

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

**Vergleichende Analyse des Einflusses von mononukleären Zellen
aus dem Blut gesunder Spender und von
Pankreasadenokarzinompatienten auf humane
Pankreasgangepithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung
des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ELFI JERG

aus

Ober-Abtsteinach

Kiel 2016

*Das hätte Dir gefallen, Mama.
Deswegen widme ich es Dir.*

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens, Institut für Experimentelle Tumorforschung

2. Berichtstatter: PD Dr. Kirsten Hattermann, Anatomisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2016

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Hans-Jürgen Klomp, Klinik für Allgemeine,
Viszeral-,Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 24.10.2016

Teile dieser Arbeit sind bereits als Tagungsvortrag bzw. Manuskript veröffentlicht:

Freier Kurzvortrag auf dem DGVS Kongress in Hamburg 2012 und erschienen in der Zeitschrift für Gastroenterologie 50:860 (2012)

Grage-Griebenow E, **Jerg E**, Groys 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 Pankreasadenokarzinom.

Grage-Griebenow E, **Jerg E**, Gorys A, Wicklein D, Wesch D, Freitag-Wolf S, Goebel L, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Altevogt P, Schumacher U, Schäfer H, Sebens S (2014) L1CAM promotes

enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression. *Mol Oncol* 8 (5): 982-97

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Makro- und mikroskopische Pathologie des PDAC	2
1.1.3 Tumorprogressionsmodell: Vorläuferläsionen des PDAC und genetische Grundlagen	3
1.1.4 Klinische Darstellung des PDAC	4
1.1.5 Therapieoptionen des PDACs	4
1.1.6 Therapieausblick	5
1.2 Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)	5
1.2.1 Charakteristika von epithelialen und mesenchymalen Zellen	5
1.2.2 Charakteristika der EMT	6
1.2.3 Rolle der EMT in der Karzinogenese	7
1.2.4 Die Rolle von EMT beim PDAC	9
1.2.5 EMT-Marker beim PDAC	9
1.3 Die Rolle von Immunsystem, Tumorstroma und Inflammation in der Karzinogenese	11
1.4 Periphere mononukleären Blutzellen (PBMC)	13
1.4.1 T-Zellen	13
1.4.2 Monozyten / Makrophagen	15
1.4.3 B- und NK-Zellen	16
1.5 Inflammation, Immunzellen und Tumorstroma des PDAC	16
1.5.1 T-Zellen im PDAC	17
1.5.2 Makrophagen im PDAC	17
1.6 Ziele der Arbeit	18
2 Material	19
2.1 Geräte	19
2.2 Computerprogramme	20
2.3 Verbrauchsmaterialien	21
2.4 Chemikalien und Reagenzien	22
2.5 Kits	23
2.6 Antikörper	24
2.7. Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie (HPDE6c7)	25
2.8 Rezepturen	26
3 Methoden	28
3.1 Zellbiologische Methoden	28
3.1.1 Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie (HPDE6c7)	28
3.1.2 Kultivierung der epithelialen Pankreasgangzelllinie HPDE6c7	28
3.1.3 Isolierung der PBMC aus Vollblut	29
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl	29
3.1.5 Co-Kultivierung von HPDE6c7-Zellen mit PBMC	29

3.2 Immunbiologische Methoden.....	30
3.2.1 Oberflächenmarkierung mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie	30
3.3 RNA-Techniken	32
3.3.1 RNA-Isolierung und Präparation.....	32
3.3.2 Herstellung von cDNA	32
3.3.3 Echtzeit Polymerasekettenreaktion	33
3.4 Proteinbiochemische Methoden	34
3.4.1 Herstellung von Ganzzelllysaten	34
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
3.4.3 Westernblot.....	34
3.5 Apoptose Assay.....	37
3.5.1 Prinzip des M30 Assays	37
3.5.2 Durchführung des M30 Assays	37
3.6 Statistik	38
4 Ergebnisse	39
4.1 Einfluss von PBMC gesunder Spender und PDAC-Patienten auf den Phänotyp und das Verhalten von Pankreasgangepithelzellen	39
4.1.1 Zellmorphologie mittels mikroskopischer Beurteilung	40
4.1.2 Nachweis EMT-spezifischer Marker mittels Echtzeit Polymerasekettenreaktion.....	41
4.1.3 Nachweis EMT-spezifischer Marker mittels Westernblot	43
4.1.4 Bestimmung des Apoptoseverhaltens von HPDE6c7-Zellen gegenüber Gemcitabin mittels M30 Assay	45
4.2 Charakterisierung der PBMC mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie	46
4.2.1 Charakterisierung der T-Zellen	46
4.2.3 Charakterisierung der Monozyten und Makrophagen	51
4.2.4 Charakterisierung der B-Zellen und NK-Zellen	53
5 Diskussion	55
5.1 Einfluss von PBMC auf die EMT in Pankreasgangepithelzellen	56
5.2 Einfluss von PBMC auf Apoptoseverhalten und Chemoresistenz in Pankreasgangepithelzellen	61
5.3 Neue Möglichkeiten der PDAC-Therapie	64
Zusammenfassung	68
Anhang.....	69
Abbildungsverzeichnis	69
Abkürzungsverzeichnis	69
Tabellenverzeichnis	71
Literaturverzeichnis.....	72
Lebenslauf.....	90
Danksagung	91
Erklärung.....	92

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) gehört mit 3,2 % (♂) bzw. 3,6 % (♀) Beteiligung zu den zehn häufigsten malignen Tumorerkrankungen in Deutschland. Im Jahre 2010 erkrankten über 16.000 Menschen an einem PDAC. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei Männern bei 71 und bei Frauen bei 75 Jahren. Das Lebenszeitrisiko beträgt für beide Geschlechter 1,6 % [1].

Obwohl das PDAC nur einen kleinen Anteil unter den verschiedenen Tumorentitäten darstellt, bedingt die Bösartigkeit des Tumors 6,4 % (♂) bzw. 7,9 % (♀) aller tumorbedingten Todesfälle und steht an vierter Stelle der malignen Todesursachen [1]. Die Prognose für das PDAC ist fatal. Dies spiegelt sich ebenfalls in der standardisierten Inzidenz- (13,8 % ♂ / 10,0 % ♀) und Mortalitätsrate (12,8 % ♂ / 9,5 % ♀) von 2011 wieder, die nahezu identisch sind [1]. Bereits im ersten Erkrankungsjahr sterben mehr als 60 % der Erkrankten, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Geschlechter bei 8 %. Das PDAC weist somit die niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebserkrankungen auf [1].

Die meisten Fälle des PDAC treten sporadisch auf. Der wichtigste prädisponierende Faktor dabei ist ein hohes Lebensalter [2]. Daneben gelten als gesicherte Umweltrisikofaktoren Nikotin- und Alkoholabusus. Eine Assoziation zu Ernährungsgewohnheiten (hoher Fett- und Fleischkonsum) wird diskutiert [2-4]. Weiterhin steht der Einfluss umweltbedingter Schadstoffe durch berufliche Exposition (Minen- und Zementarbeiter) sowie gegenüber Chemikalien (2-Naphthlyamin, Benzidin, Benzinderivaten) in Verdacht, risikoerhöhend zu sein [3].

