hereditäre Pankreatitis, das hereditäre nicht-polipöse Kolonkarzinom (HNPCC) und das Preutz-Jeghers-Syndroms gehören.[8] Daneben erhöhen auch Keimbahnmutationen in den BRCA-1 - und BRCA-2 – Genen das Risiko der Entwicklung eines familiären PDAC.[9, 10]

### 1.1.3 Symptomatik

Eine frühzeitige Diagnose des PDAC fällt häufig schwer, da die Frühzeichen in vielen Fällen unspezifisch sind oder gar vollständig fehlen. Vor allem beim Pankreaskopfkarzinom kommt es aufgrund einer tumorbedingten Verlegung des Gallenganges zur Aufstauung der Gallenflüssigkeit mit nachfolgendem Bild eines Ikterus. Weitere Anzeichen für einen Pankreastumor können

unspezifische Oberbauchbeschwerden einhergehend mit Übelkeit und Appetitlosigkeit sowie einer begleitenden Pankreatitis sein.[11] In seltenen Fällen können zusätzlich eine Glukosetoleranzstörung oder ein Diabetes mellitus als Hinweise auf ein PDAC auftreten.[12] Zudem kommen auch paraneoplastisch bedingte, teils rezidivierend auftretende Thrombosen als Ausdruck der Tumorerkrankung vor.[13]

#### 1.1.4 Histopathologie und Stromazusammensetzung

Das Pankreas kann in einen exokrinen und einen endokrinen Anteil aufgegliedert werden. Während der endokrine Anteil vor allem für den Glukosestoffwechsel zuständig ist, produziert das exokrine Pankreas insbesondere Verdauungsenzyme.[14] Diese exokrinen Anteile bestehen vor allem aus den sekretorischen Azini und den dazugehörigen epithelialen Gängen.[15]

Über 90% der Pankreaskarzinome sind duktales Ursprunges (=Pancreatic Ductal Adenocarcinoma). Diese sind zu etwa 70% im Pankreaskopf und seltener im Korpusbereich lokalisiert.[2]

Histologisch zeigen sich diffuse Veränderungen der Pankreasgänge mit kubischem Epithel, auffälligem Kernkörperchen sowie Schleimbildung.[2, 16] Zusätzlich kommt es in der Umgebung dieser Gänge zu ausgeprägten bindegewebigen Veränderungen, die einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum ausüben. Diese Veränderungen sind nicht nur durch eine Zunahme der extrazellulären Proteine, sondern ebenfalls durch eine Zunahme der zellulären Bestandteile, zu denen unter anderem pankreatische Sternzellen/Fibroblasten, Myofibroblasten, endokrine Zellen, Endothelzellen und Immunzellen zählen, gekennzeichnet.[17] Eine besondere Rolle spielt die Interaktion zwischen den Tumorzellen und den Bestandteilen dieser Mikroumgebung.[18]

Vor allem die pankreatischen Sternzellen/Fibroblasten (PSCs) sind in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Diese können unter anderem durch *transforming growth factor-β1* (TGF-β1) oder Interleukin-6 (IL-6), aber auch diverse weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie Ethanol aktiviert werden.[19-21] Dabei erfolgt die Expression der aktivierenden Zytokine und Wachstumsfaktoren vor allem durch verletzte Epithelzellen, Endothelzellen, Entzündungszellen und später auch durch Tumorzellen.[22-24]

Die aktivierten PSCs proliferieren und transdifferenzieren zu Myofibroblasten, die durch eine ausgeprägte Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM), insbesondere von Kollagen Typ I, III sowie Fibronectin und die Expression von *α-smooth muscle actin* (α-SMA) charakterisiert sind.[25]

Besonders wichtig erscheint die Interaktion zwischen den Karzinomzellen und den aktivierten PSC/Myofibroblasten. Einerseits stimulieren sich die beiden Populationen gegenseitig zur Proliferation und Invasion, andererseits werden die Karzinomzellen durch direkten Einfluss und indirekter durch die von ihnen modulierte EZM vor dem Zelltod geschützt.[22, 26-29]

Im Gegensatz zu anderen Tumorgeweben liegt im PDAC eine hypoxische Umgebung vor. Trotz vermehrter Bildung von pro-angiogenen Faktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch die aktivierten PSC/Myofibroblasten, einhergehend mit lokal gesteigerter Angiogenese, wird die hypoxische Umgebung aufgrund der Sekretion von anti-angiogenetischen Faktoren wie Endostatin sowie einer verminderten Gewebsperfusion in Folge massiver EZM-Ablagerungen aufrechterhalten.[30] Diese Bedingungen und auch die veränderte Gefäßarchitektur führen zu einer Verminderung der Konzentration von Chemotherapeutika am Wirkort.[31] Zusätzlich konnten Xu et al. zeigen, dass aktivierte PSCs/Myofibroblasten auch im metastatischen Gewebe vorkommen, indem sie ebenfalls das Überleben der Karzinomzellen begünstigen.[32]

Während der Ausbildung des Tumorstromas kommt es zusätzlich zu einer Anreicherung von Immunzellen. Neben den regulatorischen T-Zellen (Tregs), die im Abschnitt 1.1.5 ausführlicher beschrieben werden, reichern sich vor allem myeloide Suppressorzellen (MDSCs) und tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) an.[20]

Die TAMs bewirken eine Verminderung der T-Zell-Reaktion auf das Tumorgewebe und begünstigen zusätzlich die Angiogenese sowie Metastasierung. Darüber hinaus korreliert das Ausmaß des immunsuppressiven M2-Subtyps der TAMs im PDAC mit der Tumorgröße sowie einem kürzeren Überleben.[33-35]

Die MDSCs beschreiben eine heterogene Gruppe immunsupprimierender Zellen, die gemeinsame funktionelle Eigenschaften und Phänotypen besitzen und der myeloischen Reihe entstammen.[36] Diese Zellen vermitteln ihre immunmodulierenden Effekte insbesondere über eine effektive Hemmung der T-Zell-Funktionen.[37]

Entscheidende Merkmale des PDAC sind ein frühes invasives Wachstum mit rascher Metastasierung. Histologisch zeigen selbst kleinste Primärtumore eine perineurale und lymphovaskuläre Infiltration.[38]

### 1.1.5 Regulatorische T-Zellen

Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 erwähnt, kommt es im Rahmen der Entstehung des PDACs zu einer Anreicherung des Tumorgewebes mit Tregs, die eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen darstellen und eine zentrale Rolle in der Unterdrückung der Effektor-T-Zellen einnehmen. Dieser Mechanismus bewirkt eine verminderte immunologische Reaktion gegen das Tumorgewebe.[39]

Im gesunden Organismus dient dieser Mechanismus dem Schutz vor Autoimmunerkrankungen. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass fehlende Tregs zu einer autoimmunologischen Reaktion gegen die Inseln des Pankreas mit nachfolgender Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I führen.[40]



Sowohl in der Blutbahn als auch im Tumorgewebe von PDAC-Patienten konnten bereits erhöhte Mengen an Tregs nachgewiesen werden. Diese korrelierten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose.[39, 41, 42]

Die Funktion der Tregs scheint in Abhängigkeit der Tumorentität zu variieren. Im Gegensatz zu vielen Tumorentitäten, zu denen u.a. das PDAC zählt, konnte beim kolorektalen Karzinom eine erhöhte Inzidenz an Tregs mit einem Überlebensvorteil assoziiert werden.[43]

Die Detektion von Tregs erfolgt zumeist über den Nachweis des Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) sowie von CD25 (der alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors).[39, 41]

Allerdings kommen diese Marker nicht nur auf Tregs vor, wodurch sich Tregs nicht vollständig durch die Anfärbung von CD25 und FoxP3 erfassen lassen. Einerseits können auch aktivierte T-Effektorzellen den Marker CD25 aufweisen, andererseits gibt es seltener auch induzierte, FoxP3-negative regulatorische T-Zellen, wie z.B. die CD4+CD69+CD25-FoxP3- T-Zellen, die ebenfalls einen regulatorischem Phänotyp ausbilden.[44] Diese unterschiedlichen Populationen können anhand spezifischer Zytokinmuster und den immunmodulierenden Eigenschaften unterschieden werden.[44] Zur weiteren Differenzierung können aktivierte T-Zellen durch die positive Anfärbung von CD49d und CD127 von den Tregs abgegrenzt werden.[45]

Nach der Entdeckung einer FoxP3-Mutation als Ursache einer Autoimmunerkrankung mit defizienter Funktion der Tregs, wurde dieser Transkriptionsfaktor lange Zeit als Hauptmarker für Tregs angesehen, der gleichzeitig für die regulatorischen Eigenschaften verantwortlich ist. Erst später konnte gezeigt werden, dass FoxP3 nicht zwingend mit einer immunmodulatorischen Funktion vergesellschaftet ist und auch in Zellen anderen Ursprunges vorkommen kann (s. Abschnitt 1.2).[46-48]

Grundsätzlich lassen sich Tregs in Abhängigkeit von ihrer Entstehung in zwei Untergruppen aufteilen. Auf der einen Seite stehen die natürlichen, aus dem Thymus stammenden regulatorischen T-Zellen (nTregs), auf der anderen Seite die in der Peripherie induzierten regulatorischen T-Zellen (iTregs).

So konnte gezeigt werden, dass sich naive CD4-Zellen im Mausmodell unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  und der Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) zu FoxP3-positiven iTregs umwandeln können. Diese vermitteln ihre immunmodulierende und proliferationshemmende Wirkung auf antigenspezifische CD4-Effektorzellen unter anderem über die Sekretion des Zytokins TGF- $\beta$ . [49, 50] Dieses steht im Einklang mit dem Befund, dass das Tumorgewebe im PDAC eine wichtige Quelle für TGF- $\beta$  darstellt.[22] Es konnte gezeigt werden, dass humane CD4+T-Zellen *in vitro* unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  zu FoxP3-positiven Zellen konvertieren, wobei jedoch kein regulatorischer Phänotyp nachgewiesen werden konnte.[51]

Ein zentrales Unterscheidungsmerkmal zwischen nTregs und iTregs, insbesondere bei ähnlicher

FoxP3-Expression, sind unterschiedliche Zytokinexpressionsmuster.[52]

Physiologisch werden die Tregs durch die Interaktion von Chemokinen wie dem Liganden CXCL12 und dem dazugehörigen CXCR4-Rezeptor chemotaktisch im Knochenmark angereichert. Die Freisetzung der Tregs aus dem Knochenmark kann durch die Ausschüttung von G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor), welches eine Hemmung der CXCL12/CXCR4-Interaktion bewirkt, erreicht werden.[53] Ein ähnlicher Effekt konnte auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass FoxP3-positive Tregs, die den chemotaktischen CCR5-Rezeptor exprimieren, über die Freisetzung von CCL5 ins Tumorgewebe rekrutiert werden. Durch die Hemmung von CCL5, welches vornehmlich von den pankreatischen Tumorzellen gebildet wurde, konnte ein vermindertes Tumorstadium verzeichnet werden. Möglicherweise ist hierfür eine verbesserte Immunreaktion gegen das Tumorgewebe verantwortlich.[54] Zusätzlich kommen aber auch diversen anderen Chemokinen wichtige Funktionen in diesem Zusammenhang zu.[55]

In welchen Anteilen die Anreicherung der Tregs im Tumorgewebe auf Chemotaxis einerseits und andererseits auf die Umwandlung von Effektor-T-Zellen zu Tregs zurückzuführen ist, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Zhou et al. konnten zeigen, dass sowohl die induzierten als auch die natürlichen Tregs am Schutz des Tumorgewebes vor dem Immunsystem beteiligt sind.[56, 57]

Neben den Zytokin-vermittelten Wirkungen, u.a. durch TGF- $\beta$  und IL-10, sind auch Zellkontakt-abhängige Prozesse an der Funktionsvermittlung der Tregs beteiligt. [58, 59]

#### 1.1.6 Pathogenese

Analog zur Adenom-Karzinom-Sequenz beim Kolonkarzinom wurden auch beim PDAC verschiedene histologische Vorläuferläsionen, wie intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN), muzinös-zystische Neoplasien (MCN), atypische flache Läsionen (AFL) sowie die häufigsten und bisher am besten erforschten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) beschrieben.[60]

Diese können anhand der Schwere der pathologischen Veränderungen in die Stufen PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2 und PanIN 3 (auch als *Carcinoma in situ* bezeichnet) unterteilt werden. Im Rahmen des pathologischen Fortschritts kommt es stufenweise zur Zunahme der histomorphologischen Auffälligkeiten und auch vermehrt zu genetischen Veränderungen des Gangepithels.[61]

Molekularpathologisch tritt in über 90% der Fälle bereits frühzeitig in intraepithelialen Neoplasien eine genetische Mutation auf, die eine Aktivierung im *K-RAS* Onkogens bewirkt.[62] Im Rahmen der weiteren Pathogenese kommt es mit zunehmender Entdifferenzierung häufig zu Inaktivierungen

des Tumorsuppressorgens *TP53*, welches für den Transkriptionsfaktor *p53* kodiert. Zusätzlich treten Mutationen des Tumorsuppressorgens *p16/CDKN2a/INK4a* und des *SMAD4*-Gens auf.[63-65] Diese Veränderungen führen gemeinsam zu einer Störung der Regulation des Zellzyklus einhergehend mit einer Apoptoseresistenz und fördern damit die weitere maligne Entartung.[66] Neben den Mutationen des Gangepithels ist auch eine seltener vorkommende Transdifferenzierung der Azinuszellen zum metaplastischen, gangähnlichen Epithel als Ursprung des PDACs beschrieben worden.[60, 67]

#### 1.1.7 Die chronische Pankreatitis als möglicher Ausgangspunkt des PDAC

Die primäre chronische Pankreatitis (CP) zeichnet sich durch rezidivierende Entzündungsprozesse aus, die zu bindegewebigen Veränderungen des Pankreas führen.[68]

Histologisch kommt es im Rahmen der Entzündungsreaktion zur Zerstörung des Gewebes mit Invasion von Entzündungszellen und Atrophie der Azini. Anschließend führen Reparaturprozesse zur Einlagerung von Fettgewebe und einer Fibrosierung. Diese Umwandlungen führen nicht selten zur exokrinen oder endokrinen Pankreasinsuffizienz.[69]

In vielen Fällen besteht eine multifaktorielle Ätiologie, die neben dem in der Literatur häufig beschriebenen Alkoholkonsum auch andere toxisch-metabolische, genetische, entzündliche, obstruktive oder idiopathische Faktoren umfasst.[70] Zahlreiche Studien konnten beweisen, dass Alkohol ein Risikofaktor für die CP darstellt, da der Konsum bei vielen Erkrankten eine wichtige Rolle spielt. Dass jedoch auch andere Risikofaktoren eine bedeutende Rolle spielen, wird durch die geringe Zahl der Alkoholkranken, die im Verlauf eine CP entwickeln, ersichtlich.[71]

Klinisch äußert sich die CP vor allem durch rezidivierende Schmerzen im Oberbauch sowie Verdauungsbeschwerden aufgrund einer Maldigestion. In seltenen Fällen treten auch ikterische Beschwerden oder ein Insulinmangeldiabetes auf.[72]

Die CP ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung des PDAC.[73, 74] Neben den bereits genannten histologischen Veränderungen weisen CP-Patienten auch Läsionen wie z.B. PanINs, die als Präkanzerosen eines PDAC gelten (s. Abschnitt 1.1.6), auf.[75, 76]

Die Entzündungsprozesse werden unter anderem durch oxidativen oder nitrosativen Stress, Zyto- und Chemokine sowie Wachstumsfaktoren aufrechterhalten und können zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes einschließlich der Gene führen. Einerseits kann es dadurch zu einer Beschleunigung des Zellzyklus mit Störung der Apoptose kommen, andererseits können fehlerhafte Reparaturmechanismen zu genetischen Mutationen führen.[75, 76] Im Rahmen der weiteren Progression finden sich häufig bereits erste genetische Veränderungen u.a. im *KRAS* und *p53*-Gen (s. Abschnitt 1.1.6), die eine weitere Entartung des Gewebes begünstigen.[77]

Sowohl die sonographische als auch die makroskopische Unterscheidung zwischen der CP und dem nicht-metastasierten PDAC fallen häufig nicht leicht, da beide Erkrankungen mit einer Fibrosierung des Stromas einhergehen.[78] Aus diesem Grunde kommen beim Verdacht auf ein PDAC weitere diagnostische Verfahren wie die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Endosonographie (EUS) zur weiteren Abgrenzung zum Einsatz.[11]

#### 1.1.8 Therapie

In Abhängigkeit vom Tumorstaging, welches im Rahmen der klinischen Diagnostik erfolgt, wird die Empfehlung für eine kurative oder eine palliative Therapie ausgesprochen. Die Voraussetzung für eine kurative Therapie ist immer die vollständige Resektabilität des Tumorgewebes, da die radikale chirurgische Therapie die größten Heilungschancen erzielt.[79] Dabei wird die Resektabilität nicht zwingend durch eine Infiltration des Nachbargewebes ausgeschlossen.[80, 81] Je nach Ausmaß und Lage des Tumors kommen die partielle Duodenopankreatektomie oder die totale Pankreatektomie als chirurgische Optionen infrage.[82]

Nach vollständiger Tumorresektion erfolgt gemäß aktueller Leitlinien eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluoruracil und Folinsäure, da durch diese Therapie eine Verdopplung des 5-Jahres-Überlebens auf rund 20% erzielt werden konnte.[83, 84] Neoadjuvante Verfahren zeigten bisher keinen Benefit in Bezug auf das 5-Jahres-Überleben.[85] Das schlechte therapeutische Ansprechen ist vor allem der Ausbildung einer Apoptosestörung und Chemoresistenz geschuldet.[86]

Leider besteht bei 80% der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits eine palliative Situation. Dieser Umstand ist vor allem auf die fehlende Frühsymptomatik und dem damit einhergehenden fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei Erstdiagnose zurückzuführen.[87]

Im Falle eines inoperablen Tumors, der durch eine Fernmetastasierung oder die Infiltration der peripankreatischen Gefäße definiert wird, bringt ein operatives Vorgehen keine prognostischen oder klinischen Verbesserungen, so dass eine palliative Kombinationstherapie, bestehend aus 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (nach dem Folfrinox-Protokoll), empfohlen wird.[88]

Nachdem eine Kombinationstherapie von Gemcitabin und dem EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib in einer weiteren Studie eine geringe, aber signifikante Verlängerung des medianen Überlebens um etwa 2 Wochen, bei nur geringer Nebenwirkungszunahme, zeigen konnte, kann auch diese Kombination im Falle einer palliativen Behandlungssituation empfohlen werden.[89, 90]

Zusätzlich zur palliativen Chemotherapie steht die symptomatische Behandlung von Komplikationen der Tumorerkrankung im Mittelpunkt. Hier nehmen insbesondere die

Schmerztherapie nach dem WHO-Schema sowie supportive Maßnahmen eine zentrale Rolle ein.[91-93]

Im Rahmen des Pankreaskopfkarzinoms tritt nicht selten eine Cholestase auf, die primär mittels endoskopischer Metallstenteinlage und seltener durch eine perkutane transhepatische Cholangiodrainage (PTC) behandelt wird.[89, 94] Eine primäre operative Anlage einer biliodigestiven Anastomose in der palliativen Situation wird in den aktuellen Leitlinien nicht empfohlen.[89]

Zusammenfassend stellt das eingeschränkte therapeutische Ansprechen weiterhin eine große Problematik dar. Da eine mögliche Heilung lediglich durch ein chirurgisches Vorgehen mit anschließender adjuvanter Chemotherapie erzielt werden kann, spielt insbesondere die frühzeitige Diagnosestellung eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist die Erforschung neuer Therapieoptionen für eine zielgerichtete Wirkungsweise essentiell. Ein Ansatz ist die weitere Erforschung der immunsuppressiven Mechanismen, da diese mögliche Hinweise für therapeutische Angriffspunkte liefern könnte.

## 1.2 FoxP3 in epithelialen Geweben

Zusätzlich zur Expression in Tregs konnte FoxP3 auch in anderen Geweben nachgewiesen werden. Neben dem Nachweis in zahlreichen gesunden epithelialen Geweben wie der Brustdrüse, Prostata und des Lungenepithels bei Mäusen, konnte eine Expression im menschlichen Pankreasgewebe erst nach maligner Entartung nachgewiesen werden.[95, 96]

Zum Teil erfolgte der Nachweis zytoplasmatisch, stellenweise jedoch auch nukleär, was möglicherweise als Ausdruck posttranslationaler Modifikationen zu verstehen ist.[97]

Für die FoxP3-Induktion in den pankreatischen Karzinomzellen scheint vor allem TGF- $\beta$ 2 verantwortlich zu sein. Analog zu den Tregs führt die Expression von FoxP3 in Pankreaskarzinomzellen zur Proliferationshemmung von Effektor-T-Zellen, ohne deren Aktivierung zu beeinträchtigen.[96] Gleichzeitig konnte *in vitro* unter Verwendung von siRNA eine Herunterregulation der FoxP3-Expression erzielt werden, die gleichzeitig mit einem Anstieg von Interleukin-6 und Interleukin-8 einherging. Dieses Ergebnis unterstreicht die immunmodulatorischen Eigenschaften von FoxP3.[96]

Neben dem PDAC-Gewebe konnte eine FoxP3-Expression auch in diversen anderen Tumorgeweben nachgewiesen werden.[98] So erbrachte die Untersuchung von Kolorektalkarzinomen ebenfalls einen Expressionsnachweis im Tumorepithel. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte FoxP3-Expression mit einer prognostischen Verschlechterung einherging und gleichzeitig zu einer Abnahme der Infiltration mit Tregs führte. Dem Anschein nach könnte die FoxP3-Expression des Tumorepithels durch eine Unterdrückung der Immunreaktion einen positiven Effekt auf das Tumorwachstum ausüben.[99]

Während Lal et al. gleichermaßen eine Zunahme der Infiltration von Tregs und der Expression von FoxP3 im Epithel des Mammakarzinoms mit einer Progression der Krankheit feststellten, konnte eine andere, größer angelegte Studie kaum eine FoxP3-Expression in Mammakarzinomzellen nachweisen.[100, 101]

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigten Mäuse mit Mutationen in FoxP3-Gen eine gehäufte Entwicklung von Mammakarzinomen. Weitere Untersuchungen deuten im humanen Gewebe eine direkte Verbindung zwischen einer Überexpression des *Her2*-Onkogens und einer Tumorsuppressorfunktion von FoxP3 an.[102]

In der Zusammenfassung zahlreicher Studien scheint die FoxP3-Expression sich im Falle von Patienten, die an einem PDAC oder Kolorektalkarzinom erkrankt sind, prognostisch negativ auszuwirken. Die Studienergebnisse von anderen Tumorerkrankungen, wie dem Mammakarzinom, erbrachten bisher keine einheitlichen Ergebnisse.[46] Bisher gibt es wenige Erkenntnisse darüber, ob eine FoxP3-Expression im karzinomatösen Epithel auch eine suppressive Wirkung auf andere Immunzellen ausübt oder andere pro-tumorigene Effekte besitzt.

### 1.3 Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM

L1CAM (CD 171) ist ein Zelladhäsionsprotein, welches zur Superfamilie der Immunglobuline zählt. Extrazellulär besteht das Molekül aus sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen, denen sich fünf homogene Fibronectin Typ III – Wiederholungen anschließen. Diesen gliedert sich ein transmembranärer Abschnitt, der von einer kurzen intrazellulären Domäne gefolgt wird, an.[103]

Neben dem physiologischen Vorkommen im neuronalen Gewebe, wo dem L1CAM-Molekül die Aufgabe der axonalen Migration und Zellinteraktion zukommt, konnte dieses auch im PDAC und vielen weiteren Tumoren nachgewiesen werden.[104-108] Dabei konnte eine Korrelation zwischen der L1CAM-Expression in Karzinomzellen und einer drastischen Verkürzung der Überlebenszeit belegt werden.[109-111]

Über den Nachweis von L1CAM in 92,7% der untersuchten PDAC-Gewebeproben hinaus konnten Geismann et al. L1CAM bereits in CP-Geweben, die keinen Anhalt für ein malignes Geschehen boten, nachweisen.[104, 112]

Die Expression von L1CAM im Tumorgewebe kann sowohl durch TGF- $\beta$ 1 als auch IL-1 $\beta$  induziert werden. Die Freisetzung dieser beiden Zytokine wird durch die Interaktion der Epithel-/Tumorzellen und dem umgebenden Stroma stimuliert.[108, 112] Sebens Mürköster et al. konnten diesem Molekül eine Rolle im Apoptoseschutz sowie in der Vermittlung von Chemoresistenz nachweisen. Diese Effekte wurden über einen IL-1 $\beta$ -induzierten Stickstoffmonoxid (NO)-Anstieg mit nachfolgender Verminderung der Caspasenaktivität vermittelt.[108]

L1CAM-Moleküle sind im Rahmen der Zellinteraktion nicht nur zu homophilen Bindungen mit dem Ziel der Adhäsion in der Lage. In der Tumorphathogenese haben vor allem heterophile Interaktionen mit verschiedenen Integrinen (v.a.  $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sowie  $\alpha$ 3 $\beta$ 1) und Tyrosinkinase-Rezeptoren einen zentralen Stellenwert. Diese können über eine Signalkaskade zu einer Aktivierung der Extrazellulär-signal-regulierten Kinasen-1 und -2 (ERK-1/2) führen, die wiederum über eine Hemmung der Caspasen zur Inhibierung der Apoptose führen und somit Tumorstadium sowie Motilität begünstigen.[113]

Kiefel et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass das membranständige L1CAM-Molekül die Zellproliferation und das Tumorstadium begünstigt. Zusätzlich konnten erhöhte NF- $\kappa$ B-Spiegel gemessen werden, die von der L1CAM Interaktion mit verschiedenen Integrinen (v.a.  $\alpha$ 5-Integrin) und nachfolgender autokriner IL-1 $\beta$ -Stimulation abhängig zu sein scheinen.[114, 115] Dieser Mechanismus trägt ebenfalls zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei.[116, 117]

Zusätzlich zum membrangebundenen L1CAM konnte u.a. im Serum von Patienten mit Ovarialkarzinomen durch Metalloproteasen (ADAM-10 und ADAM-17) oder Plasmin abgespaltenes, lösliches L1CAM nachgewiesen werden.[118, 119] Diesem wird neben der

physiologischen Funktion in der neuronalen Migration ein promigratorischer Effekt mit erhöhter Invasivität im Tumorgewebe zugeschrieben.[120] Hingegen konnte diese lösliche Form von L1CAM nicht im Serum von PDAC-Patienten nachgewiesen werden.[104]

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Effekte des Tumorwachstums und der Zellproliferation der gelösten L1-Ektodomäne allein geringer sind als der Einfluss des vollständigen L1CAM-Moleküls.[114, 121] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch der Apoptoseschutz von löslichem L1CAM, welcher ebenfalls über eine Integrinbindung vermittelt wird, im Vergleich zur membranständigen Form deutlich geringer ist.[122, 123]

Schäfer et al. konnten durch die antikörpervermittelte Hemmung von L1CAM eine Sensibilisierung gegenüber Gemcitabin mit nachfolgend erhöhter Apoptoserate erzielen.[124] Zusätzlich konnte durch die gezielte Transfektion mit small hairpin RNA (shRNA) in L1CAM-positive PDAC-Zellen eine Inhibition der Zellproliferation sowie Reduktion der Invasivität erreicht werden.[125]

In einer anderen Studie haben Grage-Griebenow et al. geschlussfolgert, dass L1CAM die Migration von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs, nicht aber CD4+ Effektor-T-Zellen in CP und PDAC erhöht. Ein Effekt auf die Proliferation der Tregs konnte nicht gezeigt werden. Zusätzlich bildeten die CD4+ Effektor-T-Zellen vermehrt das Transmembranprotein CD69 und akquirierten einen CD4+CD25-CD69+ immunsuppressiven Phänotyp von Tregs, welcher sich vor allem im PDAC-Gewebe anreicherte und gleichzeitig mit einer Lymphknoteninvasion und einem höheren Grading korrelierte.[126]



#### **1.4 Fragestellung der Arbeit**

Das PDAC ist aufgrund von diversen Mechanismen, die u.a. zu einem Schutz vor einer Immunreaktion, einer Apoptosestörung sowie zur Chemoresistenz führen, mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Entscheidende Einflüsse auf diese schlechte Prognose scheinen das Adhäsionsmolekül L1CAM sowie Tregs und insbesondere der Transkriptionsfaktor FoxP3 auszuüben.

Aus diesem Grunde beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von L1CAM im Tumorgewebe und der Anzahl an FoxP3-exprimierenden Tregs sowie der Expression von FoxP3 im Tumorepithel zu untersuchen.

Zusätzlich wurde der Einfluss dieser Faktoren auf CD4+ Effektor-T-Zellen bestimmt.

Da die CP einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung des PDAC darstellt, zudem beide Erkrankungen sowohl klinisch als auch morphologisch viele Gemeinsamkeiten aufweisen, wurden in CP-Präparaten dieselben Parameter wie in den PDACs analysiert, um die Unterschiede hinsichtlich der Stromalen Kompositionen zu charakterisieren und somit Hinweise auf mögliche Angriffspunkte für gezieltere Therapiemöglichkeiten zu erhalten.

Abschließend wurde ein Zusammenhang zwischen den aus PDAC-Präparaten ermittelten Werten und der Überlebenszeit der Patienten rechnerisch ermittelt.

## 2 Material

### 2.1 Präparate und Bezugsquelle

**Tabelle 2.1. Art, Anzahl und Bezugsquelle der Präparate**

Herkunftsgewebe	Anzahl der Präparate	Bearbeitung vor Zurverfügungstellung	Bezugsquelle
Duktales Pankreaskarzinom (PDAC)	42	In Paraffin gebettet, auf 5µm Dicke geschnitten und einem Objektträger platziert	Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Herrn Prof. Dr. Röcken
Chronische Pankreatitis (CP)	15	In Paraffin gebettet, auf 5µm Dicke geschnitten und einem Objektträger platziert	Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. Sipos

Von den aufgeführten Präparaten wurden für diese Arbeit jeweils acht Folgeschnitte angefertigt, die anschließend entweder maschinell oder manuell gefärbt wurden (siehe Abschnitte 3.1 und 3.2).

Die Durchführung der Untersuchungen an den Geweben der PDACs und CPs sowie die Verwendung der klinischen Daten wurden durch die Ethik-Kommissionen des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel und des Universitätsklinikums Tübingen unter der Ethik-Votum-Nummer D429/09 und 470/210BO1 genehmigt.

### 2.2 Geräte

Bond™ Max System	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Feuchtkammer	Eigenanfertigung
Glasküvetten	Th. Geyer GmbH, Renningen, D
Kamera AxioCam	Zeiss, Jena, D
Keyence BZ9000 Mikroskop	Keyence, Neu-Isenburg, D
Mikroskop Axioplan und Axiophot 2	Zeiss, Jena, D
Mikrowelle Miele De Luxe M 686	Miele, Gütersloh, D
Millipore Wasseraufbereitungssystem	LS Orbital, Schwechat, A
Objektiv Plan Neofluar (Öl) 40x/1,30	Zeiss, Jena, D
Objektiv Plan Neofluar 10x/0,30	Zeiss, Jena, D
Objektiv Plan Neofluar 20x/0,50	Zeiss, Jena, D
Okular PL 10x/25	Zeiss, Jena, D

Pinzetten	Th.Geyer GmbH, Renningen, D
Pipetten 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D

### 2.3 Software

Adobe Photoshop 8.0 (CS)	Adobe Systems, San José, USA
AxioVision Rel. 4.8	Zeiss, Jena, D
BZ-9000 Image Analysis Application	Keyence, Neu-Isenburg, D
EndNote X5	T. Reuters, New York City, USA
Microsoft Office 97-2002	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Apache OpenOffice 4.1.0	Apache, Delaware, USA
Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
SPSS (Version 17.0)	IBM, Armonk, USA

### 2.4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

AEC + High sensitivity substrate chromogen	Dako GmbH, Hamburg, D
Aqua dest.	Labor für Mol. Gastroenterologie, UKSH Kiel
Bond™ Polymer Refine Detection Kit DS9800	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V	Biomol GmbH, Hamburg, D
Deckgläser (18mm)	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Envision + System-HRP anti-mouse	Dako GmbH, Hamburg, D
Eppendorfgefäße 1,5ml/ 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Immersionsöl	Merck, Darmstadt, D
Kaisers Glyceringelatine	Waldeck GmbH, Münster, D
Mayer's Hämalaun (Hämatoxylin)	Applichem, Darmstadt, D
Nitril Untersuchungshandschuhe	Ansell GmbH, München, D
Phosphat Buffering Saline (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe, D
Pipettenspitzen 20µl/ 200µl/ 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen 15ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
SuperFrost® Objektträger (76mm x 26mm)	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Target Retrieval Solution, pH 9	Dako GmbH, Hamburg, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, D

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Merck, Darmstadt, D

Xylol

Th. Geyer GmbH, Renningen, D

## 2.5 Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Nachfolgend sind die Antikörper der immunhistochemischen Färbungen sowie die benötigten Pufferlösungen für das Antigen Retrieval und das jeweilige Verdünnungsverhältnis aufgeführt.

**Tabelle 2.2: Antikörper der Automatenfärbung mit Leica Bond™ Max System**

Antikörper	Spezies	Isotyp	Antigen Retrieval	Verdünnung	Hersteller
Cytokeratin, Pan Ab-1	Maus	IgG1	pH 8,9, EDTA	1:200	Thermo Scientific, Waltham, USA
Smooth Muscle Actin Ab-1 (clone 1A4)	Maus	IgG2	kein	1:400	Thermo Scientific, Waltham, USA
CD3 (clone SP7)	Hase	IgG	pH 6, Citrat	1:100	Thermo Scientific, Waltham, USA
CD4 (clone 4B12)	Maus	IgG1	pH 6, Citrat	1:25	Leica Biosystems, Nussloch, D
CD25 (IL-2R) (clone 4C9)	Maus	IgG2b	pH 6, Citrat	1:100	Leica Biosystems, Nussloch, D

**Tabelle 2.3: Antikörper für die manuellen Färbungen**

Antikörper	Spezies	Isotyp	Antigen Retrieval	Verdünnung	Hersteller
FoxP3 (hFoxy)	Maus	IgG1	pH 9, Tris/EDTA	1:50	Ebioscience, Frankfurt a.M., D
L1-14.10 (L1CAM)	Maus	IgG1	pH 9, Tris/EDTA	1:100	Dr. G. Moldenhauer, DKFZ Heidelberg
Isytopen Kontroll- Antikörper	Maus	IgG1	pH 9, Tris/EDTA	1:50	eBioscience, Frankfurt a.M., D

## **3 Methoden**

### **3.1 Maschinelle Färbungen der Präparate**

Nach dem Schneiden wurden die Automatenfärbungen der Präparate mithilfe des Färbe-Automaten-Systems Bond™ Max Systems (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) durchgeführt. Gemäß Färbeprotokoll wurden zum Antigen-Retrieval für die Färbung von Pan-Cytokeratin der EDTA-Puffer Bond pH 8,9 (ER2=epitope retrieval) sowie für die Färbungen CD3, CD4 und CD25 der Citrat-Puffer Bond pH 6,0 (ER1) verwendet. Für die Färbung von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) war kein Antigen-Retrieval notwendig.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das Bond™ Polymer Refine Detection Kit DS9800 (Leica Biosystems) mit dem entsprechenden Antikörper (s. Tabelle 2.2) eingesetzt. Durch eine Peroxidase-Reaktion kam es zu einer Braunfärbung. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Färben der Gewebe mit Mayer's Hämalaun.

Die automatisierte Färbung der oben genannten Präparate erfolgte freundlicherweise durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

### **3.2 Manuelle Färbungen der Präparate**

#### **3.2.1 LICAM**

Nach erfolgter zweimaliger Entparaffinierung mittels Xylol, für jeweils zehn Minuten, wurden die Präparate zweifach für zehn Minuten mit 100% Ethanol behandelt. Anschließend erfolgte die fünfminütige Inkubation mit einem Gemisch aus 95% und 0,3% Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), um die endogenen Peroxidasen zu blockieren. Die weitere Rehydrierung wurde für jeweils zwei Minuten in absteigender Folge mit 70% Ethanol, 50% Ethanol und abschließend Aqua dest. durchgeführt. Es folgte die zehnminütige Waschung in PBS + 1% BSA.

Anschließend wurden die Präparate mit Target Retrieval Solution (Fa. Dako, pH 9.0, in einer Verdünnung von 1:10 mit Aqua dest.) viermalig für jeweils fünf Minuten bei 150W in der Mikrowelle, mit nachfolgender zehnminütiger Abkühlungsphase, inkubiert.

Danach erfolgte eine dreimalige Waschung mit dem Gemisch aus PBS + 1% BSA für jeweils fünf Minuten, bevor die Präparate für 20 Minuten mit PBS + 4% BSA in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur blockiert wurden.

Im nächsten Schritt wurden die Blockierungslösung abgegossen und die Präparate mit dem Primärantikörper L1-14.10 in einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml in PBS + 1% BSA für weitere 45 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert, bevor die Präparate dreimalig mit PBS + 1% BSA

gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärreagenz DAKO EnVision + System-HRP, labelled anti-mouse Polymer, für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Nachfolgend wurden die Präparate erneut dreimalig für fünf Minuten mit PBS + 1% BSA gewaschen und anschließend für zehn Minuten mit DAKO AEC Substrat Chromogen behandelt, bevor eine mikroskopische Kontrolle der Färbung erfolgte.

In einem letzten Schritt wurde die Färbereaktion durch zweimalige Auswaschung für jeweils fünf Minuten mit Leitungswasser abgestoppt und für maximal eine Minute in Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Nach zehnmütiger Bläuung unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckelt.

Die Etablierung dieser Färbemethode mit Hilfe der Isotypenkontrolle erfolgte bereits im Jahr 2007 durch Sebens Mürköster et al.[108] Die Positivkontrolle der Methode wurde in dieser Arbeit anhand des angefärbten Nervengewebes in den CP- und PDAC-Geweben durchgeführt, da diese eine ausgeprägte Expression von LICAM aufweisen.

### 3.2.2 FoxP3

#### 3.2.2.1 Etablierung der Färbemethode

Vor der Anfärbung der pankreatischen Präparate erfolgte die Etablierung der Färbemethode an Glioblastomschnitten, die durch die Klinik für Neurochirurgie, UKSH, Campus Kiel, Frau Prof. Dr. Dr. J. Held-Feindt zur Verfügung gestellt wurden. Als Isotypkontrolle wurde ein IgG1-Antikörper der Maus verwendet. Die Verwendung der Schnitte für diese Zwecke wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, unter der Ethik-Votum-Nummer D429/09, genehmigt.

#### 3.2.2.2 Durchführung der Färbung

Die Entparaffinierung der Schnitte sowie das Antigen-Retrieval erfolgten wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

Anschließend wurden die Präparate ebenfalls dreimal für fünf Minuten mit einem Gemisch aus PBS + 1% BSA gewaschen, bevor die BSA-Konzentration auf 4% erhöht und 0,3% Triton X-100 hinzugegeben wurden, um einen Serumblock sowie eine Permeabilisierung der Zellen herbeizuführen. Dieses Gemisch wurde ebenfalls für 20 Minuten in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden diese Reagenzien abgegossen und der Primärantikörper Clone hFoxy in einer Konzentration von 20µg/ml, verdünnt in PBS + 1% BSA +

0,3% Triton X-100, hinzugegeben. Bei der Etablierung dieser Färbung wurde die Isotypen-Kontrolle mit der gleichen Konzentration des Primärantikörpers und unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Nachfolgend erfolgte eine 45-minütige Inkubation in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur, bevor die Präparate erneut dreimalig für jeweils fünf Minuten mit PBS + 1% BSA + 0,3% Triton X-100 gewaschen wurden.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärreagenz DAKO EnVision + System-HRP, labelled anti-mouse Polymer, für 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer.

Nachfolgend wurden die Präparate erneut dreimalig für fünf Minuten mit PBS + 1% BSA + 0,3% Triton X-100 gewaschen und für zehn Minuten mit DAKO AEC Substrat Chromogen behandelt, bevor eine mikroskopische Kontrolle der Färbung erfolgte.

Danach wurde die Färbereaktion durch zweimalige Auswaschung für jeweils fünf Minuten mit Leitungswasser abgestoppt und für maximal eine Minute in Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Es folgte die zehnminütige Bläuung unter fließendem Leitungswasser, bevor die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckelt wurden.

### **3.3 Bewertungsablauf der immunhistochemischen Färbungen**

Nach erfolgter Einarbeitung in Zusammenarbeit mit einem Pathologen und einer auf diesem Gebiet sehr erfahrenen Biologin wurden alle Präparate semi-quantitativ hinsichtlich des prozentualen Anteils der gefärbten Zellpopulation auf eine jeweilige Bezugsgröße bewertet (siehe Abschnitt 3.5). Zusätzlich wurden Werte für die Intensität der Epithelfärbungen von FoxP3 und L1CAM vergeben (siehe Abschnitt 3.6).

Nach initialer mikroskopischer Beurteilung, die in 100-facher Vergrößerung durchgeführt wurde, erfolgte eine detaillierte Betrachtung bei 200-facher Vergrößerung. Vereinzelt, jedoch nicht regelhaft, kam die 400-fache Vergrößerung zur Anwendung.

Alle Untersuchungen wurden zur Objektivierung dreimalig unabhängig voneinander mikroskopiert. Bei Abweichungen dieser Bewertung wurden die Färbungen der Präparate zusätzlich durch einen weiteren Untersucher bewertet.

### **3.4 Orientierung in den Präparaten**

Um eine Übersicht über die malignen Anteile der einzelnen Gewebeproben zu erhalten, wurde zunächst die Epithelfärbung (Pan-Cytokeratin) untersucht. Zur weiteren Orientierung und Abgrenzung des Stromas wurde die Färbung von  $\alpha$ -SMA als Marker für die Myofibroblasten, die

den Hauptteil des zellulären Stromas ausmachen, begutachtet. Mit Hilfe dieser beiden Marker konnten die entarteten Bereiche in den PDAC-Präparaten und die PanIN-Läsionen in den CP-Präparaten eindeutig identifiziert und vom Stroma klar abgegrenzt werden, um die anschließenden Auswertungen durchzuführen und die Scores auf diese veränderten Bereiche beziehen zu können.

### 3.5 Auswertung der Stroma-Färbungen

Zunächst wurde die Auswertung der CD3-positiv gefärbten Zellen durchgeführt, um den Anteil der T-Lymphozyten im Pankreasgewebe zu bestimmen. Im nächsten Schritt erfolgte die Analyse der CD4-positiven Zellen, um diese Subpopulation der CD3-positiven Zellen zu bestimmen, die neben den T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen auch die Tregs umfasst. Darauf aufbauend wurden die Färbungen für CD25 und FoxP3 im Tumorstroma untersucht, um den Anteil der Tregs zu ermitteln. Bei den Auswertungen aller Parameter wurde die Zellmorphologie berücksichtigt, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch andere Zellpopulationen oder Artefakte vorzubeugen.

Die Auswertung dieser Marker erfolgte durch ein Scoring-System. Die jeweiligen Scores wurden stufenweise in Bezug auf das Stroma und die übergeordneten Zellpopulationen gesetzt (s. Tab. 3.1 und 3.2).

**Tabelle 3.1: Bewertungsablauf der einzelnen Parameter und die dazugehörigen Bezugswerte**  
Dargestellt sind die jeweils ermittelten immunhistochemischen Marker (1.Spalte) sowie die Parameter, auf welche die ermittelten Anteile bezogen wurden.

	Stroma	CD3	CD4
CD3	x		
CD4	x	x	
CD25	x	x	x
FoxP3	x	x	x

**Tabelle 3.2: Primäres Scoring-System zur Bewertung der Ausprägung der stromalen und epithelialen/duktalen Parameter im CP und PDAC.** Dargestellt ist die Überführung der prozentualen Anteile der positiv gefärbten Zellen in die jeweiligen Scores.

	Score 0	Score I	Score II	Score III	Score IV
positiver Anteil in %	keine	<10%	10-50%	51-99%	100%

Aufgrund der Vielzahl der Kategorien, bei gleichzeitig relativ geringen Fallzahlen, erwiesen sich die anhand Tabelle 3.2 ermittelten Scores für die weitere statistische Auswertung als nicht praktikabel. Aus diesem Grunde wurden die Ergebnisse der jeweils ermittelten Parameter am Median dichotomisiert (siehe Tabelle 3.3).



**Tabelle 3.3: Endgültige Scores nach der Dichotomisierung der anhand Tabelle 3.2 ermittelten Anteile am Median.** Dargestellt sind die neuen Scores (1. Spalte), die durch eine Zusammenfassung der initial vergebenen Scores (s. Tab. 3.2) entstanden sind (3. Spalte).