Als krankengeschichtliche Risikofaktoren gelten Adipositas und ein langjähriger Diabetes mellitus Typ 2 [2, 3]. Patienten, die an einer chronischen Pankreatitis (CP) leiden, weisen ein kumulatives Risiko bei einem 20-jährigen Verlauf von etwa 4 % auf [2] und erkranken bis zu 20-mal häufiger an einem PDAC als Personen aus Kontrollgruppen [5].

In 10 % der Pankreaskarzinomfälle kommen hereditäre Ursachen in Betracht [2, 6]. Dabei sind diverse hereditäre Tumorsyndrome mit einem vermehrten Auftreten eines PDAC assoziiert. Dazu zählen unter anderem das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer: HBOC*), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) sowie das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: HNPCC*) sowie diverse weitere [4,

6, 7]. Tritt das PDAC innerhalb einer Familie bei zwei erstgradig Verwandten ohne andere Tumorentitäten auf, spricht man von einem familiären Pankreaskarzinom (*Familial pancreatic cancer: FPC*) [6]. Als weiterer vererbbarer Risikofaktor gilt die hereditäre Pankreatitis. Davon betroffene Patienten weisen ein erhöhtes Lebenszeitrisko von 40 % auf, ebenfalls an einem PDAC bis zum 70. Lebensjahr zu erkranken [2].

1.1.2 Makro- und mikroskopische Pathologie des PDAC

Neoplasien des Pankreas lassen sich in solide und zystische Pathologien unterteilen [10]. Das duktales Adenokarzinom gehört den soliden Epitheltumoren an. Da es mit 80-90 % die häufigste Form der malignen Pankreastumore darstellt [2, 4] und Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist, wird auf die zystischen Läsionen im Folgenden nicht weiter eingegangen. Die bevorzugte Lage des makroskopisch derb-weißlich wirkenden Tumors ist der Pankreaskopf [2, 8].

Histologisch typisch für das PDAC sind schleimbildende Drüsen, die vorwiegend zwei Formationen annehmen [8]. Zum einen können sie sich gut differenziert mit dicht gelagerten Tumordrüsenläschen und einem wenig polymorphen Zylinderepithel in polarer Anordnung präsentieren. Zum anderen ist ein weniger differenziertes Erscheinungsbild mit einem Nebeneinander von gut entwickelten Drüsenformationen und weniger ausgereiften tubulären Strukturen möglich [8]. Begleitend tritt eine charakteristische intensive desmoplastische Stromareaktion auf, die aus Fibroblasten, inflammatorischen sowie endothelialen Zellen und einer komplexen extrazellulären Matrix (EZM) besteht [7]. Häufig finden sich zentrale Nekrosen und perifokale Bindegewebsneubildungen sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen [8]. Die Abgrenzung der ohnehin unscharfen Tumorränder kann durch eine Begleitpankreatitis und Vernarbungsprozesse erschwert werden [8]. Die Ausbreitung des Tumors erfolgt mikroskopisch durch Ausläuferzellen invasiv entlang von Nervenscheiden, lymphatischem Gewebe und kleinen Gefäßen [7, 8]. Am häufigsten treten regionale Lymphknoten- und Lebermetastasen auf. Seltener sind Lunge und Peritoneum, sehr selten Knochen und Nebennieren betroffen [2].

Die histologische Unterscheidung in die verschiedenen Varianten des PDAC bestimmt die Prognose entscheidend [7].

1.1.3 Tumorprogressionsmodell: Vorläuferläsionen des PDAC und genetische Grundlagen

Wie andere epitheliale Tumoren entwickelt sich auch das PDAC über verschiedene Vorläuferstadien [2]. Die bedeutendste Vorläuferläsion stellt die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) dar [9]. Die PanIN wird in vier Dysplasiegrade unterteilt. Dabei spiegeln sich die unterschiedlichen Progressionsstadien in morphologischen Korrelaten wider. Ausgehend vom gesunden Gangepithel entwickelt sich zunächst eine flache Epithelläsion (PanIN-IA) bzw. papilläre Epithelwucherung (PanIN-IB) ohne Zellatypien. Daraus entsteht eine papilläre bzw. kribriiforme Epithelwucherung mit gering- bzw. hochgradigen Zellatypien (PanIN-II bzw. -III/CIS: Carcinoma In Situ). Bei Überschreiten der Basallamina handelt es sich definitionsgemäß um ein infiltrativ wachsendes Karzinom [3, 8].

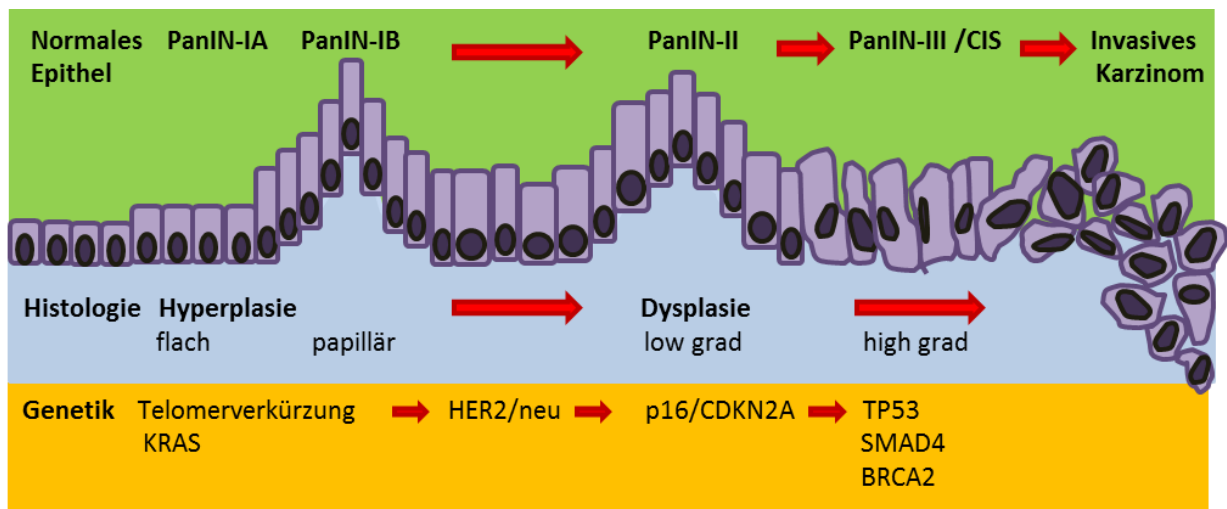


Abbildung 1: Genetisches Progressionsmodell des PDAC: Grün: Vom gesunden duktalem Epithel über eine Reihe von histologischen Vorläuferläsionen (PanIN-I-III) zum infiltrativen Karzinom (links nach rechts); Blau: histologische Kriterien; Gelb: verschiedene Zeitpunkte der genetischen Alterationen. Auf Grundlage: [3, 10, 11]. CIS: Carcinoma in situ