Neuer Score	positiver Anteil in Prozent	entspricht den ursprünglichen Scores
Score I	0-10%	Score 0
		Score I
Score II	10-100%	Score II
		Score III
		Score IV

### 3.6 Auswertung der epithelialen Färbungen

Nachdem die epithelialen Anteile der Präparate, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, bestimmt wurden, erfolgte die Auswertung der Färbungen für FoxP3 und L1CAM in identischen Gebieten. Einerseits wurde, wie in Tabelle 3.2 beschrieben, zunächst ein semi-quantitativer Score für den Anteil der gefärbten Epithelzellen vergeben und in einen endgültigen Score überführt (vgl. Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3). Andererseits wurde auch die Intensität als Ausdruck der Expressionsstärke der jeweiligen Marker bewertet (siehe Tabelle 3.4) und anschließend ebenfalls am Median dichotomisiert (s. Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.4: Primärer Score für die Bewertung der Intensität der epithelialen Färbungen**

	Score 0	Score I	Score II	Score III
Farbintensität	keine	schwach	mittel	stark

**Tabelle 3.5: Endgültiger Score der Intensität der epithelialen Färbungen nach der Dichotomisierung der in Tab. 3.4 ermittelten Intensitäten am Median.** Dargestellt sind die neuen Scores (1. Spalte), die durch eine Zusammenfassung der initial vergebenen Scores (s. Tab. 3.4) entstanden sind (3. Spalte).

Neuer Score	Intensität	ursprünglicher Score der Intensität
Score I	keine bis schwach	Score 0
		Score I
Score II	mittel bis stark	Score II
		Score III

Zusätzlich wurde ein Gesamtscore für diese beiden Parameter gebildet, der sich jeweils aus dem Score für die prozentuale Verteilung und der Intensität nach der Dichotomisierung zusammensetzte. (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6: Bildung eines Gesamtscores aus dem prozentualen Anteil und der Intensität der Epithelfärbung.** Dargestellt sind die Gesamtscores, die durch Addition der Einzelscores für den prozentualen Anteil und der Intensität der epithelialen Färbungen ermittelt wurden.

Gesamt-Score	Summe modifizierter Scores Epithel aus Anteil + Intensität
Score I	2
Score II	3 bis 4

Neben der Vergabe von Scores zur Bestimmung des Anteils und der Intensität von FoxP3 und L1CAM, wurde die Lokalisation der epithelialen FoxP3-Färbung mit der Lokalisation der epithelialen L1CAM-Färbung verglichen, um Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zu erhalten.

### **3.7 Statistische Berechnungen**

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SPSS Version 17.0. durchgeführt. Vereinzelt kam die Software Prism 6 zur statistische Überprüfung und graphischen Darstellung zum Einsatz.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests erfolgte die statistische Berechnung einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung einzelner Parameter. Anschließend wurde diese Methode angewandt, um einen Unterschied hinsichtlich der Ausprägung der Parameter zwischen den Gruppen CP und PDAC zu ermitteln. Im nächsten Schritt erfolgte der Vergleich zwischen der Gruppe der CP-Patienten und den PDAC-Patienten mit jeweils einheitlichem Tumorgrading. Zusätzlich wurde die Chi-Quadrat-Methode angewandt, um innerhalb der PDAC-Patienten den Einfluss der einzelnen Parameter auf das Überleben nach zwei Jahren zu ermitteln.

Zur Bestimmung des Einflusses einzelner Parameter auf das Gesamtüberleben wurde die Kaplan-Meier-Methode angewandt und die statistische Signifikanz anschließend mit Hilfe des Log-Rank-Tests überprüft. Die Berechnung erfolgte dabei anhand des Gesamtüberlebens. Hierbei wurden sieben von 42 PDAC-Patienten, von denen keine weiteren Informationen über das Überleben vorhanden waren, zum Zeitpunkt der letzten ärztlichen Nachkontrolle zensiert.

In allen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von  $p=0,05$  zugrunde gelegt. Darüber hinaus gelten Werte von  $p<0,001$  als hoch signifikant.

### **3.8 Schriftliches Verfassen und Bilder**

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von Microsoft Office 97-2002 verfasst. Die Bearbeitung und Darstellung der Tabellen erfolgte mit OpenOffice 4.1.0.

Zur Darstellung der Kaplan-Meyer-Kurven wurde die Software Prism 6 verwendet.

Die digitalen Bilder der Präparate wurden mit dem Mikroskop Keyence BZ9000 produziert und anschließend mit Adobe Photoshop 8.0 zugeschnitten und zu den hier aufgeführten Abbildungen verarbeitet. Weitere Veränderungen an den Originalbildern wurden nicht vorgenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Insgesamt flossen die Untersuchungsdaten von 42 PDAC-Patienten in die statistische Auswertung ein. Da die CP einen der Risikofaktoren für die Entwicklung eines PDACs darstellt, wurden die Daten von 15 CP-Patienten statistisch ausgewertet und als Vergleichskollektiv herangezogen.

Die Färbungen von CD25, FoxP3 und L1CAM wurden für das PDAC-Präparat mit der lfd. Nr. 42, aufgrund fehlender Färbung bei unzureichenden Materialmengen, nicht ausgewertet. Daher liegen einigen Teilen der Auswertung nur 41 PDAC-Präparate zugrunde.

Das Kollektiv der PDAC-Patienten zeichnete sich durch ein homogenes Tumorstaging mit den Merkmalen T3N1M0 aus, welches das am häufigsten operierte Tumorstadium darstellt. Hierbei handelt es sich definitionsgemäß um einen Tumor, der sich bereits in das angrenzende Gewebe ausbreitet, ohne den Truncus coeliacus oder die Arteria mesenterica superior zu infiltrieren.[2] Zusätzlich konnten regionale Lymphknotenmetastasen gefunden werden. Eine Fernmetastasierung bestand zum Zeitpunkt der Operation bei keinem der Patienten.

Das Alter der PDAC-Patienten lag im Median mit 65 Jahren klar über dem der CP-Patienten, welches im Median bei 52 Jahren lag. Während der Anteil der männlichen Patienten in der Gruppe der PDACs bei 57% lag, enthielt die Gruppe der CPs mit knapp 87% deutlich mehr männliche Patienten.

Im UICC-Grading der Tumoren zeigten sich neben den wenigen gut-differenzierten (G1), vor allem mäßig- (G2) bis schlecht-differenzierte (G3) PDACs. Vollständig undifferenzierte Tumoren (G4) wurden in keinem Präparat detektiert. Die Tabelle 4.1 zeigt die Merkmale der CP- und PDAC-Patienten im Vergleich.

**Tabelle 4.1: Merkmale der CP- und PDAC-Patienten**

		PDAC	CP
Anzahl der Präparate		42	15
Medianes Alter bei OP (Spanne)		65 (46-85)	52 (40-69)
TNM-Klassifikation		alle T3 N1 M0	
Tumorgrading (Anzahl)	G1	6	
	G2	23	
	G3	13	
	G4	0	
Geschlecht	männlich	24	13
	weiblich	18	2

## 4.2 Ergebnisse der semiquantitativen Auswertungen

Für die weiteren statistischen Berechnungen wurden die mikroskopisch ermittelten und am Median dichotomisierten Scores verwendet (s. Anhang, Abschnitt I). Diese Scores sind in den Tabellen Ia bis Id im Abschnitt I des Anhangs dargestellt. Die mikroskopisch ermittelten Scores, die vor der Dichotomisierung vergeben wurden, sind in den Tabellen IIa bis IId im Abschnitt II des Anhangs aufgeführt.

## 4.3 Vergleich stromaler und duktaler/tumoraler Parameter zwischen CP und PDAC

Zur Überprüfung, ob die detektierten Parameter eine unterschiedliche Verteilung im Gewebe aufweisen und somit eine bessere Diskriminierung zwischen der CP und dem PDAC erlauben, wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

**Tabelle 4.2: Gegenüberstellung der Ausprägung von Stromalen Parametern der CPs und PDACs.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15)		PDAC (n=42 <sup>2</sup> )		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl	(Score)	Fallzahl	(Score)	
A1	CD3+ (Stroma)	0 (I)	15 (II)	5 (I)	37 (II)	p= 0,311
B1	CD4+ (Stroma)	1 (I)	14 (II)	21 (I)	21 (II)	<b>p= 0,004*</b>
B2	CD4+ (CD3)	0 (I)	15 (II)	6 (I)	36 (II)	p= 0,325
C1	CD25+ (CD3)	15 (I)	0 (II)	3 (I)	38 (II)	p= 0,556
C2	CD25+ (CD4)	12 (I)	3 (II)	17 (I)	24 (II)	<b>p= 0,015*</b>
D1	FoxP3+ (CD3)	13 (I)	2 (II)	33 (I)	8 (II)	p= 0,713
D2	FoxP3+ (CD4)	11 (I)	4 (II)	17 (I)	24 (II)	p= 0,068

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)  
<sup>2</sup> Färbungen CD25, FoxP3 und L1CAM von Präparat 42 nicht ausgewertet, daher bei diesen Färbungen n=41  
 \*signifikantes Ergebnis (p<0,05)

Wie in Tabelle 4.2 dargestellt, zeigten alle CPs einen hohen Anteil an CD3+ T-Zellen (A1, 15/15 Präparate Score II). Auch unter den PDACs wiesen 37 von 42 Präparaten (88%) hohe CD3-Scores (A1, Score II) auf. Aufgrund dieses geringen Unterschiedes war dieses Ergebnis nicht signifikant.

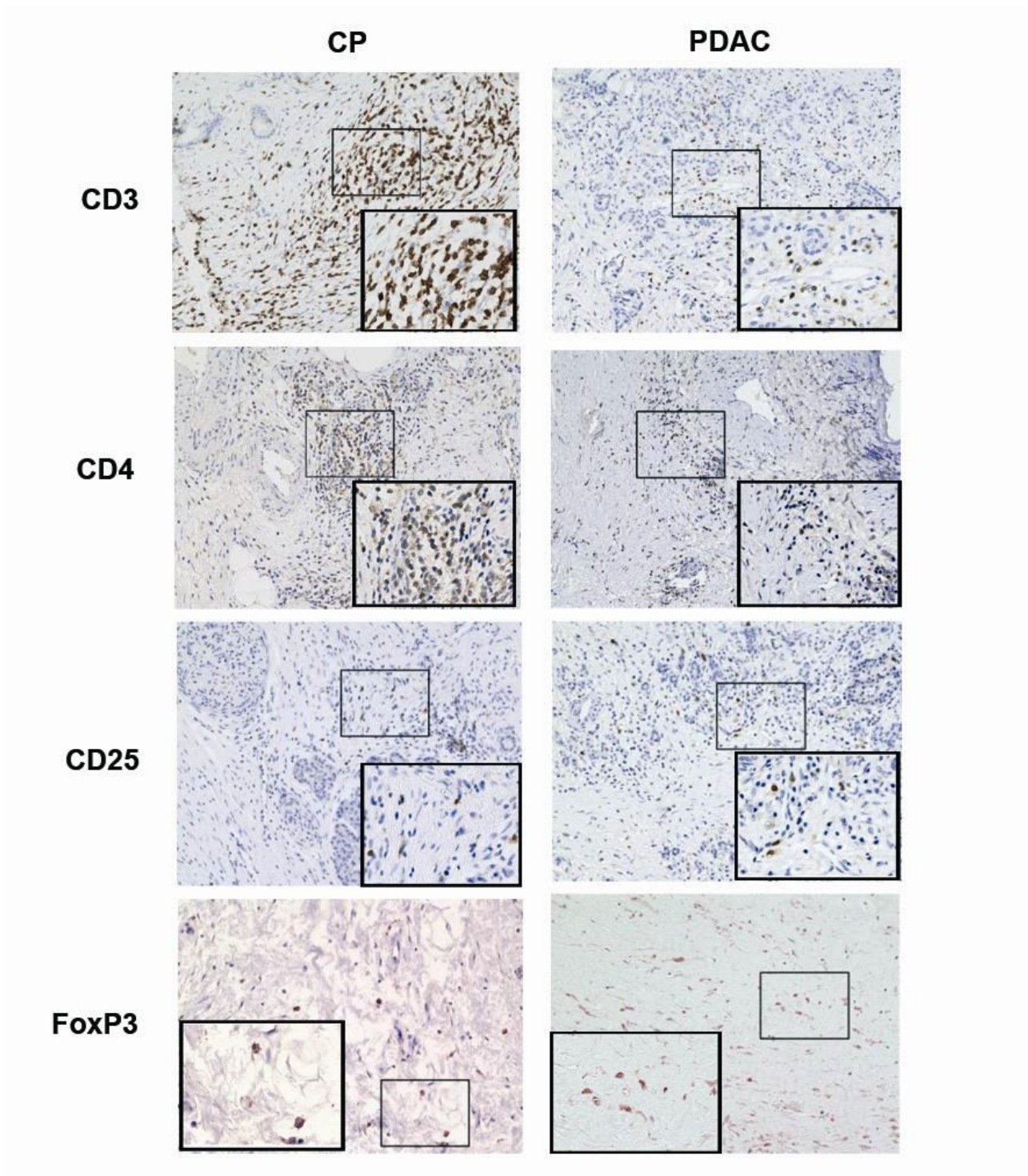
Hingegen wurden CD4+ Lymphozyten (B1) signifikant häufiger in hoher Anzahl in CPs als in PDACs nachgewiesen (14/15 Präparate Score II in CPs vs. 24/42 Präparate Score II in PDACs, p=0,004).

Diese Ergebnisse deuten auf einen erhöhten Anteil an CD4+T-Zellen, zu denen CD4+ Effektor-T-Zellen aber auch Tregs gehören, in den CPs hin.

Im Gegensatz dazu fanden sich in den PDACs statistisch signifikant höhere Anteile an CD25+ T-Zellen (C2) als in den CPs (3/15 Präparate Score II in CPs vs. 24/42 Präparate Score II in PDACs,

p=0,0015). Zusätzlich waren in den PDACs ebenfalls mehr FoxP3+ T-Zellen (D2) vertreten als in den CPs (4/15 Präparate Score II in CPs vs. 24/42 Präparate Score II in PDACs). Dieses Ergebnis lag jedoch mit p=0,068 knapp außerhalb des Signifikanzbereiches. Diese beiden Marker deuten auf ein vermehrtes Vorkommen von Tregs in den PDAC-Geweben hin. Die Abbildung 1 zeigt jeweils die vergleichenden immunhistochemischen Färbungen der Stromalen Parameter in den CP- und PDAC-Präparaten.

In Bezug auf die anderen Referenzparameter konnten keine signifikanten Einflüsse ermittelt werden.



**Abbildung 1: Immunhistochemische Färbungen des Stromas von CP und PDAC.** Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen für CD3, CD4, CD25 und FoxP3. In der linken Spalte sind die stromalen Färbungen der CPs aufgeführt, rechts die der PDACs. Die mikroskopischen Ausschnitte sind in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Zusätzlich befindet sich im unteren Bildausschnitt jeweils ein Ausschnitt in 800-facher Vergrößerung, der dem eingerahmten Bereich in der 200-fachen Vergrößerung entspricht.

Auch in den Untersuchungen der epithelialen/tumoralen Kompartimenten konnten zwischen den CPs und PDACs Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der untersuchten Parameter beobachtet werden (vgl. Tabelle 4.3).



**Tabelle 4.3: Gegenüberstellung der Ausprägung von epithelialen Parametern in CPs und tumoralen Parametern in PDACs.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15)		PDAC (n=42 <sup>2</sup> )		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
D3	FoxP3+ (% Epithel)	11 (I)	4 (II)	7 (I)	34 (II)	<b>p= &lt;0,001**</b>
D4	FoxP3+ (Intensität)	10 (I)	5 (II)	7 (I)	34 (II)	<b>p= &lt;0,001**</b>
D5	FoxP3+ (Score)	8 (I)	7 (II)	4 (I)	37 (II)	<b>p= 0,0013*</b>
E1	L1CAM+ (% Epithel)	5 (I)	10 (II)	19 (I)	22 (II)	p= 0,544
E2	L1CAM+ (Intensität)	13 (I)	2 (II)	20 (I)	21 (II)	<b>p= 0,014*</b>
E3	L1CAM+ (Score)	5 (I)	10 (II)	15 (I)	26 (II)	p= 1,0

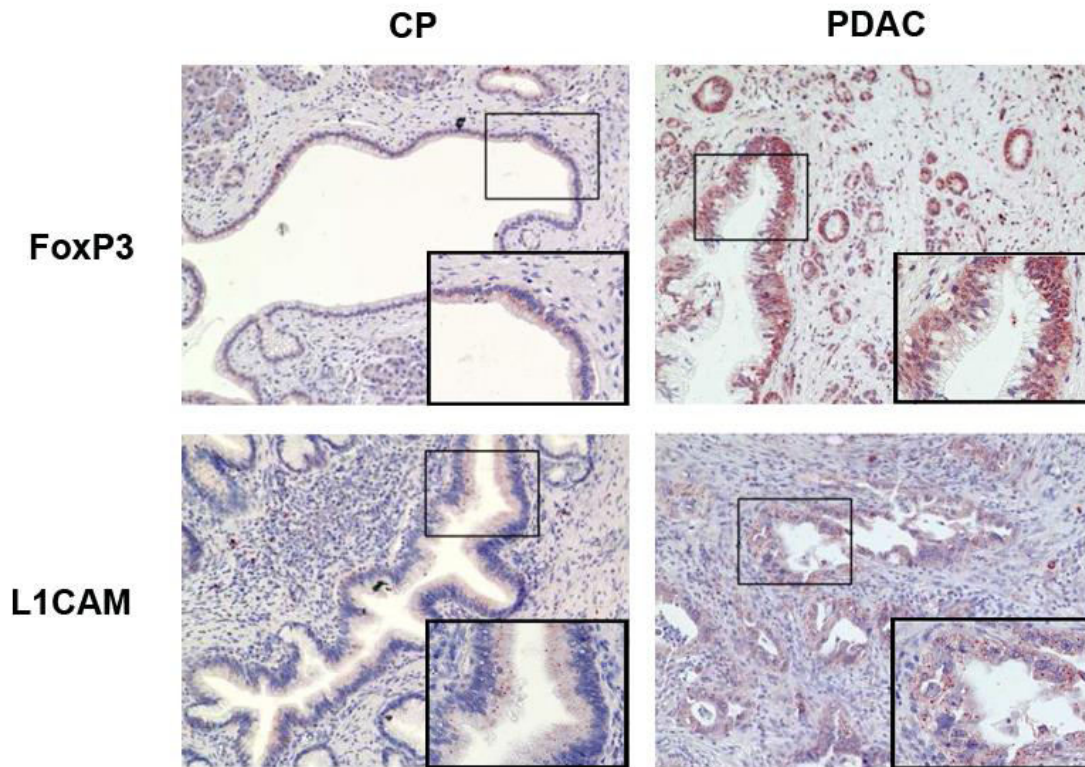
<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)  
<sup>2</sup> Färbungen CD25, FoxP3 und L1CAM von Präparat 42 nicht ausgewertet, daher bei diesen Färbungen n=41  
\*signifikantes Ergebnis (p=<0,05) / \*\*hoch-signifikantes Ergebnis (p=<0,001)

Obwohl eine epitheliale FoxP3-Expression (D3 und D4) in über 93% der CPs detektiert werden konnte (siehe Anhang, Abschnitt I, Tabellen Ia und Ic), erbrachte der direkte Vergleich signifikant höhere Anteile an FoxP3-exprimierenden Epithelzellen (D3, 4/15 Präparate Score II in CPs vs. 34/42 Präparate Score II in PDACs) und FoxP3-Intensitäten in den Präparaten der PDACs (D4, 5/15 Präparate Score II in CPs vs. 34/42 Präparate Score II in PDACs). Auch der im Anschluss an die mikroskopische Ermittlung von Anteilen und Intensitäten vergebene FoxP3-Gesamtscore konnte dieses Ergebnis unterstreichen (D5, 7/15 Score II in CPs vs. 37/42 Score II in PDACs).

Des Weiteren ergab der direkte Vergleich der epithelialen und tumoralen Kompartimente keine relevanten Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen der L1CAM-exprimierenden Epithelzellen (E1) in den Entzündungs- und Tumorgeweben. Hingegen wiesen unter den PDAC-Geweben, mit rund 51%, signifikant mehr Präparate eine erhöhte Intensität der L1CAM-Expression auf, als in der Gruppe der CPs, in denen der Score II der L1CAM-Intensität (nur in 13% der Fälle vergeben werden konnte (E2, 2/15 Präparate Score II in CPs vs. 21/41 Präparate Score II in PDACs). Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine stärker ausgeprägte L1CAM-Expression in den PDACs. Die Abbildung 2 stellt vergleichend repräsentative immunhistochemische Färbungen für FoxP3 und L1CAM in den CP- und PDAC-Präparaten dar.

In der Zusammenschau konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der Stromalen und epithelialen/tumoralen Parameter zwischen den PDACs und den CPs detektiert werden.





**Abbildung 2: Vergleichende immunhistochemische Färbungen des Epithels von CP und PDAC.** Dargestellt sind repräsentative Abbildungen der epithelialen/tumoralen immunhistochemischen Färbungen von FoxP3 und L1CAM. Zum Vergleich findet sich in der linken Spalte das Präparat der CP und rechtsseitig das PDAC-Präparat. Die mikroskopischen Ausschnitte sind in 200-facher Vergrößerung dargestellt. Zusätzlich befindet sich im unteren Bildausschnitt jeweils ein Ausschnitt in 800-facher Vergrößerung, der durch einen Rahmen hervorgehoben wird.

#### 4.4 Vergleich der Ausprägung stromaler und epithelialer/tumoraler Parameter in CP und PDAC unter Berücksichtigung des Tumorgradings

Um herauszufinden, ob zwischen den zuvor detektierten unterschiedlichen Ausprägungen der Parameter in CPs und PDACs und dem Differenzierungsgrad des Tumors ein Zusammenhang besteht, erfolgte die Auswertung in Abhängigkeit vom Tumorgrading in der PDAC-Gruppe. Dazu wurden die Ergebnisse der CPs jeweils mit den Resultaten von PDAC-Präparaten, die ein einheitliches Grading erhielten, verglichen und statistisch analysiert.

Der Vergleich zwischen den CPs und PDACs mit dem einheitlichen Tumorgrading G1 erbrachte einen signifikant geringeren Anteil an CD4+ Lymphozyten (B1) im Tumorgewebe (B1, 14/15 Präparate mit Score II in CPs vs. 2/6 Präparate mit Score II in PDACs mit Tumorgrading G1,  $p=0,011$ ).