PanINs sind häufig angrenzend bzw. im PDAC lokalisiert. Verlaufsdokumentationen von Patienten bestätigten, dass sich aus PanINs ein infiltratives PDAC entwickeln kann [12]. Die Zunahme von zytologischen Atypien in den PanINs geht mit bestimmten genetischen Veränderungen einher [11]. Viele dieser sporadischen genetischen Alterationen treten ebenfalls im infiltrativen PDAC auf [2, 9]. Dies stellt die Grundlage für das Progressionsmodell des PDAC dar (**Abbildung 1**). Festsustellen ist, dass einige Mutationen vor anderen auftreten, obwohl nicht zwangsläufig jede Mutation in jedem PDAC vorkommt. So stellen die Punktmutationen im *Kirsten ras oncogene (KRAS)* und die Überexpression von *Human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2/neu)* frühe Ereignisse dar, wobei die Mutation von *KRAS* bereits in über 90 % der ersten Vorläuferläsionen (PanIN-I) zu finden ist. Daneben kommt es frühzeitig zur Telomerverkürzung [2]. Im Anschluss daran erfolgt meist die

Inaktivierung des Tumorsuppressorgenes *p16*, späte Ereignisse sind die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *TP53*, *DPC4* sowie *BRCA2* [10, 11].

1.1.4 Klinische Darstellung des PDAC

Symptome des Pankreas werden aufgrund seiner retroperitonealen Lage erst spät klinisch manifest. Oft unerkannt bleiben unspezifische Vorboten wie Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Bauch- und Rückenschmerzen, die möglicherweise erst bei der Ausprägung einer Kachexie und Schwäche ernst genommen werden. Ein auffälliges Zeichen ist der schmerzlose Ikterus. Dabei verursacht ein Tumor des Pankreaskopfes durch die Kompression des Gallengangs einen Gallenstau. Wird das Duodenum obstruiert, treten Übelkeit und Erbrechen auf. Eine Gangobstruktion des Pankreas selbst kann zur Ausprägung einer akuten Pankreatitis führen. Ein weiterer Hinweis auf ein malignes Geschehen kann das Neuauftreten eines Diabetes mellitus sein [2].

1.1.5 Therapieoptionen des PDACs

Unglücklicherweise kann aufgrund der spät auftretenden Symptome, der frühen Metastasierung und der ungünstigen Tumorumlage nur bei 15-20 % der Betroffenen die einzig potentiell kurative Therapie, die Operation (partielle Pankreatikodudenoektomie nach Whipple) angestrebt werden [2]. Ziel der Operation ist die totale Tumorentfernung en-bloc im Gesunden [4]. Ergänzend zur chirurgischen Therapie wird je nach Resektion R0 bzw. R1 (R0= mikroskopisch keine Karzinomzellen am Resektionsrand nachweisbar; R1= am Resektionsrand sind Karzinomzellen nachweisbar) eine adjuvante bzw. additive Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-FU/Folinsäure vorgenommen [4].

Zur Therapie des metastasierten PDACs gehört neben der palliativen Chirurgie die Chemotherapie mit Gemcitabin. Alternativ zur Gemcitabin-Monotherapie kann eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Erlotinib (*Epithelial-growth-factor (EGF)-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor*) eingesetzt werden. Bei günstigem Risikoprofil und gutem Allgemeinzustand kann das FOLFIRINOX-Protokoll (Kombination aus 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) angewandt werden [4]. Eine Radiotherapie wird aufgrund des umfangreichen Nebenwirkungsspektrums nicht empfohlen. Aufgrund dieser miserablen Ausgangslage stehen in der palliativen Therapie supportive Maßnahmen, die auf eine Schmerzreduktion, Wohlbefinden und Erhalt der Lebensqualität abzielen, im Vordergrund.

1.1.6 Therapieausblick

Da die einzig kurative Therapieoption des PDAC die Operation in einem frühen Stadium der Erkrankung darstellt und eine ausgeprägte Chemo- und Strahlenresistenz zu einer schlechten Therapierbarkeit in späteren Stadien führt, werden in der Forschung zunehmend die Strukturen des Tumorstromas und der dort ansässigen Zellen als therapeutische Ansatzpunkte fokussiert.

Darüber hinaus stellt eine frühzeitige Erkennung des PDAC eine wichtige Voraussetzung für das Langzeitüberleben dar, sodass ein Screening-Verfahren von Hochrisikopatienten sowie eine verbesserte Diagnostik von Vorläuferläsionen ebenso sinnvoll wie wünschenswert ist.

1.2 Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)

1.2.1 Charakteristika von epithelialen und mesenchymalen Zellen

Epitheliale Zellen sind differenzierte Zellen, die der Abgrenzung des Körpers zur Außenwelt dienen [13]. Sie bilden feste Zellverbände über *tight*, *adherens* und *gap junctions* sowie Desmosomen [14]. *Adherens junctions* sind für den Zell-Kontakt epithelialer Zellen untereinander zuständig, während *Gap junctions* der lateralen Seite die Kontakte zwischen Zelle und EZM herstellen. Durch die Basallamina wird eine Polarisierung der Zellen mit einer apikal-basolateralen Ausrichtung erreicht. Weiterhin dient die Basallamina als Verankerung der basalen Zelloberfläche mit der EZM und beschränkt das Bewegungsausmaß der Zellen auf eine laterale Migration innerhalb des Zellverbands [14-16]. An der apikalen Seite besitzen die Epithelzellen spezialisierte Charakteristika wie Mikrovilli bzw. Adhäsionsmoleküle [15]. Zu den charakteristischen Markern, die von Epithelzellen exprimiert werden, zählt das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, das der Klasse der Typ-1-Transmembranglykoproteine angehört. Es ist in *adherens junctions* und Desmosomen lokalisiert und nimmt eine wichtige Rolle beim Erhalt der strukturellen Integrität in epithelialen Zellschichten durch Zell-Zellkontakte ein [17, 18]. Außerdem interagiert es mit Immunglobulinen benachbarter Zellen. Über seine intrazelluläre Domäne ist es an das Aktin-Zytoskelett und an eine Reihe von Signalwegen, vor allem *Wnt* bzw. β -Catenin, angeschlossen [19, 20]. Weitere Epithelmarker sind *Occludin* und *Claudin* (beide Bestandteile der *tight junction*) [21, 22], Desmoplakin (Protein der Desmosomen), ein Teil der Intermediärfilamente sowie die Zytokeratine [21].

Mesenchymale Zellen, zu denen unter anderem Fibroblasten zählen, liegen lose verteilt in der EZM [20]. Sie besitzen eine bipolare Morphologie und eine feine spindel- bzw. sternförmige Struktur. Kontakte der mesenchymalen Zellen sind zufällig und instabil, eine Bindung zur Basallamina fehlt.