Zusätzlich wiesen die PDAC-Präparate tendenziell, jedoch nicht signifikant, höhere Scores der Marker CD25 (C2, 3/15 Score II in CPs vs. 3/6 Score II in PDACs mit Tumorgrading G1,  $p=0,291$ ) und FoxP3 auf (D2, 4/15 Score II in CPs vs. 4/6 Score II in PDACs mit Tumorgrading G1,  $p=0,146$ ). Für alle anderen stromalen Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung im CP- und PDAC-Gewebe (Tumorgrading G1) festgestellt werden (s. Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4: Gegenüberstellung der Ausprägung von stromalen Parametern in CPs und in der Gruppe gut-differenzierter PDACs (Tumorgrading G1).** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Scores (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15) Fallzahl (Score)		G1 Tumore (n=6) Fallzahl (Score)		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
A1	CD3+ (Stroma)	0 (I)	15 (II)	0 (I)	6 (II)	n.b.
B1	CD4+ (Stroma)	1 (I)	14 (II)	4 (I)	2 (II)	<b>p= 0,011*</b>
B2	CD4+ (CD3)	0 (I)	15 (II)	1 (I)	5 (II)	p= 0,286
C1	CD25+ (CD3)	15 (I)	0 (II)	5 (I)	1 (II)	p= 0,286
C2	CD25+ (CD4)	12 (I)	3 (II)	3 (I)	3 (II)	p= 0,291
D1	FoxP3+ (CD3)	13 (I)	2 (II)	5 (I)	1 (II)	p= 1,0
D2	FoxP3+ (CD4)	11 (I)	4 (II)	2 (I)	4 (II)	p= 0,146

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)

n.b. = nicht berechenbar

\*signifikantes Ergebnis ( $p<0,05$ )

Ähnliche Ergebnisse lieferte auch der Vergleich der Intensität und Verteilung der duktaalen/tumoralen FoxP3-Expression (D3 und D4), die im PDAC-Gewebe mit dem Tumorgrading G1 eine tendenziell, jedoch nicht signifikant höhere Expression aufwiesen als die Vergleichsgruppe der CPs (D3, 4/15 Score II in CPs vs. 3/6 Score II in PDACs mit Tumorgrading G1,  $p=0,354$ ; D4,

5/15 Score II in CPs vs. 4/6 Score II in PDACs mit Tumorgrading G1,  $p=0,331$ ). Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der epithelialen Marker erbrachte lediglich die L1CAM-Intensität. Diese Färbung zeigte in Gruppe der PDACs (Tumorgrading G1) eine signifikant stärkere Intensität als die Vergleichsgruppe der CPs (E2, 2/15 Score II in CPs vs. 4/6 Score II in PDACs mit Tumorgrading G1,  $p=0,031$ ). (s. Tab 4.5)

Für alle anderen epithelialen/tumoralen Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung im CP- und PDAC-Gewebe (Tumorgrading G1) festgestellt werden (s. Tab. 4.5).

Die Tatsache, dass lediglich die Verteilung der CD4+ T-Zellen (B1) und die L1CAM-Intensität (E2) signifikante Unterschiede zwischen CP und PDAC (Tumorgrading G1) aufweisen, deuten darauf hin, dass die stromale und epitheliale/tumorale Zusammensetzung von CPs und gut-differenzierten PDACs noch sehr ähnlich ist.

**Tabelle 4.5: Gegenüberstellung der Ausprägung von epithelialen Parametern in CPs und tumoralen Parametern in der Gruppe gut-differenzierter PDACs (Tumorgrading G1).** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15) Fallzahl (Score)		G1 Tumore (n=6) Fallzahl (Score)		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
D3	FoxP3+ (% Epithel)	11 (I)	4 (II)	3 (I)	3 (II)	$p= 0,354$
D4	FoxP3+ (Intensität)	10 (I)	5 (II)	2 (I)	4 (II)	$p= 0,331$
D5	FoxP3+ (Score)	8 (I)	7 (II)	2 (I)	4 (II)	$p= 0,635$
E1	L1CAM+ (% Epithel)	5 (I)	10 (II)	2 (I)	4 (II)	$p= 1,0$
E2	L1CAM+ (Intensität)	13 (I)	2 (II)	2 (I)	4 (II)	<b><math>p= 0,031^*</math></b>
E3	L1CAM+ (Score)	5 (I)	10 (II)	1 (I)	5 (II)	$p= 0,623$

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)  
\*signifikantes Ergebnis ( $p<0,05$ )

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der gut-differenzierten PDAC-Präparate (Tumorgrading G1), waren auch in den mäßig-differenzierten PDACs (Tumorgrading G2) signifikant weniger CD4+ Lymphozyten zu finden als in den CPs (B1, 14/15 Score II in CPs vs. 11/23 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p=0,005$ ).

Im Gegensatz dazu war der Anteil der CD25+ Lymphozyten in diesen PDAC-Geweben ebenfalls signifikant höher als in den CPs (C2, 3/15 Score II in CPs vs. 13/22 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p=0,041$ ). Passend dazu konnte tendenziell eine stärkere FoxP3-Expression im Stroma der PDACs ermittelt werden. Dieses Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant (D2, 4/15 Score II in CPs vs. 11/22 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p=0,190$ ).

Die Untersuchung weiterer stromaler Parameter zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung zwischen CP- und PDAC-Gewebe (Tumorgrading G2, s. Tab. 4.6).

**Tabelle 4.6: Gegenüberstellung der Ausprägung von stromalen Parametern in CPs und in der Gruppe mäßig-differenzierter PDACs (Tumorgrading G2).** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15)		G2 Tumore (n=23 <sup>2</sup> )		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
A1	CD3+ (Stroma)	0 (I)	15 (II)	3 (I)	20 (II)	p= 0,264
B1	CD4+ (Stroma)	1 (I)	14 (II)	12 (I)	11 (II)	<b>p= 0,005*</b>
B2	CD4+ (CD3)	0 (I)	15 (II)	4 (I)	19 (II)	p= 0,138
C1	CD25+ (CD3)	15 (I)	0 (II)	21 (I)	1 (II)	p= 1,0
C2	CD25+ (CD4)	12 (I)	3 (II)	9 (I)	13 (II)	<b>p= 0,041*</b>
D1	FoxP3+ (CD3)	13 (I)	2 (II)	19 (I)	3 (II)	p= 1,0
D2	FoxP3+ (CD4)	11 (I)	4 (II)	11 (I)	11 (II)	p= 0,190

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)  
<sup>2</sup> Färbungen CD25, FoxP3 und L1CAM n=22  
\*signifikantes Ergebnis (p<0,05)

Im Unterschied zu den angedeuteten Beobachtungen unter den gut-differenzierten PDACs (Tumorgrading G1), zeigten die mäßig-differenzierten PDACs (Tumorgrading G2) im Vergleich zu den CPs sowohl hoch-signifikant erhöhte Anteile an FoxP3+ Tumorzellen (D3, 4/15 Score II in CPs vs. 19/22 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p < 0,001$ ) als auch eine signifikant erhöhte FoxP3-Intensität (D4, 5/15 Score II in CPs vs. 18/22 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p = 0,005$ ) in den duktalem/tumoralen Arealen. Dieses spiegelte sich dann auch im FoxP3-Gesamtscore wider (D5, 7/15 Score II in CPs vs. 18/22 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p = 0,005$ ).

Zusätzlich waren auch unter den PDACs, die den einheitlichen Tumordifferenzierungsgrad G2 erhielten, signifikant mehr Präparate mit einem hohen Score der Intensität der L1CAM-Färbung (E2) vertreten, als in der Gruppe der CPs (E2, 2/15 Score II in CPs vs. 21/22 Score II in PDACs mit Tumorgrading G2,  $p = 0,0012$ ). Hinsichtlich der prozentualen Verteilung der L1CAM-Färbung (E1) und dem Gesamtscore der L1CAM-Färbung (E3) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 4.7).

**Tabelle 4.7: Gegenüberstellung der Ausprägung von epithelialen Parametern in CPs und tumoralen Parametern in der Gruppe mäßig-differenzierter PDACs (Tumorgrading G2).** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15)		G2 Tumore (n=23 <sup>2</sup> )		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
D3	FoxP3+ (% Epithel)	11 (I)	4 (II)	3 (I)	19 (II)	p= <0,001**
D4	FoxP3+ (Intensität)	10 (I)	5 (II)	4 (I)	18 (II)	p= 0,005*
D5	FoxP3+ (Score)	8 (I)	7 (II)	1 (I)	21 (II)	p= 0,0012*
E1	L1CAM+ (% Epithel)	5 (I)	10 (II)	9 (I)	13 (II)	p= 0,738
E2	L1CAM+ (Intensität)	13 (I)	2 (II)	10 (I)	12 (II)	p= 0,016*
E3	L1CAM+ (Score)	5 (I)	10 (II)	6 (I)	16 (II)	p= 0,728

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)  
<sup>2</sup> Färbungen CD25, FoxP3 und L1CAM n=22  
 \*signifikantes Ergebnis (p=<0,05) / \*\*hoch-signifikantes Ergebnis (p=<0,001)

Im Vergleich zu den CPs konnten analog zu den Ergebnissen der mäßig-differenzierten PDACs auch in den PDACs mit dem einheitlichen Tumorgrading G3 erhöhte Anteile an CD25+ (C2, 3/15 Score II in CPs vs. 8/13 Score II in PDACs mit Tumorgrading G3, p=0,051) und FoxP3+ Tregs (D2, 4/15 Score II in CPs vs. 9/13 Score II in PDACs mit Tumorgrading G3, p=0,056) detektiert werden. Diese Ergebnisse lagen jeweils knapp außerhalb des signifikanten Bereiches.

Für alle anderen stromalen Parameter konnten keine tendenziellen oder signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung im CP- und PDAC-Gewebe (Tumorgrading G3) festgestellt werden (s. Tab. 4.8).

**Tabelle 4.8: Gegenüberstellung der Ausprägung von stromalen Parametern in CPs und in der Gruppe schlecht-differenzierter PDACs (Tumorgrading G3).** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15)		G3 Tumore (n=13)		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
A1	CD3+ (Stroma)	0 (I)	15 (II)	2 (I)	11 (II)	p= 0,206
B1	CD4+ (Stroma)	1 (I)	14 (II)	5 (I)	8 (II)	p= 0,069
B2	CD4+ (CD3)	0 (I)	15 (II)	1 (I)	12 (II)	p= 0,464
C1	CD25+ (CD3)	15 (I)	0 (II)	12 (I)	1 (II)	p= 0,464
C2	CD25+ (CD4)	12 (I)	3 (II)	5 (I)	8 (II)	p= 0,051
D1	FoxP3+ (CD3)	13 (I)	2 (II)	9 (I)	4 (II)	p= 0,372
D2	FoxP3+ (CD4)	11 (I)	4 (II)	4 (I)	9 (II)	p= 0,056

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)

Verglichen mit den CPs waren unter den schlecht-differenzierten PDACs (Tumorgrading G3) hoch-signifikant höhere Anteile an FoxP3+ Tumorzellen (D3, 4/15 Score II in CPs vs. 12/13 Score II in PDACs mit Tumorgrading G3, p=<0,001) und signifikant höhere Intensitäten der

duktalen/tumoralen FoxP3-Färbung (D4, 5/15 Score II in CPs vs. 12/13 Score II in PDACs mit Tumorgrading G3, p=0,002) nachweisbar. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den PDACs mit geringerem Tumorgrading und spiegeln sich im FoxP3-Gesamtscore wider (D5, 7/15 Score II in CPs vs. 12/13 Score II in PDACs mit Tumorgrading G3, p=0,016).

Weitere Unterschiede bezüglich der Ausprägung epithelialer/tumoraler Marker zwischen CPs und schlecht-differenzierten PDACs konnten nicht detektiert werden (s. Tab. 4.9).

**Tabelle 4.9: Gegenüberstellung der Ausprägung von epithelialen Parametern in den CPs und tumoralen Parametern in der Gruppe schlecht-differenzierter PDACs (Grading G3).** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Scores (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der Verteilung der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	CP (n=15)		G3 Tumore (n=13)		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
D3	FoxP3+ (% Epithel)	11 (I)	4 (II)	1 (I)	12 (II)	<b>p= &lt;0,001**</b>
D4	FoxP3+ (Intensität)	10 (I)	5 (II)	1 (I)	12 (II)	<b>p= 0,002*</b>
D5	FoxP3+ (Score)	8 (I)	7 (II)	1 (I)	12 (II)	<b>p= 0,016*</b>
E1	L1CAM+ (% Epithel)	5 (I)	10 (II)	8 (I)	5 (II)	p= 0,266
E2	L1CAM+ (Intensität)	13 (I)	2 (II)	8 (I)	5 (II)	p= 0,198
E3	L1CAM+ (Score)	5 (I)	10 (II)	8 (I)	5 (II)	p= 0,255

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der Vergleichspopulation (in Klammern)  
\*signifikantes Ergebnis (p=<0,05) / \*\*hoch-signifikantes Ergebnis (p=<0,001)

Da die Unterschiede zwischen CPs und gut-differenzierten PDACs geringer sind als zwischen den CPs und mäßig-/schlecht-differenzierten Tumoren, deuten diese Daten in der Zusammenschau auf eine Zunahme von stromalen und epithelialen/tumoralen Veränderungen mit fortschreitender Entdifferenzierung hin.



## 4.5 Interaktionen zwischen den stromalen und epithelialen/tumoralen Parametern

Eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der stromalen und epithelialen/tumoralen Parameter innerhalb der CP- bzw. PDAC-Gruppe wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests berechnet. Zunächst erfolgte die statistische Auswertung der Interaktion in den Präparaten der CPs. Anschließend wurde die Interaktion in den PDACs ermittelt.

### 4.5.1 Zusammenhang stromaler und epithelialer Parameter im CP-Gewebe

Die statistischen Auswertungen erbrachten keine signifikante Korrelation zwischen den Parametern CD25 (C1 und C2) und FoxP3 in den Lymphozyten (D1 und D2), welche beide zur Detektion von Tregs genutzt werden. Des Weiteren zeigten diese Parameter auch keine signifikanten Interaktionen mit anderen stromalen und epithelialen Markern.

Während geringe Anteile an FoxP3+ Epithelien (D3) und geringe epitheliale FoxP3-Intensitäten (D4) sowohl in Verbindung mit niedrigen als auch mit hohen Anteilen an L1CAM+ Epithelien (E1) vorkamen, traten hohe FoxP3-Scores (D3 und D4) immer nur in Kombination mit hohen L1CAM-Anteilen (E1) auf. Diese Zusammenhänge lagen jedoch außerhalb des Signifikanzbereiches.

Im Gegensatz zu diesen Parametern bestanden positive Korrelationen zwischen dem FoxP3-Score (D5) und dem Anteil des L1CAM-gefärbten Epithels (E1) sowie dem L1CAM-Score (E3). Diese erreichten jeweils eine statistische Signifikanz von  $p=0,026$ .

Präparate mit einer niedrigen Intensität der FoxP3-Epithel-Färbung (D4) wiesen ausschließlich eine niedrige Intensität der L1CAM+ Epithelien (E2) auf. Hingegen korrelierte eine hohe epitheliale FoxP3-Intensität in 40% der Fälle mit einer hohen Intensität der L1CAM-Färbung. Diese positive Korrelation zwischen den Intensitäten der epithelialen FoxP3-Färbung (D4) und L1CAM-Färbung (E2) war jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Auswertung weiterer Konstellationen erbrachte weder tendenzielle noch signifikante gegenseitige Beeinflussungen innerhalb der untersuchten Parameter (siehe Tabelle 4.10).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der CPs auf eine positive Korrelation zwischen der Expression von FoxP3 im Epithel und der epithelialen L1CAM-Expression hin.

**Tabelle 4.10: Assoziation zwischen den Stromalen und epithelialen Parametern in CP-Geweben.** Während in der ersten Spalte die untersuchten Parameter aufgeführt sind, zeigt die erste Zeile die jeweiligen Bezugparameter. Zwischen diesen wurde jeweils der Effekt einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung ermittelt. Die aufgeführten Werte stellen den p-Wert als Ausdruck für die Signifikanz dar. Diese wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests berechnet.

Parameter	Code	B1	B2	C1	C2	D1	D2	D3	D4	D5	E1	E2	E3
CD3+ (Stroma)	A1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CD4+ (Stroma)	B1		n.b.	n.b.	1,0	0,133	0,267	1,0	1,0	1,0	0,333	1,0	0,333
CD4+ (CD3)	B2			n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CD25+ (CD3)	C1				n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
CD25+ (CD4)	C2					0,371	1,0	1,0	1,0	1,0	0,505	1,0	0,505
FoxP3+ (CD3)	D1						0,057	0,476	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FoxP3+ (CD4)	D2							0,516	1,0	1,0	0,560	1,0	0,560
FoxP3+ (% Epi.)	D3								0,560	<b>0,026*</b>	0,231	1,0	0,231
FoxP3+ (Intens.)	D4									<b>0,007*</b>	0,101	0,095	0,101
FoxP3 Score	D5										<b>0,026*</b>	0,200	<b>0,026*</b>
L1CAM+ (% Epi.)	E1											0,524	<b>0,00**</b>
L1CAM+ (Intens.)	E2												0,524
L1CAM Score	E3												

Abkürzungen: Epi. = Epithel; Int. = Intensität.  
n.b. = nicht berechnet, da eine der beiden Variablen nur einen Freiheitsgrad besitzt  
\*signifikantes Ergebnis (p<0,05) / \*\*hoch-signifikantes Ergebnis (p<0,001)

#### 4.5.2 Zusammenhang Stromaler und epithelialer/tumoraler Parameter im PDAC-Gewebe

In der statistischen Auswertung der Parameter der PDACs ergab sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD3+ T-Zellen (A1) und dem Anteil der CD4+ Lymphozyten (B1) (p=0,048).

Hingegen korrelierte der Anteil der CD4+ Lymphozyten (B1) invers mit den Anteilen an CD25+ (D2) und FoxP3+ T-Zellen (D2) im Stroma der PDACs. Diese Effekte erreichten jeweils einen statistisch signifikanten Wert von p=0,028. Eine negative gegenseitige Beeinflussung konnte auch zwischen den CD4+ T-Zellen (B1) und dem FoxP3+ Tumorepithel (D3) beobachtet werden (p=0,045).

Im Gegensatz dazu bestand in den PDAC-Geweben eine signifikante (p=0,014) positive Korrelation zwischen dem Ausmaß des FoxP3+ Tumorepithels (D3) und dem Anteil der FoxP3+ T-Zellen (D2). Zwischen der Intensität des FoxP3+ Tumorepithels (D4) und den FoxP3+ T-Lymphozyten (D2) konnte keine Beeinflussung beobachtet werden.

Während niedrige Anteile des FoxP3+ Epithels (D3) in einem ausgeglichenen Verhältnis mit hohen und niedrigen FoxP3-Intensitäten (D4) einhergingen, korrelierte ein hoher FoxP3+ Epithelanteil (D3) zu 88% mit einer hohen FoxP3-Intensität (D4). Dieser positive Zusammenhang lag jedoch knapp außerhalb des Signifikanzbereiches.

Tendenziell, wenn auch außerhalb des Signifikanzbereichs, zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen dem Anteil des L1CAM-gefärbten Epithels (E1) und dem Anteil an



FoxP3+ Lymphozyten (D2).

Zwischen der Expression von FoxP3 (D3) und L1CAM (E1) in den Tumorzellen konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Lediglich der Anteil des FoxP3+ Tumorepithels (D3) schien mit der Intensität der L1CAM-Färbung (E2) in einer leichten Assoziation zu stehen. Zwischen der L1CAM-Intensität (E2) und dem Anteil des L1CAM+ Epithels (E1) konnte ein hochsignifikanter Effekt beobachtet werden ( $p=0,001$ ). Während eine niedrige L1CAM-Intensität (E2) vor allem mit einem geringeren Anteil an L1CAM+ Epithel (E1) assoziiert war, traten hohe L1CAM-Intensitäten (E2) gehäuft in Verbindung mit hohen L1CAM-Anteilen (E1) auf.

Die Auswertung weiterer Konstellationen erbrachte weder tendenzielle noch signifikante gegenseitige Beeinflussungen (siehe Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11: Assoziation zwischen den stromalen und epithelialen/tumoralen Parametern in den Geweben von PDAC-Patienten.** Während in der ersten Spalte die untersuchten Parameter aufgeführt sind, zeigt die erste Zeile die jeweiligen Bezugsparemeter. Zwischen diesen wurde jeweils der Effekt einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung ermittelt. Die aufgeführten Werte stellen den p-Wert als Ausdruck für die Signifikanz dar. Diese wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests berechnet.

Parameter	Code	B1	B2	C1	C2	D1	D2	D3	D4	D5	E1	E2	E3
CD3+ (Stroma)	A1	<b>0,048*</b>	0,557	1,0	0,382	0,246	1,000	0,567	0,567	1,0	0,350	0,343	0,139
CD4+ (Stroma)	B1		<b>0,021*</b>	0,606	<b>0,028*</b>	0,697	<b>0,028*</b>	<b>0,045*</b>	0,697	0,343	0,758	0,217	0,751
CD4+ (CD3)	B2			0,386	0,373	0,323	0,373	0,567	0,567	1,0	0,390	0,410	0,168
CD25+ (CD3)	C1				0,254	1,0	1,0	0,439	1,0	1,0	0,588	0,606	0,543
CD25+ (CD4)	C2					0,698	0,748	0,421	1,0	1,0	1,0	0,756	1,0
FoxP3+ (CD3)	D1						<b>0,013*</b>	0,310	1,0	0,569	0,436	0,697	0,687
FoxP3+ (CD4)	D2							<b>0,014*</b>	0,105	0,290	0,112	0,756	0,519
FoxP3+ (% Epi.)	D3								0,082	<b>0,012*</b>	1,0	0,238	0,693
FoxP3+ (Intens.)	D4									0,001	0,419	0,697	1,0
FoxP3 Score	D5										0,610	1,0	1,0
L1CAM+ (% Epi.)	E1											<b>0,00**</b>	<b>0,00**</b>
L1CAM+ (Intens.)	E2												<b>0,00**</b>
L1CAM Score	E3												

Abkürzungen: Epi. = Epithel; Int. = Intensität.  
n.b. = nicht berechnet, da eine der beiden Variablen nur einen Freiheitsgrad besitzt  
\*signifikantes Ergebnis ( $p<0,05$ ) / \*\*hoch-signifikantes Ergebnis ( $p<0,001$ )

Zusammenfassend konnte in den Präparaten der PDACs beobachtet werden, dass der Anteil der CD4+ Lymphozyten mit steigendem Ausmaß an Tregs und erhöhter FoxP3-Expression der Tumorzellen zu sinken scheint. Des Weiteren schien der Anteil der Tregs negativ mit der tumoralen L1CAM-Expression zu assoziieren.

Hingegen ging ein Anstieg des Anteils an FoxP3+ Tregs auch mit einer vermehrten tumoralen FoxP3-Expression einher. Zusätzlich standen sowohl die Intensität der FoxP3-Expression mit dem Anteil an FoxP3+ Tumorzellen als auch die Intensität der L1CAM-Färbung mit dem Anteil des L1CAM+ Tumorepithels in einem positiven Zusammenhang. Zwischen der epithelialen Expression von L1CAM und FoxP3 bestand jedoch keine signifikante gegenseitige Beeinflussung.