Das Zytoplasma ist organellreich mit großen Mitochondrien, einem gut entwickelten Golgi-Apparat, vielen freien Polyribosomen und langen Segmenten von granulärem Endoplasmatischem Retikulum [15]. Die Zellen weisen eine hohe Migrationsfähigkeit auf [14]. Zu den mesenchymalen Markern zählen das Intermediärfilament Vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA), extrazelluläre Glykoproteine wie Fibronectin und Vitronectin, das fibroblastenspezifische Protein-1 (FSP-1) sowie das Adhäsionsmolekül N-Cadherin [14, 16]. Außerdem werden die Transkriptionsfaktoren *Slug* und *Snail* vermehrt exprimiert [14].

1.2.2 Charakteristika der EMT

Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) ist ein biologischer Prozess, der es polarisierten epithelialen Zellen erlaubt durch multiple Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp anzunehmen [18]. Für das Gelingen wird ein breites Spektrum von inter- und intrazellulären Veränderungen benötigt [14]. Diese finden jedoch nicht immer alle gleichermaßen statt. Der Vorgang der EMT ist zwar aus der Embryo- und Organogenese bekannt, jedoch wurde lange Zeit angenommen, dass adulte Epithelialzellen einem Zustand der Stabilität unterliegen. Erst die Entdeckungen von Greenburg und Hay [15] zeigten, dass es auch in adulten epithelialen Zellen unter bestimmten Bedingungen zu einer Transition mit Aneignung von mesenchymalen Charakteristika kommen kann [15]. Der dadurch entstehende spindelförmige Phänotyp mit feinen Filopodien und Pseudopodium ermöglicht die Ausbreitung und Fortbewegung in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix. Diese Eigenschaft wurde bis dato nur mesenchymalen und malignen Zellen zugesprochen [15] (siehe **Tabelle 1**)



Charakteristika	Epithelialer Zustand	Mesenchymaler Zustand
		
Figur	Polygonal, hochprismatisch	Spindelförmig
Polarisation	Apico-basolateral	Anterior-posterior
Zell-Zell Kontakte	Stark	Fokal
Migrationspotential	Limitiert	Stark
Marker	E-Cadherin, Zytokeratin, Occludin, Claudin, Desmoplakin	Vimentin, α -SMA, N-Cadherin, Fibronectin, Vitronectin
Transkriptionsfaktoren		<i>Snail</i> , <i>Slug</i> , <i>SIP1</i> , <i>ZEB-2</i> , <i>Twist</i> , <i>LEF-1</i>

Tabelle 1: Übersicht EMT-assoziierter Veränderungen in Epithelzellen, modifiziert nach [17, 23]

1.2.3 Rolle der EMT in der Karzinogenese

Kalluri und Weinberg etablierten eine Klassifikation zur Unterscheidung verschiedener EMT-Subtypen. Neben der physiologischen EMT während der Embryo- und Organogenese werden zwei weitere Arten differenziert. Zum einen EMT, die die Wundheilung und Geweberegeneration ermöglicht und mit Inflammation und der Entstehung von Fibrose einhergeht [23]. Zum anderen definierten Kalluri und Weinberg als dritten EMT-Subtyp den Prozess, der die Progression von neoplastischen Zellen unterstützt [23].

Die häufigsten soliden Tumore des Menschen, die sogenannten Karzinome, stammen von verschiedenen epithelialen Zellen des Körpers [20]. Bei der Entwicklung des Karzinoms nimmt die EMT eine wichtige und unterstützende Funktion auf mehreren Stufen ein [17, 23]. So wird zunächst die Invasivität und Motilität der Zellen erhöht. Dadurch gelingt die Loslösung aus dem Zellverband sowie das Durchbrechen der Basallamina (*invasion*). Mit dem Zugang zu Blut-/Lymphgefäßen (*intravasation*) wird eine Streuung und Verteilung der Zellen im Körper ermöglicht [17, 24]. Auch beim Verlassen des Blutstroms (*extravasation*) und/oder der Formation von Mikrometastasen wird vermutet, dass EMT bzw. deren Reversion eine Rolle spielt [17, 24]. Um effektiv Makrometastasen in entfernten Organen zu formen, müssen die Tumorzellen verschiedene Gewebe infiltrieren, sich an ihre neue Umwelt anpassen, und eine starke Proliferationsfähigkeit aufweisen. Um diese Prozesse zu ermöglichen, wird bei den Tumorzellen die Mesenchymal-Epitheliale-Transition (MET) diskutiert [17, 21]. Es wird deutlich, dass EMT kein irreversibler Prozess darstellt, sondern vielmehr einen Übergang, der sich je nach Umfeldstimulus in die eine oder andere Richtung verändern kann [23]. Dabei ist eine permanente Induktion von EMT, z.B. über die konstitutive Aktivierung von Rezeptoren, die zu Veränderungen auf transkriptioneller Ebene führen, möglich [25]. Die Folge ist die Loslösung der EMT von kontinuierlichen Signalen aus der Tumorumgebung und Stabilisation des mesenchymalen Phänotyps [25].

Das komplette Spektrum der Signalkaskade, die die EMT in Karzinomzellen reguliert, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und zelluläre Signalwege sind an der Auslösung des EMT-Programmes beteiligt. Diese Botenstoffe können aus dem tumorassoziierten Stroma stammen oder werden von den Tumorzellen selbst gebildet [23]. Sie stellen sowohl lösliche als auch nicht lösliche Komponenten der EZM dar [17]. Zu den löslichen Botenstoffe zählen *TGF- β -1-3* und *bone morphogenetic proteins (BMP)*, beide aus der *Transforming-Growth-Factor*-Familie. Weitere lösliche Wachstumsfaktoren sind *fibroblast growth factor (FGF)*, *hepatocyt growth factor (HGF)*, *epidermal growth factor (EGF)* und *platelet derived growth factor (PDGF)* [17, 23]. Neben Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Periostin spielen Kollagen und Hyaluronsäure als nicht lösliche

Faktoren eine Rolle [14]. Ferner kann es durch schnelles Tumorwachstum mit Auslösung eines hypoxischen Zellzustandes zur EMT-Aktivierung kommen [25].

TGF- β gilt als bedeutendster löslicher EMT-induzierender Faktor [17]. TGF- β kann sowohl als Tumorsuppressor als auch -promoter fungieren [17, 19]. Zunächst ist TGF- β ein wichtiger Suppressor der epithelialen Zellproliferation [23] und Regulator der Gewebemöostase [17]. So zeigt der Wachstumsfaktor in der Frühphase der Tumorformation einen inhibitorischen Effekt und kann zur Apoptose der Zellen führen [23]. In späteren Stadien der Erkrankung wird TGF- β allerdings zu einem positiven Regulator der Tumorprogression sowie Metastasierung [23, 26-28] und kann über die Induktion von EMT zum Tumorpromoter avancieren [17]. TGF- β führt vorwiegend über zwei Signalkaskaden zur EMT. Eine Möglichkeit stellt die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) dar, die durch kleine G-Proteine phosphoryliert und aktiviert wird [16, 23, 29]. Alternativ trägt der SMAD-abhängige Weg durch Phosphorylierung und Heterotrimerformation verschiedener SMAD-Proteine sowie deren Translokation in den Nukleus zur EMT bei. Beide Signalkaskaden resultieren in einer Wechselwirkung von aktivierten Proteinen über DNA-Bindung mit Transkriptionsfaktoren [7, 16, 29, 30]. Daraus erfolgt die Aktivierung bzw. Hemmung der Transkription von EMT-assoziierten Genen, die Migration und Invasion der Karzinomzellen fördern [7, 16, 29, 30].