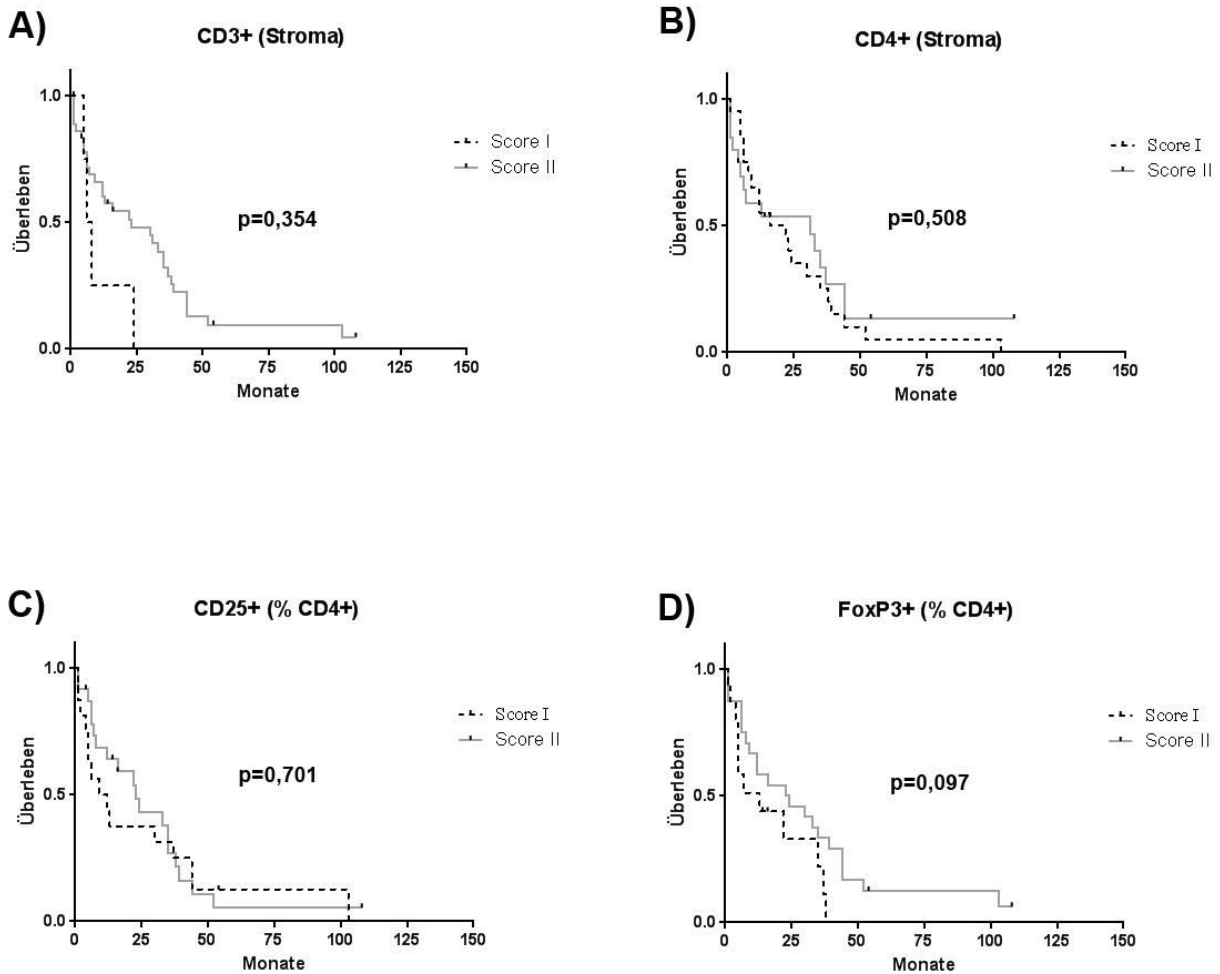
#### **4.6 Einfluss der einzelnen Parameter auf die Überlebenszeit bei PDAC-Patienten**

In einem weiteren Schritt wurden die Einflüsse der einzelnen Stromalen und tumoralen Parameter auf die Überlebenszeit der PDAC-Patienten mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven bestimmt.

Obwohl ein hoher Anteil an CD3+ Lymphozyten (Abb. 3A) tendenziell einen protektiven Effekt auf das Überleben zu haben schien, erwies sich diese Beobachtung statistisch als nicht signifikant ( $p=0,354$ ). Im Gegensatz dazu schien der Anteil an CD4+ T-Zellen (Abb. 3B) weder einen signifikanten noch tendenziellen Einfluss auf das Überleben zu haben.

In der Kaplan-Meier-Kurve der CD25+ T-Zellen (Abb. 3C) ergaben sich in den ersten 36 Monaten der Nachbeobachtung diskrete Hinweise auf eine Assoziation zwischen einer erhöhten Anzahl an CD25+ T-Zellen und einem Überlebensvorteil. Später konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr nachgewiesen werden ( $p= 0,701$ ).

Ein hoher Anteil an FoxP3+ T-Zellen (Abb. 3D) erbrachte tendenziell ( $p=0,097$ ) Hinweise auf einen prognostischen Vorteil.



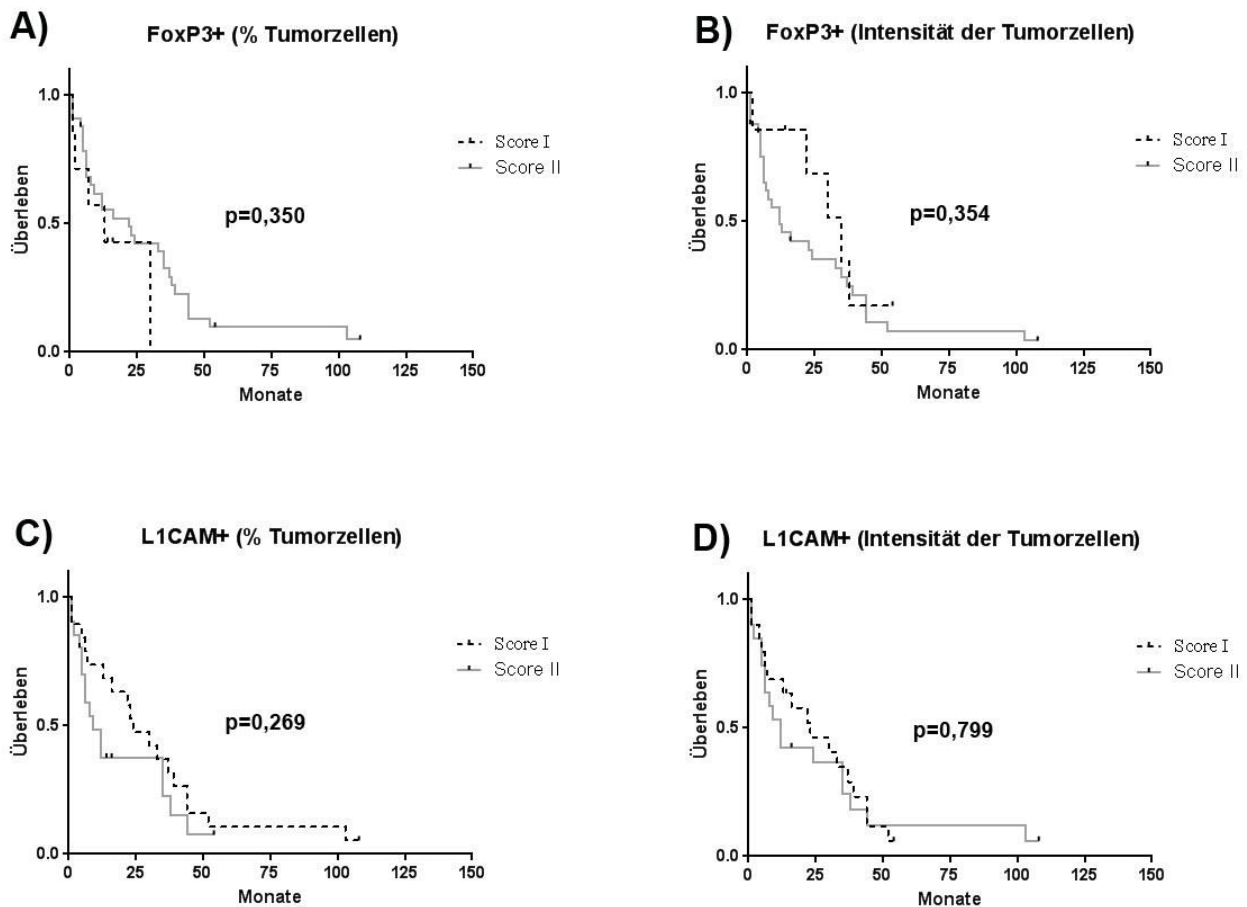
**Abb. 3: Korrelation zwischen der Ausprägung der stromalen Parameter im PDAC und der Überlebenszeit der Patienten.** Die Kaplan-Meyer-Kurven zeigen jeweils den Einfluss von (A) CD3+ Zellen (bezogen auf das Stroma), (B) CD4+ Zellen (bezogen auf das Stroma), (C) CD25+ Zellen (bezogen auf CD4+ T-Zellen) und (D) FoxP3+ Zellen (bezogen auf CD4+ T-Zellen) auf das Überleben von PDAC-Patienten mit dem Tumorstadium T3N1M0.

In der Auswertung der tumoralen Parameter hatte der Anteil an FoxP3+ Karzinomzellen (Abb. 4A) keinen Einfluss auf das Überleben. Hingegen schien sich eine hohe Intensität von FoxP3 in den Tumorzellen (Abb. 4B) zumindest innerhalb der ersten 36 Monate tendenziell ( $p=0,354$ ) negativ auf die Überlebenszeit auszuwirken. Wie aus diesen Vorergebnissen zu erwarten war, lieferte auch der Gesamtscore, basierend auf der Intensität und dem Anteil des positiv-gefärbten Epithels, keine signifikanten Unterschiede (nicht graphisch dargestellt).

Ein hoher Anteil an L1CAM-exprimierenden Tumorzellen (Abb. 4C) erweckte den Eindruck, in den ersten 36 Monaten nach der Tumoroperation mit einer geringeren Überlebenszeit assoziiert zu sein. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zur Annäherung der beiden Überlebenskurven, sodass der Prozentsatz der L1CAM-exprimierenden Tumorzellen keinen relevanten Einflussfaktor darstellte.

Die Intensität der L1CAM-Expression in Tumorzellen (Abb. 4D) wirkte sich ebenfalls nicht signifikant auf die Überlebenszeit aus ( $p=0,799$ ).

Die Auswertung von weiteren Parametern inklusive des Tumorgradings ( $p=0,510$ ) erbrachten keine Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Überlebenszeit (nicht graphisch dargestellt).



**Abb. 4: Korrelation zwischen der Ausprägung der tumoralen Parameter im PDAC und der Überlebenszeit der Patienten.** Die Kaplan-Meyer-Kurven zeigen jeweils den Einfluss von (A) FoxP3+ Tumorzellen (in Relation zur Gesamtheit der Tumorzellen), (B) FoxP3+ Intensität der Tumorzellen, (C) L1CAM+ Tumorzellen (in Relation zur Gesamtheit der Tumorzellen), und (D) L1CAM+ Intensität der Tumorzellen auf das Überleben von PDAC-Patienten mit dem Tumorstadium T3N1M0.

#### 4.7 Einfluss der einzelnen Parameter auf das Überleben innerhalb von 24 Monaten

Nachdem der Einfluss einzelner Parameter auf das Überleben über die gesamte Nachbeobachtungszeit betrachtet wurde, erfolgte eine gezielte Analyse möglicher Assoziationen zwischen der Ausprägung der Parameter und einer Beeinflussung der Sterblichkeit nach 24 Monaten. Dazu wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt, um gezielt den Einfluss einzelner Parameter in dieser frühen postoperativen Phase zu ermitteln. Da fünf Patienten innerhalb der ersten 24 Monate aus der Nachbeobachtung herausfielen, wurden diese nicht in die Berechnungen einbezogen. Es ergab sich somit eine Größe des Patientenkollektivs von  $n=36$ .

Wie in den Tabellen 4.12 und 4.13 ersichtlich, konnte jedoch auch dieses Verfahren keinerlei

signifikante Einflüsse zwischen der Ausprägung der Parameter und dem Überleben innerhalb der ersten 24 Monate aufzeigen.

**Tabelle 4.12: Assoziation zwischen der Ausprägung stromaler Parameter der PDAC-Patienten und dem Überleben 24 Monate nach der Operation.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	Tod <24 Monate		Überleben >24 Monate		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
A1	CD3+ (Stroma)	4 (I)	18 (II)	0 (I)	15 (II)	p= 0,131
B1	CD4+ (Stroma)	13 (I)	9 (II)	7 (I)	8 (II)	p= 0,516
B2	CD4+ (CD3)	4 (I)	18 (II)	2 (I)	13 (II)	p= 1,0
C1	CD25+ (CD3)	21 (I)	1 (II)	13 (I)	1 (II)	p= 1,0
C2	CD25+ (CD4)	10 (I)	12 (II)	6 (I)	8 (II)	p= 1,0
D1	FoxP3+ (CD3)	18 (I)	4 (II)	10 (I)	4 (II)	p= 0,683
D2	FoxP3+ (CD4)	9 (I)	13 (II)	3 (I)	11 (II)	p= 0,292

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der positiv gefärbten Vergleichspopulation  
\* Färbungen CD25, FoxP3 und L1CAM von Präparat 42 nicht ausgewertet, daher bei diesen Färbungen n=36

**Tabelle 4.13: Assoziation zwischen der Ausprägung tumoraler Parameter der PDAC-Patienten und dem Überleben 24 Monate nach der Operation.** Angegeben sind jeweils die Anzahl der Präparate, die den jeweiligen Score (in Klammern) erhielten. Zusätzlich ist die Signifikanz der jeweiligen Parameter als Vergleich zwischen CP und PDAC angegeben. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Code	Parameter (bezogen auf <sup>1</sup> )	Tod <24 Monate		Überleben >24 Monate		Signifikanz (Exakter Test nach Fisher)
		Fallzahl (Score)		Fallzahl (Score)		
D3	FoxP3+ (% Epithel)	4 (I)	18 (II)	1 (I)	13 (II)	p= 0,628
D4	FoxP3+ (Intensität)	2 (I)	20 (II)	4 (I)	10 (II)	p= 0,181
D5	FoxP3+ (Score)	1 (I)	21 (II)	2 (I)	12 (II)	p= 0,547
E1	L1CAM+ (% Epithel)	10 (I)	12 (II)	9 (I)	5 (II)	p= 0,321
E2	L1CAM+ (Intensität)	10 (I)	12 (II)	8 (I)	6 (II)	p= 0,733
E3	L1CAM+ (Score)	8 (I)	14 (II)	7 (I)	7 (II)	p= 0,499

<sup>1</sup> bezogen auf den prozentualen Anteil der positiv gefärbten Vergleichspopulation  
\* Färbungen CD25, FoxP3 und L1CAM von Präparat 42 nicht ausgewertet, daher bei diesen Färbungen n=36

## 5 Diskussion

Das PDAC stellt eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen in Deutschland dar.[1] Die schlechte Prognose ist einerseits auf eine geringe oder fehlende Frühsymptomatik zurückzuführen, da diese häufig zu einer verzögerten Diagnosestellung im fortgeschrittenen Tumorstadium führt.[11, 87] Andererseits bestehen in den Tumorzellen häufig Apoptosestörungen und Chemoresistenzen, wodurch sich das schlechte Ansprechen auf eine Chemotherapie erklären lässt.[86] Histopathologisch kommt es im PDAC zu einer ausgeprägten entzündlichen Reaktion und einer stromalen Umwandlung (Desmoplasie).[17] Im Rahmen der Desmoplasie produzieren die Tumorzellen und die aktivierten PSCs/Myofibroblasten große Mengen an Kollagen Typ I/III und Fibronectin.[127] Bachem et al. konnten anhand eines Mausmodells zeigen, dass sich die subkutane Implantation von PDAC-Zellen zusammen mit PSCs positiv auf das Tumorwachstum auswirkt.[22] Zusätzlich konnten zahlreiche Studien belegen, dass diese stromalen Veränderungen auch einen negativen Einfluss auf das therapeutische Ansprechen ausüben.[26-29, 128]

Darüber hinaus kommt es im Tumorstroma zu einer Anreicherung von Immunzellen, zu denen unter anderem die Tregs zählen.[20]

Hiraoka et al. konnten nicht nur eine Anreicherung von Tregs im PDAC-Stroma gegenüber nicht-malignem Pankreasgewebe detektieren, sondern diesen ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit zuweisen.[41] Ein wesentlicher Mechanismus ist dabei die Funktion der Tregs, die zur Unterdrückung der Reaktion des Immunsystems gegen die Tumorzellen führt und somit zum Tumorwachstum beiträgt.[42] Eine wichtige Rolle in der Vermittlung dieser Immuntoleranz gegenüber dem Tumor scheint dabei der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 zuzukommen.[47] Neben der zuerst beschriebenen Expression in den Tregs konnte FoxP3 auch in anderen Geweben nachgewiesen werden.[46, 95, 96] Dabei konnte gezeigt werden, dass die FoxP3-Expression in den Tumorzellen nicht nur mit einer Abnahme der Anzahl der Effektor-T-Zellen einhergeht, sondern ebenfalls einen negativen Effekt auf die Überlebenszeit auszuüben scheint.[46, 99]

Über diese Veränderungen hinaus konnten Geismann et al. zeigen, dass eine Zunahme von pankreatischen Myofibroblasten zu einer erhöhten duktalem/tumoralen Expression von L1CAM beitragen. So konnte eine erhöhte L1CAM-Expression bereits in Präparaten von CPs beobachtet werden.[112] Dieses Adhäsionsmolekül konnte in verschiedenen Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert werden.[109-111] Das ist unter anderem der Vermittlung pro-tumorigener Effekte, wie einer gesteigerten Zellmigration, dem Schutz vor Apoptose sowie der Ausbildung von Chemoresistenz, geschuldet.[115, 120]

Da sowohl die CP als auch das PDAC durch eine massive Zunahme der stromalen Komponente gekennzeichnet sind, wurden Gewebeproben der beiden Patientengruppen mikroskopisch

untersucht, um anschließend durch den direkten Vergleich eine bessere Charakterisierung zu erzielen. Im Unterschied zu vorherigen Studien wurden in dieser Arbeit ausschließlich Tumore mit dem einheitlichen Staging T3N1M0 verwendet, da der Vergleich innerhalb dieser einheitlichen Gruppe von PDACs eine bessere Aussage über den prädiktiven/prognostischen Wert der einzelnen Marker auf die Überlebenszeit zulässt und zusätzlich im direkten Vergleich zwischen CP und PDAC aufschlussreicher ist.[41, 96, 112]

In einer zuvor durchgeführten Studie konnten mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse vielzählige Unterschiede zwischen dem Stroma von CP und PDAC detektiert werden.[129]

In den Präparaten der PDACs konnte eine signifikant vermehrte stromale Expression von CD25 (Code: C2) in T-Lymphozyten und gleichermaßen eine gegenüber den CPs deutlich verstärkte, jedoch nicht signifikante, FoxP3-Expression (Code: D2) in den T-Lymphozyten detektiert werden. Die Ergebnisse dieser beiden Marker für Tregs deuten auf eine Anreicherung dieser T-Zellpopulation im PDAC-Gewebe hin und stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Hiraoka et al.[41] und Nummer et al.[130]. Die Anreicherung von Tregs führt zur Vermittlung immunsuppressiver Effekte im karzinomatösen Gewebe.[39, 131] Der erhöhte Anteil an Tregs in den PDACs ist einerseits durch eine Chemokin-vermittelte Anreicherung von natürlichen Tregs im Tumorgewebe zu erklären. Andererseits führt die Produktion von TGF- $\beta$  durch die Tumorzellen zur Bildung von induzierten Tregs.[56, 57, 132]

Unter Berücksichtigung des Tumorgradings konnten ein signifikant erhöhter Anteil an CD25+ T-Zellen (Code: C2) sowie einen nicht signifikanten, aber deutlich höheren Anteil an FoxP3+ T-Zellen (Code: D2) in den PDACs mit schlechter Differenzierung gefunden werden.

Zusammengefasst deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass es mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumorzellen zur vermehrten Anreicherung von Tregs im PDAC kommt.

Im Gegensatz zu Hiraoka et al.[41], die diesen Effekt in den PDACs ebenfalls beschreiben konnten, lag dieser Arbeit ein homogenes Patientenkollektiv mit dem einheitlichen Staging T3N1M0 zugrunde, was die Aussagekraft der detektierten Differenzen erhöht.

In Konkordanz mit den Beobachtungen aus zahlreichen vorhergehenden Studien[95, 96, 98], konnte FoxP3 zusätzlich zur Expression in Tregs auch in Tumorzellen der PDACs nachgewiesen werden. Nachdem Hinz et al. bereits eine durch TGF- $\beta$ 2 induzierte, tumorale FoxP3-Expression in PDAC-Zellen nachweisen konnten [96], gelang es in dieser Arbeit zusätzlich, eine Expression im entzündlichen Gewebe von CPs zu beobachten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Anteil (Code: D3) der epithelialen Expression von FoxP3 in den PDACs quantitativ höher ist, als in den CPs. Diese Beobachtung betraf auch die Intensität der tumoralen FoxP3-Färbung (Code: D4).

Über diese Erkenntnisse hinausgehend wurde eine mit steigendem Entdifferenzierungsgrad

(Grading) zunehmende FoxP3-Expression im Tumorepithel (Code: D3) detektiert. Zudem korrelierte auch die Intensität der FoxP3-Färbung (Code: D4) positiv mit dem Tumorgrading.

Karanikas et al. konnten *in vitro* einen positiven Zusammenhang zwischen der tumoralen Expression von FoxP3 und der Expression immunsuppressiv wirkender Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  darstellen.[98] Darüber hinaus konnten Hinz et al. *in vitro* zeigen, dass die Proliferation von T-Zellen in Gegenwart von FoxP3+ PDAC-Zellen gehemmt wird.[96] Unter Betrachtung dieser Erkenntnisse deuten die aktuellen Ergebnisse auf eine den Tregs ähnelnde Funktion der FoxP3-exprimierenden Tumorzellen hin. Diese These wird durch den bereits beschriebenen einheitlichen Anstieg von Tregs im PDAC bekräftigt.

Nachdem Geismann et al. sowohl in CPs als auch in PDACs eine positive duktale/tumorale L1CAM-Expression feststellen konnten[112], erfolgte in der aktuellen Arbeit eine differenziertere Auswertung unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils (Code: E1) und der Intensität (Code: E2) der L1CAM-Färbung. Die ermittelten Werte wurden u.a. mit der Infiltration unterschiedlicher T-Zell-Populationen verglichen. Während der Anteil der L1CAM-positiven Tumor-/Epithelzellen (Code: E1) in den untersuchten Präparaten zwischen PDAC und CP nicht unterschied, zeigten die Präparate der PDACs eine signifikant stärkere Intensität der L1CAM-Färbung (Code: E2). Nachdem Satoh et al. bereits eine tendenziell stärkere TGF- $\beta$ 1-Expression im Stroma der PDACs im Vergleich zu den CPs detektieren konnten[133], wurde später ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von TGF- $\beta$ 1 und der L1CAM-Expression von duktalem/tumoralen Pankreasepithelzellen festgestellt.[112] Da neben Immunzellen sowohl Fibroblasten als auch Tumorzellen/Epithelzellen für die Expression von TGF- $\beta$  verantwortlich sein können[134], ist die stärkere L1CAM-Intensität (Code: E2) in den PDACs möglicherweise durch eine vermehrte Bildung von TGF- $\beta$ 1, einerseits durch die Tumorzellen und andererseits durch den im Vergleich zu den CPs größeren Anteil an Fibroblasten, zu erklären. Einen Hinweis dafür, dass die Entdifferenzierung der Tumorzellen hierbei eine entscheidende Rolle spielen könnte, lieferte die statistische Auswertung unter Berücksichtigung des Tumorgradings. Hier erreichte die Korrelation der L1CAM-Intensität (Code: E2) zwischen den mäßig-differenzierten PDACs und den CPs eine höhere Signifikanz als der Vergleich zwischen den gut-differenzierten PDACs und den CPs. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen lieferte der Vergleich mit den schlecht-differenzierten PDACs keine signifikanten Werte. Dieses könnte darauf hindeuten, dass die maligne Entartung möglicherweise beteiligt, jedoch nicht alleine für eine erhöhte L1CAM-Intensität (Code: E2) verantwortlich ist.

Aus welchem Grund die Intensität der L1CAM-Färbung (Code: E2) signifikante Unterschiede zwischen CPs und PDACs lieferte, die Analyse der Anteile der L1CAM-Färbung (Code: E1) hingegen nicht, bedarf weiterer Untersuchungen. Möglicherweise sind molekulare Veränderungen,



die nur einigen Zellen eine Expression von L1CAM erlauben, dafür verantwortlich. Gegebenenfalls könnte eine Genexpressionsanalyse diese Unterschiede zwischen L1CAM-positiven und L1CAM-negativen Zellen aus demselben Tumorgewebe aufklären. Insgesamt unterstreicht die detektierte Expression in den CPs und PDACs die pro-tumorigene Funktion von L1CAM, welche bereits in CPs eine wichtige Rolle einzunehmen scheint.[112]

Über die Untersuchungen der CD25+FoxP3+ Tregs und L1CAM hinaus, erfolgte der Vergleich der Anteile an CD3+ und CD4+ T-Lymphozyten im Stroma. Die Verteilung der CD3+ T-Zellen (Code: A1) erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den CPs und PDACs.

Der analysierende Vergleich der CD4+ T-Zellen (Code: B1) zeigte, dass die untersuchten CPs in über 93% einen hohen CD4+ Anteil (Code: B1, Score II) aufwiesen. Unter den PDACs enthielten nur 50% der untersuchten Präparate einen hohen Anteil an CD4+ T-Zellen (Code: B1, Score II). Ino et al. konnten durch den immunhistochemischen Vergleich mit CPs eine Abnahme von zytotoxischen T-Zellen (CD8+) in PDACs nachweisen, wohingegen der Anteil der CD4+ T-Zellen gegenüber CPs sogar leicht erhöht war.[135] Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl von CD4+ T-Zellen zwischen CP und PDAC bestehen.[136] Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse durch die Verwendung unterschiedlicher Patientenkollektive zu erklären.

Während im Knochenmark und in der Blutbahn von PDAC-Patienten Anreicherungen von Effektor-T-Zellen beschrieben wurden, scheint es lokale Mechanismen zu geben, mit denen die Tumorzellen vor einer Immunreaktion geschützt werden.[137, 138] Zu diesen zählen unter anderem die vermehrte Sekretion von *IL-10* und *TGF- $\beta$ 1* sowie eine Anreicherung von Tregs. Diese Mechanismen vermitteln eine Hemmung der Aktivität und Funktion von Effektor-T-Zellen.[17, 41, 139] Zusätzlich konnte *in vitro* eine Expression von Fas-Liganden durch die Tumorzellen detektiert werden. Diese interagieren mit dem Fas-Rezeptor der T-Zellen und leiten so die Apoptose in den Tumor-infiltrierenden Effektor-T-Zellen ein.[17]

Im Gegensatz zur gleichzeitig mit steigender Entdifferenzierung einhergehenden Zunahme der Veränderungen bei den anderen Parametern, waren in den gut-differenzierten PDACs deutlich weniger Präparate mit hohem Anteil (Score II) an CD4+ Lymphozyten (Code: B1) detektierbar, als in den schlechter differenzierten PDACs. Eine mögliche Erklärung könnte eine zuvor beschriebene Zunahme von TH2-Zellen im Verhältnis zu TH1-Zellen sein, die den Tumor zusätzlich vor einer Immunantwort schützt.[140] In dieser Arbeit wurde jedoch keine immunhistochemische Färbung zur Differenzierung zwischen TH1- und TH2-Zellen durchgeführt. Zur Klärung dieser These wären weitere immunhistochemische Färbungen zu empfehlen. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass die in dieser Studie verwendete geringe Fallzahl der gut-differenzierten PDACs (n=6) nicht die normale statistische Verteilung der CD4+ in PDACs mit diesem Differenzierungsgrad widerspiegelt

und die statistische Auswertung daher auf einem stärkeren Unterschied zwischen CPs und PDACs hindeutet, als tatsächlich vorhanden ist.

Alle Auswertungen der Stromalen Parameter wurden in Bezug auf die in Tabelle 3.1 genannten Parameter durchgeführt. Viele dieser Parameter lieferten dabei keine signifikanten Ergebnisse, da die Einteilung der Scores rückblickend teilweise zu grob war. So wurde beispielsweise der Anteil der CD25+ T-Zellen in Bezug auf das Stroma (CP, Code: C0) ausschließlich mit dem Score I bewertet (siehe Anhang II, Tabellen IIa und IIb). Aus diesem Grunde sind in den Ergebnissen nur Werte mit einem relevanten Bezugsparameter aufgeführt (vgl. Anhang, Abschnitt I, Tabellen Ia – Id).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der untersuchten Parameter auf eine mit fortschreitender Malignität einhergehende Zunahme der Stromalen und duktaalen/tumoralen Veränderungen hin.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, etwaige Interaktionen zwischen den einzelnen Parametern und Zellpopulationen zu detektieren. Hierzu wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

Dabei zeigte sich in den PDACs ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD3+ T-Zellen (Code: A1) und der CD4+ T-Zellen (Code: B1). Unter den CPs war keine statistische Berechnung möglich, da alle Präparate eine hohe Anzahl an CD3+ T-Zellen (Code: B1) enthielten.

Der positive Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD3+ T-Zellen (Code: A1) und dem Anteil der CD4+ T-Zellen (Code: B1) lässt sich durch die für T-Zellen charakteristische Expression des Transmembranproteins CD3 erklären.[141] Die T-Helferzellen, welche unter anderem durch die Expression des Glykoproteins CD4 charakterisiert sind, stellen eine Untergruppe der T-Zellen dar. Diese weisen somit eine Co-Expression von CD3 und CD4 auf.[142, 143]

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte in den Geweben der PDACs ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl an CD4+ T-Zellen (Code: B1) und dem Anteil an FoxP3+ Tregs (Code: D2) dargestellt werden. Ein hoher Anteil an FoxP3+ Tregs (Code: D2) korrelierte dabei mit einem niedrigen Anteil an CD4+ T-Zellen (Code: B1). Auch die Untersuchung von CD25 (Code: C2), einem weiteren etablierten Marker für Tregs[144], konnte diese Beobachtungen stützen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen, dass Tregs die Aktivität und Funktion von Effektor-T-Zellen hemmen und somit zur Ausbildung des immunprivilegierten Tumorstromas beitragen.[39, 131] Zusätzlich zur Proliferationshemmung von CD4+ T-Zellen konnten Grossmann et al. den Tregs eine zytotoxische Wirkung auf Effektor-T-Zellen nachweisen.[145]

Im Gegensatz zur Beobachtung in den PDACs, konnte im Kollektiv der CPs kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD4+ T-Zellen (Code: B1) und den CD25+ T-Zellen (Code: C2) bzw. den FoxP3+ Tregs (Code: D2) dargestellt werden. Dieses Ergebnis ist am ehesten dadurch zu erklären, dass im Gegensatz zu den PDACs kaum eine Varianz zwischen der

Ausprägung der Parameter unter den CPs bestand. So enthielten mehr als 93% der untersuchten CPs einen einheitlich hohen Anteil (Score II) an CD4+ T-Zellen. Zusätzlich wies die Mehrheit der untersuchten CPs geringe Anteile an FoxP3+ (Code: D2) und CD25+ (Code: C2) T-Zellen auf. Ino et al. konnten bereits zeigen, dass der prozentuale Anteil der Tregs an den CD4+ T-Zellen im PDAC höher ist als in den CPs.[135]

Wie zuvor erwähnt, stellen sowohl CD25 als auch FoxP3 Marker dar, die zur Identifizierung von Tregs herangezogen werden können.[39, 41] Zusätzlich zu diesen immunhistochemischen Markern wurde in dieser Arbeit die Morphologie der Stromalen Zellen berücksichtigt, um die T-Zellen eindeutig identifizieren zu können.

Trotz der einheitlichen Ergebnisse von CD25 (Code: C2) und FoxP3 (Code: D2) in Bezug auf die CD4+ T-Zellen (Code: B1), konnte in dieser Arbeit weder in der Gruppe der CPs noch in den PDACs eine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern dargestellt werden. Möglicherweise ist diese Diskrepanz dadurch zu erklären, dass nicht nur Tregs sondern beispielsweise auch aktivierte T-Zellen CD25 exprimieren.[45] Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Gewebeschnitte jeweils nur eine Färbung erhielten und die untersuchten Bereiche von CD25 und FoxP3 somit um wenige  $\mu\text{m}$  voneinander abwichen. Eine Identifizierung von Tregs anhand der Co-Expression von FoxP3 und CD25 wäre mit Hilfe von Doppelfärbungen möglich, die u.a. aufgrund der unterschiedlichen Färbemethoden (manuell vs. Maschinell, siehe Abschnitte 3.1 und 3.2) bisher jedoch nicht durchgeführt wurden.

Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung zwischen CD25+ T-Effektorzellen und CD25+ Tregs stellt die Anfärbung der Oberflächenmoleküle CD49d und CD127 dar. Da diese nur von den Effektor-T-Lymphozyten exprimiert werden, stellen CD4+CD25+CD49d-CD127- T-Zellen eine Population der Tregs dar.[45] Aufgrund der schwierigen Realisierbarkeit von Präparatfärbungen mit vier unterschiedlichen Parametern wurde in dieser Arbeit vor allem FoxP3 als Marker zur Identifizierung der Tregs verwendet, da dieser Marker unter Berücksichtigung der Zellmorphologie ebenfalls eine sehr hohe Spezifität für Tregs aufweist.[46]

In der weiteren Auswertung der PDACs wurde ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der CD4+ T-Zellen (Code: B1) und der tumoralen FoxP3-Expression (Code: D3) im PDAC aufgezeigt. Ein hoher Anteil der Tumorzell-assoziierten FoxP3-Expression (Code: D3) war dabei signifikant mit geringerem Anteil an CD4+ T-Zellen (Code: B1) assoziiert. Diese Beobachtung stützen u.a. die Ergebnisse von Hinz et al., die der tumoralen FoxP3-Expression analog zu den Tregs einen immunmodulatorischen Effekt zuschreiben konnten. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Co-Kultur von FoxP3-exprimierenden Tumorzellen mit T-Zellen zellkontaktabhängig zu einer Hemmung der Proliferation der Immunzellen führt.[96]

Hingegen erbrachte die Intensität der tumoralen FoxP3-Färbung (Code: D4) keine Hinweise eines signifikanten Einflusses auf die Population der CD4+ T-Zellen (Code: B1). Möglicherweise bedeuten diese Ergebnisse, dass der immunsuppressive Effekt eher vom Anteil der FoxP3+ Epithelzellen (Code: D3), als von der Expressionsdichte in einzelnen Epithelzellen (Code: D4), abhängt.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen unter den PDACs waren in den CPs keinerlei Effekte der duktaalen FoxP3-Expression (Codes: D3 und D4) auf die Ausprägung der anderen untersuchten Parameter darstellbar. Ursächlich ist hierfür anscheinend der bereits aufgeführte große Anteil an Präparaten mit einer hohen Anzahl an CD4+ T-Zellen (Code: B1). Allerdings war die epitheliale FoxP3-Expression (Codes: D3 und D4) in den CPs geringer als in den PDACs, was eine mögliche Ursache für eine schwächere immunsuppressive Wirkung auf die CD4+ T-Zellen (Code: B1) sein könnte.

Das Ausmaß der prozentualen Verteilung FoxP3-positiver duktaaler/tumoraler Zellen (Code: D3) stand weder in den PDACs noch in den CPs mit der Intensität der FoxP3-Färbung (Code: D4) im Zusammenhang. Möglicherweise stecken hinter dieser Beobachtung differenziertere Mechanismen, als die zuvor beschriebene TGF- $\beta$ 2-abhängige Induktion einer tumoralen FoxP3-Expression.[96] Eine ähnlich differenzierte mikroskopische Bewertung von Intensität und Ausmaß der tumoralen FoxP3 Färbung wurde bereits in Präparaten von Oesophaguskarzinomen durchgeführt. Allerdings bildeten Xia et al. aus den beiden Scores für den Anteil der FoxP3+ Tumorzellen und für die Intensität der Färbung einen Gesamtscore, weshalb die Ergebnisse, auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Tumorentitäten, nicht direkt mit den hier aufgeführten Ergebnissen vergleichbar sind.[146]

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch die Interaktion zwischen den FoxP3+ Tregs (Code: D2) und FoxP3+ duktaalen/tumoralen Zellen (Codes: D3 und D4) untersucht. Während in den CPs keine Assoziation detektierbar war, zeigten die PDACs eine positive Korrelation zwischen dem Anteil der FoxP3-exprimierenden Tumorzellen (Code: D3) und dem Vorkommen von FoxP3+ Tregs (Code: D2). Hingegen lieferte die Intensität der tumoralen FoxP3-Färbung (Code: D4) keine Hinweise auf einen konkreten Zusammenhang mit dem Anteil an FoxP3+ Tregs.

Eventuell ist dieses Ergebnis Ausdruck der erhöhten Expression verschiedener Isoformen von TGF- $\beta$  u.a. freigesetzt durch die Tumorzellen, welche nicht nur mit einer erhöhten Anzahl an Tregs, sondern ebenfalls mit einer vermehrten tumoralen Expression von FoxP3 assoziiert sind.[96, 132, 147]

Da sowohl die L1CAM-Expression als auch Tregs durch unterschiedliche Effekte zur Tumorprogression beitragen, zu denen einerseits die EMT und andererseits immunmodulierende Funktionen zählen[41, 112], bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, *in vivo* einen möglichen

Zusammenhang zwischen der Expression von L1CAM und dem Anteil an Tregs zu untersuchen. Trotz tendenzieller Hinweise, dass der Anteil an L1CAM+ Tumorzellen (Code: E1) in den PDACs im negativen Zusammenhang mit dem Anteil der FoxP3+ Tregs (Code: D2) steht, war dieser Effekt nicht signifikant. Zusammenfassend konnte weder in den CPs noch PDACs eine signifikante Korrelation zwischen dem Anteil an FoxP3+ Tregs (Code: D2) und dem Anteil an L1CAM+ Epithelzellen (Code: E1) bzw. der Intensität der L1CAM-Färbung (Code: E2) dargestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte eine andere Studie *in vitro* einen pro-migratorischen Effekt von L1CAM+ PDAC-Zellen auf CD4+CD25+CD127-CD49d- Tregs im PDAC darstellen. Ein Effekt auf die Proliferation bestand jedoch nicht, was darauf hindeutet, dass L1CAM über seine promigratorische Wirkung zu einer Anreicherung von Tregs im PDAC-Gewebe beitragen kann.[126] Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ergebnisse auf die verschiedenen verwendeten Marker oder die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (*in vitro* vs. *in situ*) zurückzuführen.

Zusätzlich konnten Grage-Griebenow et al. eine verminderte Proliferation und Aktivierung von Effektor-T-Zellen in Anwesenheit von L1CAM nachweisen.[126] Obwohl in den PDACs eine ausgeprägtere L1CAM-Intensität (Code: E2) und eine geringere Anzahl an CD4+ T-Zellen (Code: B1) detektierbar waren als in den CPs, bestand in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Parametern.

Da sowohl der Expression von L1CAM als auch FoxP3 immunmodulatorische Funktionen im Tumorepithel zuzukommen scheinen, die in vielen Tumoren, so auch dem PDAC, mit einer schlechten Prognose assoziiert werden können, wurden die beiden Parameter hinsichtlich einer Assoziation untersucht.[96, 108, 113-115]

Begründet durch den Hinweis, dass der FoxP3-Expression im Tumorgewebe eine ähnliche immunmodulatorische Funktion wie den Tregs zukommt, erfolgte die Untersuchung einer möglichen Interaktion mit L1CAM.[96] Trotz diskreter Anzeichen auf einen positiven Zusammenhang zwischen der duktalem Expression von L1CAM und FoxP3 in den CPs und sehr gering auch in den PDACs, konnte in dieser Studie keine signifikante Interaktion zwischen den ermittelten Parametern nachgewiesen werden. Weiterhin ergaben sich positive Zusammenhänge zwischen dem Gesamtscore der duktalem FoxP3-Expression (Code: D5) und dem Anteil der duktalem L1CAM-Expression (Code: E1) bzw. dem L1CAM Score (Code: E3). Da es sich jedoch sowohl bei dem FoxP3-Gesamtscore (Code: D5) als auch bei dem L1CAM-Gesamtscore (Code: E3) jeweils um rechnerische Additionswerte handelt und die beiden Teilwerte (Codes: D3+D4 bzw. E1+E2) keine signifikanten Einflüsse zeigten, ist anzunehmen, dass die Aussagekraft des Gesamtscores geringer ist als die Aussagekraft der einzelnen Parameter.

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte in den PDACs ebenfalls ein lediglich schwacher, jedoch

nicht signifikanter, Zusammenhang zwischen dem Anteil der tumoralen FoxP3-Expression (Code: D3) und der tumoralen L1CAM-Intensität (Code: E2) dargestellt werden. Während die Expression von L1CAM vornehmlich durch die Expression von TGF- $\beta$ 1 hochreguliert wird, erfolgt die Induktion der tumoralen FoxP3-Expression eher durch TGF- $\beta$ 2.[96, 112] Zumal die duktale Expression von FoxP3 und L1CAM bereits in den CPs detektierbar war, die Ausprägung im PDAC jedoch deutlich stärker ausfiel, können diese Ergebnisse auf eine Funktion beider Parameter in der Tumorgenese hindeuten.

Da in dieser Arbeit keine Doppelfärbungen der Präparate durchgeführt wurden, erschwerte dies einen detaillierten Vergleich der einzelnen Bereiche. Zur Erleichterung des Vergleichs erfolgte die weitgehende Orientierung anhand markanter Strukturen. Hierzu zählten beispielsweise Nervenstrukturen, auffällige Gangstrukturen sowie die jeweilige Form der Präparate. Mit Hilfe digitaler Bilder wurde versucht, einen direkten Vergleich herzustellen. Aufgrund der Schnittdicke von 5 $\mu$ m konnte daher in dieser Arbeit darüber keine Aussage getroffen werden, ob eine Co-Expression von z.B. L1CAM und FoxP3 in einzelnen Zellen auftritt. Die Untersuchungen ergaben jedoch, dass die FoxP3+ tumoralen/duktalen Zellen meist nicht in unmittelbarer Nähe zu den L1CAM+ tumoralen/duktalen Zellen anzutreffen waren, sondern in Gangstrukturen mit ähnlichem Grad der Entdifferenzierung, die jedoch an anderer Stelle in den Präparaten lokalisiert waren. Zur exakteren Lokalisationsbestimmung wäre es daher sinnvoll, die Präparate in einer weiteren Studie mittels Doppelfärbung erneut zu beurteilen. Diese Arbeit ist Teil einer Studie, in der die Ausprägungen von insgesamt 27 Parametern untersucht wurden. Um das Stroma von CP und PDAC durch den Vergleich aller Parameter charakterisieren zu können, wurden Einzelfärbungen und keine Doppelfärbungen angefertigt.

Im Gegensatz zur oben beschriebenen duktalem/tumoralen Expression von FoxP3, konnte in den Präparaten der PDACs ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der L1CAM-exprimierenden Tumorzellen (Code: E1) und der Intensität (Code: E2) der Färbung eruiert werden. Dieser Effekt war in den CPs nicht darstellbar. Unter den CPs waren prozentual mehr Präparate mit einem hohen Anteil an duktalem L1CAM+ Zellen (Code: E1), jedoch war die Intensität dieser Färbung (Code: E2) geringer als in den PDACs. Möglicherweise beruhen diese Ergebnisse auf unterschiedlichen Mechanismen für das Ausmaß und die Intensität der epithelialen/tumoralen L1CAM-Färbung (Codes: E1 und E2), die neben der Produktion von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 auch von anderen Faktoren abhängig sein könnten.[108, 112] Dieser These könnte *in vitro* durch die Induktion von L1CAM mit Hilfe von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 und anschließend differenzierter Beurteilung von Anteil und Intensität der Färbung weiter nachgegangen werden.

Zuletzt erfolgte innerhalb des PDAC-Kollektivs die Analyse zwischen den Anteilen der jeweiligen Zellpopulation bzw. des Expressionsausmaßes der Parameter und der Überlebenszeit. Um das Tumorstadium als möglichen Einflussfaktor auszugrenzen, wurden im Unterschied zu vorherigen Studien nur Präparate mit dem einheitlichen Tumorstaging T3N1M0 verwendet.[41, 111, 135]

Ein hoher Anteil an FoxP3+ Tregs (Code: D2) war in dieser Arbeit tendenziell mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert. Diese Korrelation bestand nicht zwischen den CD25+ T-Zellen (Code: C2) und der Überlebenszeit. Aufgrund der höheren Spezifität wurde insbesondere FoxP3 als Marker für Tregs herangezogen.[46] Bisherige Studien lieferten diskrepante Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses von Tregs auf die Überlebenszeit. Während eine erhöhte Anzahl an Tregs im PDAC mit einer kürzeren Überlebenszeit assoziiert werden konnte, zeigten andere Tumorentitäten sogar einen Überlebensvorteil.[39, 41, 43, 148] Der Effekt auf die Überlebenszeit scheint nicht ausschließlich von der Anzahl Tregs allein abzuhängen, sondern vielmehr auch vom Gleichgewicht mit anderen Parametern, wie der Anzahl an CD8+ T-Lymphozyten, beeinflusst zu sein.[149, 150] Zusätzlich tragen die unterschiedlichen Funktionen der Tregs offenbar auch zu den prognostischen Differenzen bei. Einerseits begünstigen Tregs die Ausbildung des tumorfördernden Stromas, indem sie den Tumor vor dem Immunsystem schützen, andererseits kann die herunterregulierte Inflammation in einigen Geweben einen Schutz vor der Tumorprogression bieten.[46]

Im Vergleich mit der Studie von Hiraoka et al. unterscheidet sich diese Arbeit nicht nur hinsichtlich des einheitlichen Tumorstadiums, sondern zusätzlich auch hinsichtlich der Auswertungsmethode, da nicht nur drei Hauptgesichtsfelder, sondern der Anteil der FoxP3+ Tregs im gesamten tumorösen Anteil der Präparate analysiert wurde.