Vor allem die E-Cadherin regulierenden Gene gelten als Zielstruktur [31]. An der Repression dieser Gene beteiligen sich folgende Proteine: *zinc finger proteins (Snai1 (Snail) und Snai2 (Slug))*, *zinc finger E-Box Binding Homeobox1 (ZEB-1)*, *smad interactin protein-1 (SIP1 oder ZEB-2)* und *basic helix-loop-helix (bHLH bzw. Twist)* [31-36]. Als Folge der E-Cadherin Repression wird β -Catenin, das normalerweise am zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin gebunden ist, freigesetzt. Das β -Cateninmolekül wandert daraufhin in den Kern und aktiviert dort als Transkriptionsfaktoruntereinheit die Expression von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren.

Gemeinsam mit der Inhibition von weiteren epithelialen Proteinen (*ZO-1, Occludin, Claudin-1, Claudin-7, Desmoplakin, Zytokeratine*) kommt es zum Verlust von epithelialen Eigenschaften [37]. An der Auflösung der Zell-Zell-Adhäsion sind Matrixmetalloproteasen (MMP-1,-2,-3,-7 und -14) beteiligt [21]. Die Zellverbände werden durch eine verminderte Anzahl an *adherens* sowie *gap junctions* instabil und lösen sich mit der Zellpolarität auf [16, 38-43]. Neben der E-Cadherin-Repression fungieren *Slug, Snail, ZEB-1, ZEB-2, Twist, Vimentin, Goosecoid, FoxC2* und *Sip-1* [14, 16, 20, 44-47] gleichzeitig als Regulatoren mesenchymaler Proteine. Es erfolgt ein Zugewinn an mesenchymalen Eigenschaften und eine gesteigerte Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin, Vimentin, α -SMA, Fibronektin [25, 48]. Das Zytoskelett wird umstrukturiert und unter Annahme einer mesenchymalen, spindelförmigen Morphologie kommt es zur Zellmigration mit zellulärer Dissemination und Invasion und schließlich zur Tumormetastasierung [37, 49, 50].

1.2.4 Die Rolle von EMT beim PDAC

Das PDAC zeichnet sich durch eine frühe Invasion und Dissemination der Tumorzellen aus. Hinzu kommt eine erschwerte Therapie durch ausgeprägte Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie. Der Arbeitsgruppe um Andrew Rhim gelang es *in vivo* in einem endogenen PDAC-Mausmodell, den Eintritt von pankreatischen Gangepithelzellen bereits im Stadium von PanINs in den Blutstrom zu detektieren und konnten dies mit EMT assoziieren [51]. Das heißt, die Zelldissemination wurde vor der Detektion eines primären Tumors festgestellt, was unterstreicht, dass die Metastasierung eines PDAC ein frühes Ereignis in der Tumorentwicklung darstellt. Demnach ist davon auszugehen, dass die Metastasierung vor und parallel zur Primärtumorformation stattfindet und sich einem frühen histologischen Tumornachweis entzieht [51]. Diese Befunde werden durch eine weitere Studie derselben Gruppe gestützt, in der der Nachweis von zirkulierenden Pankreasgangepithelzellen im Blut von Patienten mit zystischen Läsionen des Pankreas erbracht werden konnte [52]. Dies lässt vermuten, dass EMT in der Tumorprogression des PDAC eine entscheidende Rolle spielt.

1.2.5 EMT-Marker beim PDAC

Im Rahmen der EMT kommt es in verschiedenen Karzinomzellen zum Verlust des epithelialen Markers E-Cadherin [49, 53]. Auch im PDAC wird die Tumorprogression durch E-Cadherin Verlust vorangetrieben und aufrechterhalten [53]. Es konnte gezeigt werden, dass eine *Snail* vermittelte Repression der E-Cadherin-Expression zu EMT und Metastasierung führt [53]. In einer Studie von Arumugam et al. wurde zudem in verschiedenen PDAC-Zelllinien ein inverser Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression und seinem Transkriptionssuppressor *ZEB-1* nachgewiesen [54]. Eine Studie an chirurgischen PDAC-Resektaten stellte auf Transkriptionsebene in nahezu 80 % eine moderate bis starke *Snail*-Expression fest. In 50 % zeigt sich eine ähnliche *Slug*-Expression [55]. Im gesunden umliegenden Pankreasgewebe hingegen findet sich keine Expression der genannten Faktoren [55]. Eine verminderte E-Cadherin-Expression korreliert mit einer erhöhten *Snail*-Expression sowie mit einem höheren Tumorgrad [55]. Im Einklang damit weisen pankreatische, undifferenzierte Zelllinien vermehrte EMT-Charakteristika (hohe *Snail*- und geringe E-Cadherin-Expression) im Vergleich zu differenzierten Zelllinien auf [55].

Das erste Zytokin, dem eine EMT-Induktion in PDAC-Zellen und daraus resultierende gesteigerte Migrations- und Invasionsfähigkeit nachgewiesen wurde ist TGF- β [27, 56-58]. Der TGF- β -Signalweg ist im PDAC gestört und hat eine bedeutende Funktion in der Initiierung der EMT und Ausbildung eines invasiven Phänotypes [17, 19].

In 55 % der Fälle liegen im PDAC-Mutationen vor, durch die es zur SMAD4-Inaktivierung kommt [16, 59]. Zusammen mit einer Überexpression der TGF- β -Isoformen und Herunterregulation von Rezeptoren entsteht ein Wachstumsvorteil durch Ausschaltung des zytostatischen Effektes. In einer *in vitro* Studie mit der Behandlung von pankreatischen Karzinomzelllinien mit TGF- β [27] konnte eine Induktion von EMT, einhergehend mit morphologischen Veränderungen und Verlust an epithelialen und gleichzeitigem Gewinn von mesenchymalen Markern, generiert werden [27, 56-58]. Daraus resultierte *in vitro* eine vermehrte Tumorzellmigration, -invasion und -verteilung [27].

So zeigt auch die Vimentinexpression [60-63] im PDAC sowie in anderen Tumorentitäten eine Korrelation mit Invasivität und Metastasierung sowie einem verkürztem Überleben [64]. Ferner besteht ein Zusammenhang zwischen der Vimentinexpression und dem histologischen Differenzierungsgrad [64-67].

Ein weiterer mesenchymaler Marker stellt das *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM oder auch bekannt als Ig-CAM L1 oder CD171), das Mitglied der neuronalen Immunoglobulin Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle ist, dar [68]. Normalerweise wird L1CAM im neuronalen System exprimiert und trägt dort zur neuronalen Adhäsion und Migration bei [68, 69]. Unter physiologischen Umständen ist die L1CAM-Expression ausschließlich auf neuronalen Strukturen des Pankreas positiv, während das azinäre Parenchym und die duktaalen Pankreasgänge L1CAM negativ sind [70-72]. Jedoch zeigt sich bereits in nicht-neoplastischen duktaalen Pankreaszellen der CP sowie in den PanINs und in über 50 % der PDAC eine in der Tumorprogression steigende L1CAM-Expression [73]. Die Expression in PanINs und CP spricht für eine frühe Rolle von L1CAM in der Tumorgenese des PDAC [70, 73, 74]. Die L1CAM-Expression erfolgt über TGF- β -1 induzierte Slug-Aktivierung [70]. In der humanen pankreatischen duktaalen Epithelzelllinie (HPDE6c7) und in PDAC-Zellen geht die L1CAM-Aktivierung mit der Ausbildung eines migratorischen Phänotyps mit erhöhter Zellmigration und Chemoresistenz einher [70, 74]. In prä- und malignen Pankreasgangepithelzellen wurde L1CAM weiterhin mit EMT, Zellinvasion, erhöhter *in vivo* Tumorgenität sowie gesteigerter Apoptoseresistenz assoziiert [70, 71, 75, 76]. Die erhöhte Expression korreliert ebenso mit einer erhöhten Lymphknoten-, Gefäß- und Nerveninvasion [70, 77-79]. L1CAM stellt einen eigenständigen prognostischen Faktor dar [68] und geht im PDAC sowie in Tumoren anderer Entität mit einer schlechten Prognose und verkürztem Überleben einher [70, 77-79].

Darüberhinaus zeigt sich eine Beteiligung der EMT an der Generation von Gemcitabinresistenten aus Gemcitabinsensitiven PDAC-Zellen [61]. EMT-typische Zellen (niedrige E-Cadherin- und hohe *ZEB-1*-Expression) zeigen sich resistent gegenüber Gemcitabin, 5-FU und Cisplatin, während epitheliale Zellen (hohe E-Cadherin- und niedrige *ZEB-1*-Expression) eher sensitiv gegenüber Chemotherapeutika sind [54]. In etablierten PDAC-Zelllinien konnte nach Stimulation mit Gemcitabin nicht nur eine 50-

fache Resistenz gegenüber dieser Chemotherapeutika, sondern auch Charakteristika der EMT, wie morphologische, funktionale (vermehrte Migration und invasives Potential) und molekulare Alterationen (Hochregulation von Vimentin und Herunterregulation von E-Cadherin), gezeigt werden [61, 80, 81].

Weiterhin wurde in chirurgischen Resektaten von humanen PDACs eine Korrelation zwischen EMT-Markern und einer schlechten Prognose nachgewiesen [82]. High-grade Tumore und Areale schlechter Differenzierung in low-grade Tumoren zeigen eine verminderte E-Cadherin-Expression sowie eine vermehrte Expression von Fibronektin und Vimentin [82]. Patienten, deren Tumoren ausgeprägte EMT-Eigenschaften aufweisen, haben geringere Überlebenschancen als solche mit einer milderer Ausprägung [82]. Zusammenfassend gehen eine verringerte E-Cadherin [53, 83] und verstärkte Vimentin- [64], TGF- β - [16, 59, 84-86] bzw. L1CAM-Expression [68] einher mit verstärktem Auftreten von EMT im PDAC und sind mit einer schlechten Prognose und verringertem Überleben assoziiert.

1.3 Die Rolle von Immunsystem, Tumorstroma und Inflammation in der Karzinogenese

Damit die maligne Transformation erfolgreich sein kann, müssen die Karzinomzellen initial der Immunüberwachung entgehen [93]. Dies gelingt, indem sie verschiedene Mechanismen entwickeln, durch die sie „unsichtbar“ gegenüber der Detektion durch Immunzellen werden bzw. lernen, wie sie gegen sich gerichtete Immunzellen eliminieren. Dazu zählen Antigenverlust, Herunterregulation von *major-histocompatibility-complex (MHC)*-Molekülen, Deregulation oder Verlust von Komponenten des endogenen Antigenpräsentierungssignalweges, Tumor-induzierte Immunsuppression gesteuert durch Zytokinausschüttung oder direkte Interaktionen zwischen Tumorliganden und Immunzellrezeptoren [88]. Auch das sogenannte *Immunoediting* trägt dazu bei. Dabei erfolgt die Auslese von Tumorzellsubpopulationen, die vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden, mit dem Verbleib von resistenten Tumorzellen, die weiterhin proliferieren und somit zur Tumorausbildung beitragen können [89].

Bei der Tumorprogression und –metastasierung spielt weiterhin das Tumorstroma sowie die Umgebung eine entscheidende Rolle. Strukturen des Tumorstromas stellen die EZM, endotheliale Zellen, Karzinom-assoziierte Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen sowie verschiedene Immunzellen (u.a. Makrophagen, T-Zellen) dar [90]. Untereinander kommunizieren und interagieren diese Bestandteile durch direkten Zellkontakt oder indirekt mittels löslicher Faktoren wie Zytokinen bzw. Chemokinen. Dies kann autokrin oder parakrin erfolgen [91]. Stromazellen beeinflussen die

Tumorumgebung sowie die Interaktion des Immunsystems mit dem Tumor stark [92, 93]. Die in der Tumormikroumgebung ansässigen Immunzellen wurden anfänglich als Versuch des Körpers gesehen den Tumor zu eliminieren. Mittlerweile gibt es profunde experimentelle und klinische Hinweise, dass Tumor-assoziierte Immunzellen wesentlich zur Tumorentwicklung beitragen. Dieses soll im Folgenden näher erläutert werden.

Bereits 1863 stellte Virchow fest, dass Inflammation eine fördernde Wirkung auf die Tumorprogression ausübt [92]. Dies ist mittlerweile eine anerkannte Theorie und wurde in die „Hallmarks of Cancer“ aufgenommen [94]. So verstärkt die Inflammation die Mutationsrate und Proliferation von Zellen und unterstützt somit die Entwicklung von Neoplasien. Dies geschieht durch aktivierte Leukozyten und andere phagozytierende Zellen, die im Kampf gegen eine Infektion *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen intermediates* (RNI) bilden. Diese Radikale verursachen DNA-Schäden und genomische Instabilität [21, 91]. Liegt eine chronische Infektion vor, kann dies zu genomischen Veränderungen (Punktmutationen, Deletionen, Rearrangements) führen [95].