Während der Anteil der FoxP3+ Tumorzellen (Code: D3) keinen Einfluss auf die Überlebenszeit erbrachte, schien sich eine erhöhte Intensität (Code: D4) in den ersten 36 Monaten tendenziell negativ auszuwirken. Die Analyse des Einflusses an einem festen Zeitpunkt (24 Monate) konnte jedoch auch keine signifikanten Effekte aufdecken, sodass das genannte tendenzielle Ergebnis der FoxP3-Intensität (Code: D4) allein auf der Beschreibung der Kaplan-Meier-Kurve beruht. Dieser tendenzielle, jedoch nicht signifikante Effekt könnte als Ausdruck dafür gewertet werden, dass die untersuchten Parameter zwar einen Einfluss auf die Überlebenszeit ausüben, dieser möglicherweise jedoch von weiteren, in dieser Arbeit nicht untersuchten Faktoren abhängig ist. Zusätzlich ist die Aussagekraft aufgrund der kleinen Anzahl an Präparaten (n=5) mit geringem Intensitätsscore der epithelialen FoxP3-Färbung (Code: D4) eingeschränkt.

Hinz et al. konnten in ihrer Studie aufgrund eines kleinen und inhomogenen Patientenkollektivs ebenfalls keinen Einfluss der FoxP3-Expression auf das Überleben darstellen.[96] Hingegen korrelierte der Anteil der FoxP3-Expression in den Präparaten von kolorektalen Karzinomen signifikant mit einer schlechteren Prognose.[99]

Die Überlebenskurven der Auswertung der L1CAM-Färbung (Code:s E1 und E2) zeigten vor allem in den ersten Monaten nach der Operation eine negative Assoziation zwischen prozentuaalem Anteil und der Überlebenszeit. Dieser Effekt war jedoch nach rund 36 Monaten nicht mehr detektierbar. Aus diesem Grunde ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Werte. Ben et al. konnten einen signifikanten negativen Einfluss der L1CAM-Expression auf die Überlebenszeit beschreiben.[111] Neben den uneinheitlichen Tumorstadien unterscheiden sich diese Arbeit und die Analyse von Ben et al. auch hinsichtlich der Zensur von Patienten, die in den ersten 60 Tagen der Nachbeobachtung verstorben sind.[111] Abgesehen von sieben Patienten, die aufgrund fehlender Nachbeobachtungsdaten nicht in die statistischen Berechnungen einbezogen werden konnten, wurden in dieser Arbeit auch Patienten berücksichtigt, die weniger als 60 Tage nach der Operation überlebten. Einerseits schützt diese Zensur zwar vor der fälschlichen Einbeziehung der operationsbedingten/postoperativen Letalität, andererseits schien die Einbeziehung sinnvoll, da das PDAC ohnehin mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist.[89]

Während der Anteil der CD4+ T-Zellen (Code: B1) in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Überlebenszeit hatte, war eine hohe Anzahl an CD3+ T-Zellen (Code: A1) tendenziell mit einem verlängerten Überleben assoziiert. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten durch die mit erhöhter T-Zellzahl verbesserte Immunantwort erklären, da die Expression des Oberflächenmoleküls CD3 eng mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert ist und die detektierten Zellen somit die gesamte Gruppe der T-Zellen inklusive der zytotoxischen T-Zellen umfasst.[135, 141]

Auch wenn in dieser Arbeit kein signifikanter Effekt der untersuchten Parameter auf die Überlebenszeit dargestellt werden konnte, vermögen die tumorale L1CAM-Expression (prozentualer Anteil und Intensität) und die Intensität der tumoralen FoxP3-Färbung tendenziell negative Einflüsse auf die Überlebenszeit zu haben, während ein hoher Anteil an CD3+ Lymphozyten tendenziell einen protektiven Einflussfaktor darstellt. Aufgrund der geringen Signifikanz sind die untersuchten Parameter jedoch nicht für eine prognostische Aussage geeignet. Möglicherweise wären die Ergebnisse unter Einbeziehung eines größeren Patientenkollektivs anders ausgefallen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass trotz der gemeinsamen Desmoplasie diverse Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung stromaler und duktaler/tumoraler Parameter zwischen der CP und dem PDAC bestehen. Diese Erkenntnis dient der besseren Charakterisierung von histologischen und molekularen Veränderungen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Expression der untersuchten Parameter statistisch signifikante Interaktionen zeigt. Diese Erkenntnisse können in nachfolgenden Studien zur Erforschung weiterer zugrundeliegender Mechanismen und eventueller therapeutischer Ansätze herangezogen werden.



## 6 Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) stellt in Deutschland die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache dar. Die schlechte Heilungs- und Überlebensprognose ist unter anderem auf die geringe oder gar fehlende Frühsymptomatik zurückzuführen. Diese geht mit einer späten Diagnosestellung und daher gleichzeitig mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium einher. Ferner weist das PDAC eine Apoptosestörung und eine ausgeprägte Chemoresistenz auf, was die Ursache für die schlechte Therapierbarkeit ist. Histologisch kommt es im Laufe der Tumorentstehung zu einer ausgeprägten bindegewebigen Umwandlung des Tumorstromas (Desmoplasie) sowie der Ausbildung eines immunsuppressiven Milieus. Das Adhäsionsmolekül L1CAM scheint dabei mit der stromalen Umwandlung und mit der Ausbildung von Chemoresistenz vergesellschaftet zu sein. Darüber hinaus konnten vorherige Studien zeigen, dass einerseits regulatorische T-Zellen (Tregs), die unter anderem durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 charakterisiert sind, einen entscheidenden Beitrag zur Ausbildung dieses immunsuppressiven Stromas beitragen. In diesem Kontext scheint auch die tumorale FoxP3-Expression eine zentrale Funktion einzunehmen.

Da die chronische Pankreatitis (CP) als Risikofaktor für die Entwicklung eines PDACs gilt und zahlreiche Gemeinsamkeiten mit dem PDAC aufweist, beschäftigte sich diese Arbeit zum einen mit der Charakterisierung der stromalen Unterschiede hinsichtlich des Anteils der Tregs sowie der duktaalen/tumoralen Expression von FoxP3 und L1CAM zwischen CP und PDAC. Zum anderen erfolgte die Bestimmung der Anteile von CD3+ und CD4+ T-Zellen. Des Weiteren erfolgte die Analyse möglicher Interaktionen zwischen den untersuchten Parametern. In einem letzten Schritt wurde der Einfluss der untersuchten Parameter auf die Überlebenszeit der PDAC-Patienten untersucht.

Zu diesem Zweck wurden serielle Schnitte von 42 PDAC-Präparaten mit dem einheitlichen Tumorstaging T3N1M0 sowie von 15 CP-Präparaten angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung hinsichtlich des prozentualen Anteils der angefärbten Zellen sowie der Intensität der duktaalen/tumoralen Färbungen von L1CAM und FoxP3.

Neben der Erkenntnis, dass bereits CP-Gewebe eine duktaale FoxP3- und L1CAM-Expression aufweisen, zeigten die Ergebnisse deutliche Unterschiede hinsichtlich der Ausprägungen der Parameter in den CPs und PDACs. So konnten in den PDACs höhere Anteile an FoxP3+Tregs und FoxP3+ Tumorzellen sowie stärkere Intensitäten der tumoralen FoxP3- und L1CAM-Intensität detektiert werden. Zusätzlich wiesen die untersuchten CPs mehr CD4+ T-Zellen auf. Der Anteil der L1CAM+ duktaalen/tumoralen Zellen war in den untersuchten Patientengruppen annähernd identisch. Das Ausmaß der Unterschiede nahm mit fortschreitendem Tumorgrading zu.

Die Analyse von gegenseitigen Beeinflussungen der untersuchten Parameter zeigte in den PDACs einerseits eine negative Beeinflussung der Anzahl der CD4+ T-Zellen durch den Anteil der Tregs und andererseits auch durch das Ausmaß der tumoralen FoxP3-Expression. Sowohl in den CPs als auch in den PDACs ergaben sich Hinweise auf einen diskreten Zusammenhang zwischen der duktaalen/tumoralen Expression von FoxP3 und L1CAM. Tendenziell, jedoch nicht signifikant war der Anteil an FoxP3+Tregs im PDAC negativ mit dem Anteil der L1CAM+ Epithelien assoziiert. Dieser Effekt konnte in den CPs nicht beobachtet werden.

In Bezug auf die Überlebenszeit ergaben die Auswertungen keine signifikanten Ergebnisse. Lediglich die Anteile der FoxP3+ Tregs und der CD3+ T-Zellen schienen tendenziell mit einem verlängerten Überleben assoziiert zu sein. Hingegen stellen der Anteil der tumoralen L1CAM-Färbung und die Intensität der tumoralen FoxP3-Färbung offenbar eher negative Faktoren in Bezug auf die Überlebenszeit dar.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass zahlreiche stromale Veränderungen, aber auch Veränderungen im Gangepithel wie z.B. die Expression von FoxP3 und L1CAM, bereits in chronischen Pankreatitiden detektierbar sind und mit voranschreitenden pathologischen Veränderungen im Gewebe zunehmen. Gut-differenzierte PDACs wiesen daher entsprechend weniger Unterschiede im Vergleich zu den CPs bei den untersuchten Parametern auf, als mäßig- bis schlecht-differenzierte Tumore.

Die Tatsache, dass keine der untersuchten Parameter einen Effekt auf das Überleben von Patienten mit gleichem Tumorstaging hatte, deutet daraufhin, dass andere Faktoren hierbei eine Rolle spielen müssen.

## Anhang

### I Scores der mikroskopischen Auswertung (nach Dichotomisierung)

Die nachfolgend aufgeführten Scores (Tabellen Ia – Id) wurden für die statistischen Berechnungen verwendet.

**Tabelle Ia: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der Stromalen Parameter der einzelnen CP-Patienten (Werte nach Dichotomisierung)**

	CD3	CD4		CD25		FoxP3	
	% von Stroma	% von Stroma	% von CD3+	% von CD3+	% von CD4+	% von CD3+	% von CD4+
<b>Code</b> →	A1	B1	B2	C1	C2	D1	D2
<b>Lfd. Nr.</b>							
1	2	2	2	1	1	1	2
2	2	2	2	1	1	1	1
3	2	1	2	1	1	2	2
4	2	2	2	1	2	1	1
5	2	2	2	1	1	1	1
6	2	2	2	1	1	1	1
7	2	2	2	1	1	1	1
8	2	2	2	1	1	1	1
9	2	2	2	1	2	2	2
10	2	2	2	1	1	1	1
11	2	2	2	1	1	1	1
12	2	2	2	1	1	1	1
13	2	2	2	1	1	1	2
14	2	2	2	1	1	1	1
15	2	2	2	1	2	1	1

**Tabelle Ib: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der Stromalen Parameter der einzelnen PDAC-Patienten (Werte nach Dichotomisierung)**

Code →	CD3	CD4		CD25		FoxP3		Grade	Überleben
	% von Stroma A1	% von Stroma B1	% von CD3+ B2	% von CD3+ C1	% von CD4+ C2	% von CD3+ D1	% von CD4+ D2	UICC N1	(in Monaten) O1
Lfd. Nr.									
1	2	2	2	1	2	1	1	2	4
2	2	2	2	1	2	1	2	2	108
3	2	2	2	1	1	2	2	2	54
4	2	1	2	1	1	2	2	1	103
5	2	1	1	2	2	1	2	2	52
6	2	2	2	1	1	1	2	3	44
7	2	1	1	1	2	1	2	2	44
8	2	2	2	1	1	1	2	2	44
9	2	1	2	1	2	2	2	3	39
10	2	2	2	1	2	1	1	1	14
11	2	2	2	2	2	1	1	1	16
12	2	1	2	1	2	1	1	2	38
13	2	2	2	1	1	1	1	2	37
14	2	1	2	1	2	2	2	3	35
15	2	2	2	1	2	1	2	3	33
16	2	2	2	1	1	1	1	3	0
17	2	1	2	1	1	1	2	1	30
18	1	1	2	1	2	1	1	2	1
19	1	1	2	1	2	2	2	2	24
20	2	1	2	1	2	1	1	2	22
21	2	1	1	1	2	1	2	3	16
22	2	2	2	1	1	1	1	3	13
23	2	1	1	1	2	1	2	1	12
24	2	1	2	1	1	1	2	1	12
25	2	1	2	1	1	1	2	2	9
26	1	1	2	1	2	1	2	3	8
27	2	2	2	1	2	1	1	2	7
28	2	2	2	1	1	2	2	3	6
29	1	1	2	1	2	2	2	3	6
30	2	1	2	1	2	1	2	2	6
31	1	1	1	1	1	1	1	2	5
32	2	1	2	1	2	1	1	2	5
33	2	2	2	1	1	1	1	3	5
34	2	2	2	1	1	1	1	2	4
35	2	2	2	1	1	1	1	2	2
36	2	2	2	2	2	1	2	3	1
37	2	2	2	1	1	1	1	2	1
38	2	1	2	1	2	1	2	2	1
39	2	2	2	1	1	2	2	2	1
40	2	1	1	1	2	1	2	2	23
41	2	2	2	1	2	1	1	3	35
42	2	2	2	*	*	*	*	2	31

\* Aufgrund fehlender Färbungen wurden diese Schnitte des Präparates Nr. 42 nicht ausgewertet.

**Tabelle Ic: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der epithelialen Parameter der einzelnen CP-Patienten (Werte nach Dichotomisierung)**

	FoxP3			L1CAM		
	% von Epithel	Intens. Epithel	Score (D3+D4)	% vom Epithel	Intens. Epithel	Score (E1+E2)
<b>Code</b> →	D3	D4	D5	E1	E2	E3
<b>Lfd. Nr.</b>						
1	1	1	1	1	1	1
2	2	1	2	2	1	2
3	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	2	1	2
5	1	2	2	2	2	2
6	2	2	2	2	1	2
7	1	2	2	2	1	2
8	1	1	1	2	1	2
9	2	2	2	2	1	2
10	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1
13	2	1	2	2	1	2
14	1	2	2	2	2	2
15	1	1	1	2	1	2

**Tabelle Id: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der tumoralen Parameter der einzelnen PDAC-Patienten (Werte nach Dichotomisierung)**

Code →	FoxP3			L1CAM			Grade	Überleben
	% von Epithel	Intens. Epithel	Score (D3+D4)	% vom Epithel	Intens. Epithel	Score (E1+E2)	UICC	(in Monaten)
Lfd. Nr.	D3	D4	D5	E1	E2	E3	N1	O1
1	2	2	2	2	2	2	2	4
2	2	2	2	1	2	2	2	108
3	2	1	2	2	1	2	2	54
4	2	2	2	1	2	2	1	103
5	2	2	2	1	1	1	2	52
6	2	2	2	1	1	1	3	44
7	2	2	2	1	1	1	2	44
8	2	2	2	2	2	2	2	44
9	2	2	2	1	1	1	3	39
10	1	1	1	2	1	2	1	14
11	1	2	2	2	2	2	1	16
12	2	1	2	2	2	2	2	38
13	2	2	2	1	1	1	2	37
14	2	2	2	2	2	2	3	35
15	2	2	2	1	1	1	3	33
16	2	2	2	2	2	2	3	0
17	1	1	1	1	1	1	1	30
18	2	2	2	2	1	2	2	1
19	2	2	2	1	2	2	2	24
20	2	1	2	1	1	1	2	22
21	2	2	2	1	1	1	3	16
22	1	2	2	1	1	1	3	13
23	2	2	2	2	2	2	1	12
24	2	2	2	2	2	2	1	12
25	2	2	2	2	2	2	2	9
26	2	2	2	2	2	2	3	8
27	1	2	2	1	1	1	2	7
28	2	2	2	1	1	1	3	6
29	2	2	2	2	2	2	3	6
30	2	2	2	2	2	2	2	6
31	2	2	2	2	2	2	2	5
32	2	2	2	2	2	2	2	5
33	2	2	2	1	1	1	3	5
34	2	2	2	2	1	2	2	4
35	1	1	1	2	2	2	2	2
36	2	2	2	1	1	1	3	1
37	1	2	2	2	1	2	2	1
38	2	2	2	2	2	2	2	1
39	2	2	2	1	2	2	2	1
40	2	2	2	1	1	1	2	23
41	2	1	1	2	2	2	3	35
42	*	*	*	*	*	*	2	31

\* Aufgrund fehlender Färbungen wurden diese Schnitte des Präparates Nr. 42 nicht ausgewertet.

## II Scores der mikroskopischen Auswertung (vor Dichotomisierung)

Die nachfolgend aufgeführten Scores (Tabellen IIa – IId) wurden mikroskopisch ermittelt und nach der Dichotomisierung in die oben aufgeführten Scores (Tabellen Ia – Id) umgewandelt.

**Tabelle IIa: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der Stromalen Parameter der einzelnen CP-Patienten (Werte vor Dichotomisierung)**

	CD3	CD4		CD25+			FoxP3		
	% von Stroma	% von Stroma	% von CD3+	% von Stroma	% von CD3+	% von CD4+	% von Stroma	% von CD3+	% von CD4+
Code →	A1	B1	B2	C0	C1	C2	D0	D1	D2
Lfd. Nr.									
1	2	2	2	1	1	1	1	1	2
2	2	2	3	1	1	1	1	1	1
3	2	1	3	1	1	1	1	2	3
4	2	2	3	1	1	2	1	1	1
5	2	2	3	1	1	1	1	1	1
6	3	2	3	1	1	1	1	1	1
7	3	2	3	1	1	1	1	1	1
8	2	2	3	1	1	1	1	1	1
9	3	2	3	1	1	2	1	2	2
10	2	2	2	1	1	1	1	1	1
11	2	2	2	1	1	1	1	1	1
12	2	2	3	1	1	1	1	1	1
13	3	2	3	1	1	1	1	1	2
14	3	2	3	1	1	1	0	0	0
15	2	2	3	1	1	2	1	1	1

**Tabelle IIb: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der Stromalen Parameter der einzelnen PDAC-Patienten (Werte vor Dichotomisierung)**

	CD3	CD4		CD25+			FoxP3		
	% von Stroma	% von Stroma	% von CD3+	% von Stroma	% von CD3+	% von CD4+	% von Stroma	% von CD3+	% von CD4+
Code →	A1	B1	B2	C0	C1	C2	D0	D1	D2
Lfd. Nr.									
1	3	2	2	1	1	2	1	1	1
2	3	2	3	1	1	2	1	1	2
3	2	2	3	1	1	1	1	2	2
4	2	1	2	1	1	1	1	3	4
5	2	1	1	1	2	4	1	1	3
6	3	2	3	1	1	1	1	1	2
7	3	1	1	1	1	4	1	1	4
8	2	2	2	1	1	1	1	1	2
9	2	1	2	1	1	2	1	2	3
10	2	2	3	1	1	2	1	1	1
11	2	2	3	1	2	2	1	1	1
12	2	1	2	1	1	2	1	1	1
13	3	2	3	1	1	1	1	1	1
14	2	1	2	1	1	2	1	2	3
15	2	2	2	1	1	2	1	1	2
16	3	2	3	1	1	1	1	1	1
17	2	1	2	1	1	1	1	1	2
18	2	1	2	1	1	2	1	1	1
19	1	1	3	1	1	2	1	2	3
20	1	1	2	1	1	2	1	1	1
21	2	1	1	1	1	3	1	1	3
22	2	2	3	1	1	1	1	1	1
23	2	1	1	1	1	2	1	1	3
24	2	1	2	1	1	1	1	1	2
25	2	1	2	1	1	1	1	1	2
26	1	1	2	1	1	2	1	1	2
27	2	2	2	1	1	2	1	1	1
28	3	2	2	1	1	1	2	2	2
29	1	1	2	1	1	2	1	2	2
30	3	1	2	1	1	2	1	1	2
31	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	2	1	2	1	1	2	1	1	1
33	2	2	3	1	1	1	1	1	1
34	3	2	3	1	1	1	1	1	1
35	2	2	3	1	1	1	1	1	1
36	2	2	3	1	2	2	1	1	2
37	2	2	3	1	1	1	1	1	1
38	2	1	2	1	1	2	1	1	2
39	3	2	3	1	1	1	1	2	2
40	2	1	1	1	1	3	1	1	3
41	2	2	3	1	1	2	1	1	1
42	3	2	3	*	*	*	*	*	*

\* Färbungen von CD25, FoxP3 und L1CAM wurden für Präparat Nr. 42 nicht durchgeführt.



**Tabelle IIc: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der epithelialen Parameter der einzelnen CP-Patienten (Werte vor Dichotomisierung)**

	FoxP3		L1CAM	
	% vom Epithel	Intens. Epithel	% vom Epithel	Intens. Epithel
	Code →	D3	D4	E1
Lfd. Nr.				
1	1	1	0	0
2	2	1	2	1
3	1	1	0	0
4	1	1	2	1
5	1	2	2	2
6	2	2	2	1
7	1	2	3	1
8	1	1	2	1
9	2	2	2	1
10	1	1	1	1
11	1	1	1	1
12	1	1	0	0
13	2	1	2	1
14	1	3	2	2
15	0	0	2	1

**Tabelle IIId: Darstellung der mikroskopisch ermittelten Scores der tumoralen Parameter der einzelnen PDAC-Patienten (Werte vor Dichotomisierung)**

	FoxP3		L1CAM	
	% vom Epithel	Intens. Epithel	% vom Epithel	Intens. Epithel
Code →	D3	D4	E1	E2
Lfd. Nr.				
1	2	2	3	2
2	3	3	1	2
3	2	1	2	1
4	3	3	1	2
5	2	2	1	1
6	3	2	0	0
7	2	2	1	1
8	2	2	2	2
9	3	2	1	1
10	0	0	2	1
11	1	2	3	2
12	2	1	2	2
13	3	2	1	1
14	2	2	2	2
15	3	2	1	1
16	3	2	2	2
17	0	0	0	0
18	3	2	2	1
19	3	2	1	2
20	2	1	1	1
21	2	2	0	0
22	1	2	1	1
23	2	2	2	2
24	3	2	2	2
25	2	2	2	2
26	3	2	3	2
27	1	2	1	1
28	2	2	1	1
29	2	2	3	2
30	2	2	3	2
31	2	2	2	2
32	2	2	2	2
33	2	2	0	0
34	2	2	3	1
35	1	1	2	2
36	2	2	1	1
37	1	2	2	1
38	2	2	4	2
39	3	2	1	2
40	2	2	0	0
41	2	1	2	1
42	*	*	*	*

\* Färbungen von CD25, FoxP3 und L1CAM wurden für Präparat Nr. 42 nicht durchgeführt.