Sind gewisse Onkogene (wie *RAS*, *Myc*, *RET*) von Mutationen betroffen, können Signalwege aktiviert und verstärkt werden, die der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-6, IL-8, IL-1 β , CCL2, CCL-20) dienen [96]. Chemokine spielen auch in nicht-inflammatorischen Zellen eine zentrale Rolle und tragen in Tumoren zu Wachstum und Progression bei [92]. Darüber kommt es z.B. zu einer tumorfördernden Umstrukturierung der Mikroumgebung [96, 97]. Dazu gehört die vermehrte Anlockung von Leukozyten bzw. Lymphozyten [96]. Auch inflammatorische Zellen stellen starke Tumorpromotoren dar. Sie schaffen eine vorteilhafte Umgebung für Tumorwachstum u.a. durch den Umbau der EZM, wodurch die Zellinvasion erleichtert [92] und das Tumorwachstum bzw. Tumorinvasion unterstützt werden [94, 98]. Zusätzlich schütten Immunzellen tumorfördernde Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren aus. Ein sich selbst verstärkender Prozess, der die Karzinogenese kontinuierlich antreibt, wird somit in Gang gesetzt [92, 97].

Darüber hinaus nutzen Karzinomzellen Mechanismen von inflammatorischen Zellen, um die Tumorprogression und -metastasierung zu ermöglichen [92]. Bei dem Prozess der Fernmetastasierung werden z.B. nicht nur trophische Faktoren, die von inflammatorischen Zellen produziert werden, sondern auch deren Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Rezeptoren verwendet. So wird u.a. der Eintritt von disseminierten Tumorzellen nach EMT in Blut- bzw. Lymphgefäße durch eine inflammationsbedingte Permeabilitätserhöhung der Gefäße erleichtert [91]. Zudem erfolgt die Extravasation der Karzinomzellen Integringesteuert [94], ein Mechanismus der normalerweise Immunzellen vorbehalten ist. Daneben werden Migration sowie das *Homing*, d.h. die spezifische Anlockung maligner Zellen durch chemotaktische Faktoren in entfernte Organe, durch Ausnutzung von Mechanismen und Signalwegen des Immunsystems erleichtert [92].

1.4 Periphere mononukleären Blutzellen (PBMC)

Die zellulären Bestandteile des Blutes, darunter auch die Zellen des Immunsystems, gehen aus pluripotenten Vorläuferzellen hervor, den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [99]. Die direkten Vorläuferzellen werden in eine lymphatische und myeloide Zelllinie differenziert [99]. Die myeloide Zelllinie umfasst die meisten Zellen des angeborenen Immunsystems [99]. Dazu gehören Makrophagen, Granulozyten (basophile, eosinophile, neutrophile), Mastzellen und Dendritische Zellen [99]. Andere Zellen, die dieser Reihe entspringen und hier vernachlässigt werden, sind Megakaryozyten und Erythrozyten [99]. Aus der lymphatischen Zellreihe entwickeln sich B- bzw. T-Lymphozyten, die dem adaptiven, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die dem angeborenen Immunsystem angehören [99]. Diese Zellen mit Ausnahme der T-Lymphozyten entwickeln sich und reifen im Knochenmark heran [99]. Später wandern sie in peripheres Gewebe oder zirkulieren im Blut bzw. im lymphatischen System [99]. Einige aktivierte B- bzw. T-Zellen entwickeln sich zu Gedächtniszellen und sind für die langanhaltende Immunität verantwortlich [99]. Im Folgenden sollen die Charakteristika und speziellen Funktionen der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) näher betrachtet werden, die in dieser Arbeit untersucht wurden. PBMC sind mononukleäre Zellen, zu denen die Subtypen der Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen) sowie alle monozytären Zellen zählen.

1.4.1 T-Zellen

T-Zellen gehören zum adaptiven Immunsystem und entstammen der lymphoiden Zellreihe. Nach Verlassen des Knochenmarkes wandern die T-Zellen in den Thymus und differenzieren dort in zwei Hauptpopulationen, die durch ihre Zelloberflächenproteine CD4 bzw. CD8 unterschieden werden. Anschließend zirkulieren sie im Blut, bzw. der Lymphflüssigkeit, oder halten sich in lymphatischen Organen bzw. Geweben auf [99]. T-Zellen besitzen verschiedene Typen von Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptor (TCR)), welche spezifisch für Antigene sind [99]. Nach Antigen-Kontakt kommt es zur Proliferation und Differenzierung des T-Lymphozyten und Entstehung klonaler T-Effektorlymphozyten [99]. Je nach Funktion (Abtöten, Aktivierung, Regulation) und immunphänotypischer Oberflächenmoleküle lassen sich diese Immunzellen unterscheiden [99].

Sogenannte zytotoxische CD8+ T-Zellen töten infizierte Zellen durch Auslösung von Apoptose ab [99]. Sie erkennen Peptide, die von Krankheitserregern stammen und von *MHC*-Klasse-I-Molekülen durch dendritische Zellen präsentiert werden [87, 99]. In der Tumorgenese nehmen CD8+ T-Zellen frühe Warnsignale wahr, die zur Tumorzellelimination führen [87].

CD4⁺ T-Helferzellen hingegen unterstützen vor allem die Aktivierung von B-Zellen und können stimulierend auf Makrophagen wirken [99]. Sie erkennen Peptide, die von *MHC*-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Je nach Zytokinprofil verfügen sie über ein flexibles Repertoire an Effektoraktivitäten und lassen sich in folgende Untergruppen unterscheiden: T_H1, T_H2, T_H17, und regulatorische T-Zellen (Treg) [99]. Eine besondere Bedeutung in der Karzinogenese kommt dabei letzteren zu. Treg zeichnen sich durch einen immunsuppressiven Phänotyp aus. Sie unterdrücken die Aktivität anderer Lymphozyten. Sie hemmen die T-Effektorzell-Aktivierung bzw. deren Funktion und unterstützen die Kontrolle bzw. Begrenzung der Immunantwort [99]. Dazu sezernieren sie immunsuppressive Zytokine (TGF- β , *IL-10*, *IL-35*) und antagonisieren *IL-2*. Treg spielen eine wichtige Rolle bei der Wahrung der peripheren Immuntoleranz durch Inhibition der Immunantwort. Diese immunsuppressive Fähigkeit der Treg trägt allerdings zur Etablierung der *Immunevasion* in der Karzinogenese bei [100, 101]. Eine Anreicherung von Treg in Tumoren kann durch Konversion von konventionellen T-Zellen mittels TGF- β -1 [102], welches in CP und PDAC überexprimiert wird [103, 104] oder aber durch spezifische Rekrutierung in dem Tumor erfolgen [105, 106].

Zur Analyse der Gesamtheit an T-Zellen im Blut von PDAC-Patienten und gesunden Spendern wurde in dieser Arbeit das Oberflächenprotein CD3 detektiert. Dieses wird auf Thymozyten und T-Zellen exprimiert [99]. Die weitere Charakterisierung der T-Zellen erfolgte mittels der Oberflächenmoleküle CD8 und CD4. Treg wurden in dieser Arbeit über die gleichzeitige Detektion von CD4 und CD25 charakterisiert [101].