### III Abkürzungsverzeichnis

5-FU/Folinsäure	-	5-Fluoruracil in Kombination mit Folinsäure
ADAM	-	A Disintegrin and Metalloproteinase
AFL	-	Atypische flache Läsion
BRCA-1/-2	-	Breast Cancer, early onset
BSA	-	Bovines Serumalbumin
CD	-	Cluster of differentiation
CP	-	Chronische Pankreatitis
CT	-	Computertomographie
CXCL	-	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR	-	C-X-C motif chemokine receptor
EGF	-	Epidermal growth factor
ERK	-	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
EZM	-	Extrazellulärmatrix
FAP	-	Familiäre adenomatöse Polyposis
FoxP3	-	Forkhead-Box-Protein P3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Wasserstoffperoxid
Her2	-	Human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	-	Hereditäres nicht-polipöses Kolonkarzinom
IgG	-	Immunglobulin G
IL-6	-	Interleukin-6
IPMN	-	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
iTregs	-	induzierte regulatorische T-Zellen
L1CAM	-	L1 cell adhesion molecule
MCN	-	Muzinös zystische Neoplasie
MDSC	-	Myeloid-derived suppressor cells (Myeloide Suppressorzellen)
MRT	-	Magnetresonanztomographie
NF-κB	-	Nuclear factor κB
nTregs	-	natürliche regulatorische T-Zellen
PanIN	-	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	-	Phosphat buffering saline
PDAC	-	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (Duktales Pankreasadenokarzinom)
PSC	-	Pankreatische Sternzellen/Fibroblasten
PTC	-	Perkutane transhepatische Cholangiodrainage (PTC)

shRNA	-	Small hairpin Ribonucleic acid
siRNA	-	Small interfering Ribonucleic acid
TAM	-	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	-	T-Zell-Rezeptor
TGF- $\beta$	-	Transforming growth factor-beta
TH1-/TH2-Zellen	-	T-Helfer-Zellen Typ 1/2
TNM	-	Tumor Nodulus Metastase
Tregs	-	Regulatorische T-Zellen
UICC	-	Union internationale contre le cancer (dt. Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF	-	Vascular endothelial growth factor
$\alpha$ -SMA	-	$\alpha$ -smooth muscle actin

#### IV Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut, G.d.e.K.i.D.e.V. *Krebs in Deutschland 2009/2010. Bauchspeicheldrüse*. Berlin, 2013.
2. Böcker, D., Heitz, *Pankreasadenokarzinom*, in *Pathologie*. 2004. p. 815-19.
3. Li, D., Xie, K., Wolff, R. und Abbruzzese, J. L. , *Pancreatic Cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
4. Krejs, G.J., *Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors*. Dig Dis, 2010. **28**(2): p. 355-8.
5. Ben, Q., et al., *Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies*. Eur J Cancer, 2011. **47**(13): p. 1928-37.
6. Lowenfels, A.B., et al., *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group*. N Engl J Med, 1993. **328**(20): p. 1433-7.
7. Klein, A.P., et al., *Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2634-8.
8. Solomon, S., et al., *Inherited pancreatic cancer syndromes*. Cancer J, 2012. **18**(6): p. 485-91.
9. Lucas, A.L., et al., *BRCA1 and BRCA2 germline mutations are frequently demonstrated in both high-risk pancreatic cancer screening and pancreatic cancer cohorts*. Cancer, 2014. **120**(13): p. 1960-7.
10. Naderi, A. and F.J. Couch, *BRCA2 and pancreatic cancer*. Int J Gastrointest Cancer, 2002. **31**(1-3): p. 99-106.
11. Herold, G., *Pankreaskarzinom*, in *Innere Medizin*. 2010. p. 489-90.
12. Gullo, L., et al., *Diabetes and the risk of pancreatic cancer*. N Engl J Med, 1994. **331**(2): p. 81-4.
13. Shaib, W., et al., *Assessing risk and mortality of venous thromboembolism in pancreatic cancer patients*. Anticancer Res, 2010. **30**(10): p. 4261-4.
14. Schiebler, *Bauchspeicheldrüse*, in *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 2004, Springer. p. 583ff.
15. Lüllmann-Rauch, P., *Bauchspeicheldrüse*, in *Taschenlehrbuch Histologie*. 2006, Thieme: Stuttgart. p. p. 402ff.
16. Warshaw, A.L. and C. Fernandez-del Castillo, *Pancreatic carcinoma*. N Engl J Med, 1992. **326**(7): p. 455-65.
17. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer microenvironment*. Int J Cancer, 2007. **121**(4): p. 699-705.
18. Haqq, J., et al., *Pancreatic stellate cells and pancreas cancer: current perspectives and future strategies*. Eur J Cancer, 2014. **50**(15): p. 2570-82.
19. Apte, M.V., et al., *Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis*. Gut, 1999. **44**(4): p. 534-41.
20. Lunardi, S., R.J. Muschel, and T.B. Brunner, *The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets?* Cancer Lett, 2014. **343**(2): p. 147-55.
21. Mews, P., et al., *Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis*. Gut, 2002. **50**(4): p. 535-41.
22. Bachem, M.G., et al., *Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells*. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 907-21.
23. McCarroll, J.A., et al., *Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 141.
24. Schmid-Kotsas, A., et al., *Lipopolysaccharide-activated macrophages stimulate the synthesis of collagen type I and C-fibronectin in cultured pancreatic stellate cells*. Am J Pathol, 1999. **155**(5): p. 1749-58.
25. Bachem, M.G., et al., *Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells*

- in rats and humans*. Gastroenterology, 1998. **115**(2): p. 421-32.
26. Fujita, H., et al., *Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells*. Cancer Sci, 2009. **100**(12): p. 2309-17.
  27. Jiang, H.B., M. Xu, and X.P. Wang, *Pancreatic stellate cells promote proliferation and invasiveness of human pancreatic cancer cells via galectin-3*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(13): p. 2023-8.
  28. Vaquero, E.C., et al., *Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways*. Gastroenterology, 2003. **125**(4): p. 1188-202.
  29. Muerkoster, S.S., et al., *Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma--epigenetic downregulation of caspases*. Int J Cancer, 2008. **123**(8): p. 1751-60.
  30. Erkan, M., et al., *Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Neoplasia, 2009. **11**(5): p. 497-508.
  31. Olive, K.P., et al., *Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer*. Science, 2009. **324**(5933): p. 1457-61.
  32. Xu, Z., et al., *Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis*. Am J Pathol, 2010. **177**(5): p. 2585-96.
  33. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. Cell, 2006. **124**(2): p. 263-6.
  34. Mitchem, J.B., et al., *Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1128-41.
  35. Yoshikawa, K., et al., *Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head*. Cancer Sci, 2012. **103**(11): p. 2012-20.
  36. Goedegebuure, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(6): p. 734-51.
  37. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(3): p. 162-174.
  38. Hezel, A.F., et al., *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1218-49.
  39. Liyanage, U.K., et al., *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2756-61.
  40. Ellis, J.S., X. Wan, and H. Braley-Mullen, *Transient depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells results in multiple autoimmune diseases in wild-type and B-cell-deficient NOD mice*. Immunology, 2013. **139**(2): p. 179-86.
  41. Hiraoka, N., et al., *Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5423-34.
  42. Yamamoto, T., et al., *Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer*. Pancreas, 2012. **41**(3): p. 409-15.
  43. Salama, P., et al., *Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 186-92.
  44. Han, Y., et al., *CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 111-20.
  45. Kleinewietfeld, M., et al., *CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells*. Blood, 2009. **113**(4): p. 827-36.
  46. Devaud, C., P.K. Darcy, and M.H. Kershaw, *Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(9): p. 869-76.
  47. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the*

- transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
48. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
  49. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
  50. Liu, V.C., et al., *Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2883-92.
  51. Tran, D.Q., H. Ramsey, and E.M. Shevach, *Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype*. Blood, 2007. **110**(8): p. 2983-90.
  52. Kryczek, I., et al., *FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3995-4000.
  53. Zou, L., et al., *Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8451-5.
  54. Tan, M.C., et al., *Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1746-55.
  55. Mailloux, A.W. and M.R. Young, *Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumor-induced immune suppression*. Crit Rev Immunol, 2010. **30**(5): p. 435-47.
  56. Ondondo, B., et al., *Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 197.
  57. Zhou, G. and H.I. Levitsky, *Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2155-62.
  58. Fort, M.M. and P.K. Narayanan, *Manipulation of regulatory T-cell function by immunomodulators: a boon or a curse?* Toxicol Sci, 2010. **117**(2): p. 253-62.
  59. von Boehmer, H., *Mechanisms of suppression by suppressor T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 338-44.
  60. Esposito, I., et al., *[New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]*. Pathologie, 2012. **33 Suppl 2**: p. 189-93.
  61. Hruban, R.H., et al., *An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms*. Am J Surg Pathol, 2004. **28**(8): p. 977-87.
  62. Rozenblum, E., et al., *Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma*. Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1731-4.
  63. DiGiuseppe, J.A., et al., *Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas*. Am J Clin Pathol, 1994. **101**(6): p. 684-8.
  64. Moskaluk, C.A., R.H. Hruban, and S.E. Kern, *p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2140-3.
  65. Wilentz, R.E., et al., *Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 2002-6.
  66. Schneider, G. and R.M. Schmid, *Genetic alterations in pancreatic carcinoma*. Mol Cancer, 2003. **2**: p. 15.
  67. Strobel, O., et al., *In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1999-2009.
  68. Böcker, D., Heitz, *Chronische Pankreatitis*, in Pathologie. 2004. p. 812-15.
  69. Braganza, J.M., et al., *Chronic pancreatitis*. Lancet, 2011. **377**(9772): p. 1184-97.
  70. Etemad, B. and D.C. Whitcomb, *Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new*

- genetic developments*. Gastroenterology, 2001. **120**(3): p. 682-707.
71. Apte, M.V., R.C. Pirola, and J.S. Wilson, *Mechanisms of alcoholic pancreatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 2010. **25**(12): p. 1816-26.
  72. Herold, G., *Chronische Pankreatitis*, in *Innere Medizin*. 2010. p. 485-88.
  73. Malka, D., et al., *Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis*. Gut, 2002. **51**(6): p. 849-52.
  74. Raimondi, S., et al., *Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(3): p. 349-58.
  75. Hermanova, M., et al., *Expression of COX-2 is associated with accumulation of p53 in pancreatic cancer: analysis of COX-2 and p53 expression in premalignant and malignant ductal pancreatic lesions*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(8): p. 732-9.
  76. Pinho, A.V., L. Chantrill, and I. Rooman, *Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2014. **345**(2): p. 203-9.
  77. McKay, C.J., P. Glen, and D.C. McMillan, *Chronic inflammation and pancreatic cancer*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008. **22**(1): p. 65-73.
  78. Dutta, A.K. and A. Chacko, *Head mass in chronic pancreatitis: Inflammatory or malignant*. World J Gastrointest Endosc, 2015. **7**(3): p. 258-64.
  79. Doi, R., et al., *Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial*. Surg Today, 2008. **38**(11): p. 1021-8.
  80. Shrikhande, S.V., et al., *Pancreatic resection for M1 pancreatic ductal adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(1): p. 118-27.
  81. Wagner, M., et al., *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Br J Surg, 2004. **91**(5): p. 586-94.
  82. Diener, M.K., et al., *Pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) versus pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(2): p. CD006053.
  83. Neoptolemos, J.P., et al., *Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial*. JAMA, 2010. **304**(10): p. 1073-81.
  84. Ueno, H., et al., *A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(6): p. 908-15.
  85. Barbier, L., et al., *Pancreatic head resectable adenocarcinoma: preoperative chemoradiation improves local control but does not affect survival*. HPB (Oxford), 2011. **13**(1): p. 64-9.
  86. Schneider, G., et al., *Pancreatic cancer: basic and clinical aspects*. Gastroenterology, 2005. **128**(6): p. 1606-25.
  87. Zuckerman, D.S. and D.P. Ryan, *Adjuvant therapy for pancreatic cancer: a review*. Cancer, 2008. **112**(2): p. 243-9.
  88. Seufferlein, T., et al., *Ductal pancreatic adenocarcinoma*. Dtsch Arztebl Int, 2014. **111**(22): p. 396-402.
  89. Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF. *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom*. Leitlinienprogramm Onkologie 2013 28.10.2015 [cited Langversion 1.0; Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>]
  90. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
  91. Erdek, M.A., L.M. King, and S.G. Ellsworth, *Pain management and palliative care in pancreatic cancer*. Curr Probl Cancer, 2013. **37**(5): p. 266-72.
  92. Gooden, H.M. and K.J. White, *Pancreatic cancer and supportive care--pancreatic exocrine insufficiency negatively impacts on quality of life*. Support Care Cancer, 2013. **21**(7): p.



- 1835-41.
93. Torgerson, S. and L.A. Wiebe, *Supportive care of the patient with advanced pancreatic cancer*. Oncology (Williston Park), 2013. **27**(3): p. 183-90.
  94. Maire, F., et al., *Long-term outcome of biliary and duodenal stents in palliative treatment of patients with unresectable adenocarcinoma of the head of pancreas*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(4): p. 735-42.
  95. Chen, G.Y., et al., *Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells*. J Immunol, 2008. **180**(8): p. 5163-6.
  96. Hinz, S., et al., *Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 8344-50.
  97. Chen, C., et al., *Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36828-34.
  98. Karanikas, V., et al., *Foxp3 expression in human cancer cells*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 19.
  99. Kim, M., et al., *Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53630.
  100. Droeser, R.A., et al., *Negligible nuclear FOXP3 expression in breast cancer epithelial cells compared with FOXP3-positive T cells*. Clin Breast Cancer, 2013. **13**(4): p. 264-70.
  101. Lal, A., et al., *FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast*. Breast Cancer Res Treat, 2013. **139**(2): p. 381-90.
  102. Zuo, T., et al., *FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1275-86.
  103. Moos, M., et al., *Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin*. Nature, 1988. **334**(6184): p. 701-3.
  104. Bergmann, F., et al., *Elevated LICAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Oncol Rep, 2010. **24**(4): p. 909-15.
  105. Brummendorf, T., S. Kenwrick, and F.G. Rathjen, *Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations*. Curr Opin Neurobiol, 1998. **8**(1): p. 87-97.
  106. Gast, D., et al., *L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas*. Int J Cancer, 2005. **115**(4): p. 658-65.
  107. Gavert, N., et al., *L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers*. J Cell Biol, 2005. **168**(4): p. 633-42.
  108. Sebens Muerkoster, S., et al., *Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule LICAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2759-68.
  109. Fogel, M., et al., *L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas*. Lancet, 2003. **362**(9387): p. 869-75.
  110. Kaifi, J.T., et al., *L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer*. Mod Pathol, 2007. **20**(11): p. 1183-90.
  111. Ben, Q.W., et al., *Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(8): p. 2213-21.
  112. Geismann, C., et al., *Up-regulation of LICAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4517-26.
  113. Raveh, S., N. Gavert, and A. Ben-Ze'ev, *L1 cell adhesion molecule (LICAM) in invasive tumors*. Cancer Lett, 2009. **282**(2): p. 137-45.
  114. Kiefel, H., et al., *LICAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in*

- pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression.* *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4766-78.
115. Sebens Muerkoster, S., et al., *alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma.* *Int J Oncol*, 2009. **34**(1): p. 243-53.
  116. Arlt, A., et al., *Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death.* *Oncogene*, 2003. **22**(21): p. 3243-51.
  117. Arlt, A., et al., *Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin.* *Oncogene*, 2001. **20**(7): p. 859-68.
  118. Maretzky, T., et al., *L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth.* *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(20): p. 9040-53.
  119. Nayeem, N., et al., *A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1.* *J Cell Sci*, 1999. **112** ( Pt **24**): p. 4739-49.
  120. Mechtersheimer, S., et al., *Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins.* *J Cell Biol*, 2001. **155**(4): p. 661-73.
  121. Riedle, S., et al., *Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity.* *Biochem J*, 2009. **420**(3): p. 391-402.
  122. Gutwein, P., et al., *Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells.* *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(7): p. 2492-501.
  123. Stoeck, A., et al., *L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells.* *Gynecol Oncol*, 2007. **104**(2): p. 461-9.
  124. Schafer, H., et al., *Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma.* *Cancer Lett*, 2012. **319**(1): p. 66-82.
  125. Ben, Q., et al., *Downregulation of L1CAM inhibits proliferation, invasion and arrests cell cycle progression in pancreatic cancer cells.* *Exp Ther Med*, 2014. **7**(4): p. 785-790.
  126. Grage-Griebenow, E., et al., *L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression.* *Mol Oncol*, 2014. **8**(5): p. 982-97.
  127. Kloppel, G., S. Detlefsen, and B. Feyerabend, *Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern.* *Virchows Arch*, 2004. **445**(1): p. 1-8.
  128. Armstrong, T., et al., *Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma.* *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(21): p. 7427-37.
  129. Pilarsky, C., et al., *Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling.* *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(6B): p. 2823-35.
  130. Nummer, D., et al., *Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma.* *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(15): p. 1188-99.
  131. Dannull, J., et al., *Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells.* *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3623-33.
  132. Liyanage, U.K., et al., *Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma.* *J Immunother*, 2006. **29**(4): p. 416-24.
  133. Satoh, K., et al., *Expression of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) and its receptors in pancreatic duct cell carcinoma and in chronic pancreatitis.* *Pancreas*, 1998. **16**(4): p. 468-74.
  134. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression.* *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
  135. Ino, Y., et al., *Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer.* *Br J Cancer*, 2013. **108**(4): p. 914-23.
  136. Emmrich, J., et al., *Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma.* *Digestion*, 1998. **59**(3): p. 192-8.

137. Schmitz-Winnenthal, F.H., et al., *High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients*. *Cancer Res*, 2005. **65**(21): p. 10079-87.
138. Protti, M.P. and L. De Monte, *Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 210.
139. von Bernstorff, W., et al., *Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(3 Suppl): p. 925s-932s.
140. Tassi, E., et al., *Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients*. *J Immunol*, 2008. **181**(9): p. 6595-603.
141. Rink, L.K., A.; Haase, H., *Immunologie für Einsteiger*. 2. Auflage ed. 2015: Springer Spektrum. p.92-93.
142. Hallbach, J., *Klinische Chemie und Hämatologie biomedizinische Analytik für MTLA und Studium ; 154 Tabellen* 3. überarb. Aufl. ed. 2011, Stuttgart u.a.: Thieme. p. 272.
143. Zeitlmann, L., et al., *Cloning of ACP33 as a novel intracellular ligand of CD4*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 9123-32.
144. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(6): p. 389-400.
145. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 589-601.
146. Xia, M., et al., *Investigations on the clinical significance of FOXP3 protein expression in cervical oesophageal cancer and the number of FOXP3+ tumour-infiltrating lymphocytes*. *J Int Med Res*, 2013. **41**(4): p. 1002-8.
147. Friess, H., et al., *Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival*. *Gastroenterology*, 1993. **105**(6): p. 1846-56.
148. Winerdal, M.E., et al., *FOXP3 and survival in urinary bladder cancer*. *BJU Int*, 2011. **108**(10): p. 1672-8.
149. Gao, Q., et al., *Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(18): p. 2586-93.
150. Sato, E., et al., *Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18538-43.

## V Danksagung

Für die Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Susanne Sebens für die Formulierung und Überlassung des spannenden Promotionsthemas, ihr stetiges Engagement und die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Heiner Schäfer für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und des Mikroskops.

Ich danke Dr. Sandra Freitag-Wolf herzlich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken für die Einweisung in die mikroskopische Auswertung der Präparate und die Zurverfügungstellung der PDAC-Präparate. Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Bence Sipos für die Bereitstellung der CP-Präparate.

Mein weiterer Dank gilt Frau Sandra Krüger für die Durchführung der maschinellen Färbungen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Maike Witt-Ramdohr. Zusätzlich danke ich Herrn Dr. Ole Helm und Dr. Domantas Petrick für die Hilfestellungen und gute Zusammenarbeit.

Auch möchte ich mich bei meinen Geschwistern und meinen Eltern, Hermann und Sybille Mennrich, für die Unterstützung während des Medizinstudiums und in allen Lebenslagen bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Frau, Kathrin Smigaj, die immer für mich da ist und mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt.

## **VI Lebenslauf**

Name: Ruben Mennrich  
Geburtstag: 10. Dezember 1986  
Geburtsort: Lüneburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

1993 – 1997 Grundschule Brietlingen  
1997 – 1999 Orientierungsstufe Scharnebeck  
1999 – 2003 Christiani – Realschule Lüneburg  
2003 – 2006 Fachgymnasium Gesundheit und Soziales - Schwerpunkt Ökotrophologie in Lüneburg, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Medizinischer Werdegang:**

2006 - 2012 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,  
Abschluss: Staatsexamen  
11/2012 Approbation als Arzt vor dem Landesprüfungsamt Schleswig-Holstein  
03/2013 - 02/2014 Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie, Inland Klinikum Rendsburg,  
Chefarzt Herr Dr. med. U. Pulkowski  
seit 07/2015 Psychiatrisches Jahr der Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie,  
Psychiatrische Klinik Lüneburg (PKL)  
2012-2015 Promotion an der CAU Kiel, Institut für Experimentelle Medizin, AG  
Inflammatorische Karzinogenese.  
Titel: Vergleichende Analyse von regulatorischen T-Zellen und der dukta-  
len Expression von FoxP3 und L1CAM in der chronischen Pankreatitis und dem  
dukta- len Pankreasadenokarzinom sowie deren Korrelation mit der  
Überlebenszeit

### **Praktisches Jahr:**

08/2011 – 12/2011: Innere Medizin, Westküstenklinikum Heide  
12/2011 - 04/2012: Neurologie (Wahlfach), UKSH Campus Kiel  
04/2012 – 07/2012: Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Kiel

### **Veröffentlichungen:**

Helm O, **Mennrich R**, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schöfer H, Oberg H-H, Wesch D, Sebens S (2014) Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. PlosOne. 9(5):e94357

Grage-Griebenow E, Goebel L, Gorys A, Helm O, **Mennrich R**, Freitag-Wolf S, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S (2014) Regulatory T-cells and CD4+T-effector cells both mediate epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal epithelial cells. Oncol Res Treat 37(suppl1): 127

Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, **Mennrich R**, Freitag-Wolf S, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Wesch D, Kabelitz D, Sebens T, Schäfer H, Sebens S (2012) Das Adhäsionsmolekül L1CAM beeinflusst das Vorkommen regulatorischer T-Zellen im duktalem Pankreaskarzinom. Z Gastroenterol 50: 860

## **VII 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 29.10.2015

gez. Ruben Mennrich