Darüber hinaus wurde der Aktivierungszustand der T-Zellen mittels der Detektion von CD69 ermittelt. Dieser Marker ist ein frühes Aktivierungsmolekül von Leukozyten, das nicht auf ruhenden Zellen, sondern nur auf aktivierten T- und B-Zellen sowie Makrophagen und NK-Zellen gefunden wird. Neue Befunde weisen jedoch auf eine immunregulatorische Funktion und eine neue Subpopulation von CD4⁺CD25⁺CD69⁺ Treg hin. Diese Treg sind zwar *FoxP3* (*forkhead-Box-Protein P3*: Transkriptionsfaktor, der von Treg exprimiert wird) negativ, weisen jedoch eine erhöhte Sekretion von *IL-10* und TGF- β -1 auf, hemmen die Proliferation von T-Effektorzellen und sind in der tumorinduzierten Immunsuppression involviert [107, 108].

Mit dem *Memory Marker* CD45RO wurden die Gedächtniszellen unter den T- und B-Zellen sowie Monozyten und Makrophagen bestimmt [99]. CD45RO⁺CD8⁺Memory T-Zellen zählen zu den Anti-Tumor-Effektoren [109]. So konnten eine hohe Anzahl von CD8⁺ oder CD45RO⁺ Memory T-Zellen bisher in Tumorgewebe von Ovarial- und Kolorektalem Karzinom als positive prognostische Indikatoren gezeigt werden [110, 111].

1.4.2 Monozyten / Makrophagen

Makrophagen gehören zum angeborenen Immunsystem und entstammen der myeloiden Zellreihe. Sie entwickeln sich aus spezialisierten monozytären Immunzellen, den Monozyten. Diese Vorläuferzellen differenzieren im Knochenmark, treten in die Blutbahn ein und zirkulieren bis sie mittels Chemotaxis (z.B. durch *monocyt chemotactic protein 1 (MCP-1)*) [92] in ein inflammatorisches Gewebeareal gelockt werden, um dort zu Makrophagen heranzureifen [105, 112]. Stimulus-abhängig entwickeln sich Makrophagen in verschiedene Subtypen, wobei wesentlich zwischen den proinflammatorischen M1- und den antiinflammatorischen M2-polarisierten Makrophagen unterschieden wird [90, 113, 114]. Makrophagen können in Organgeweben unter physiologischen Bedingungen residieren [115] und stellen in inflammatorischen Gewebefiltraten den größten Anteil der Zellen dar [92]. Die Hauptaufgaben der Makrophagen bei der Abwehr von Infektionen sind Phagozytose, Antigenpräsentation und Regulation der Immunantwort [116]. Dafür interagieren sie mit dem erworbenen Immunsystem über B- bzw. T-Zellen. Sie sind dabei wichtig für die T-Zell-Aktivierung und die Initiierung einer T-Zell gesteuerten Immunantwort [90]. Außerdem tragen sie zu Wundheilung und Aufrechterhaltung der Gewebemöostase bei [92]. In chronischer Inflammation hingegen unterstützt die Akkumulation von Makrophagen die Tumorentstehung und -progression [117]. In Tumoren stellen hypoxische Tumorareale, die durch schnelles Tumorstadium mit der Folge von Nährstoffmangel und Zellnekrose entstehen, den bevorzugten Ort der Makrophagenansiedlung dar [91]. Solche Makrophagen werden als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet. Angelockt werden TAM durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren (u.a. IL-1, HMGB1) [118]. Dort angekommen, entgegnet sie dem hypoxischen Zustand durch Ausschüttung proangiogenetischer Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen [91]. TAM unterstützen so die Angio- bzw. Lymphangiogenese und Neovaskularisierung [91]. Sie spielen außerdem eine zentrale Rolle bei der Induktion von EMT, Invasion, Metastasierung, Tumorstadium und Suppression des adaptiven Immunsystems. So korreliert eine hohe TAM-Dichte mit einer schlechten Prognose [73, 119-122]. Zur Analyse und M1-/M2-Charakterisierung von Monozyten/Makrophagen wurden in dieser Arbeit folgende Marker verwendet: als allgemeine Makrophagen-Marker dienten CD68 sowie die monozytären Marker CD11b (alpha-Untereinheit des Integrins CR3) und CD14 (Lipopolysaccharid-Rezeptor) [99]. Das *Human leucocyte antigen-DR* (HLA-DR) diente als Marker für M1-polarisierte Makrophagen, das Oberflächenmolekül CD16 (Fcγ-Rezeptor) als M2-Makrophagen-Marker [123].

1.4.3 B- und NK-Zellen

B-Zellen entstammen der myeloiden Zellreihe, reifen im Knochenmark heran und werden durch Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor (BCR) mit Unterstützung von CD4+ T-Zellen aktiviert. Anschließend erfolgt die Differenzierung zu Plasmazellen und Antikörperfreisetzung [99]. So kommt es im Rahmen der Auslösung der adaptiven Immunantwort zur Antikörperbildung [99]. Um den Anteil an B-Zellen in PBMC von gesunden Spendern bzw. PDAC-Patienten zu bestimmen, wurde der allgemeine B-Zell-Marker CD19 detektiert.

Die Funktion der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der angeborenen Immunität besteht in der Erkennung und Abtötung von anormalen Zellen, darunter auch Tumorzellen [99]. Ihre Aktivierung erfolgt über unveränderliche Rezeptoren und als Reaktion auf die Ausschüttung von Interferonen oder Zytokinen von Makrophagen. Daraufhin binden NK-Zellen an die Zielzelle und setzen zytotoxische Granula frei, die Effektorproteinen das Durchdringen der Zellmembran ermöglichen. Diese lösen daraufhin programmierten Zelltod aus [99]. NK-Zellen wurden in dieser Arbeit über die Koexpression der beiden Marker CD16 und CD56 detektiert.

1.5 Inflammation, Immunzellen und Tumorstroma des PDAC

Auch im PDAC spielen Immunzellen und ihre Beteiligung an der Inflammation des Gewebes eine bedeutende Rolle. Dies zeigt sich unter anderem in der Tatsache, dass die CP ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC ist [6]. Rhim et al. gelang es in ihrem PDAC-Mausmodell neben dem überraschend frühen Eintritt der pankreatischen Gangepithelzellen in die Blutzirkulation, einen Zusammenhang zwischen Tumorzell dissemination und Inflammation aufzuweisen [51]. Durch Induktion einer Pankreatitis ließ sich eine Erhöhung der zirkulierenden Pankreasgangepithelzellen im Blut feststellen. Eine antiinflammatorische Behandlung der Pankreatitis mit Dexamethason hingegen blockierte die Zelldissemination [51]. Bei der histologischen Untersuchung der inflammatorischen Areale wurden zahlreiche Pankreasgangepithelzellen mit einem mesenchymalen und invasiven Phänotyp bereits in den PanIN-Stufen detektiert [51]. Daraus lässt sich schließen, dass inflammatorische Prozesse die Tumorprogression u.a. durch Förderung der EMT und des Zugangs der Tumorzellen zur Blutzirkulation begünstigen [51].

Das stromale Kompartiment des Pankreas unterliegt während der Progression zu einem invasiven PDAC fundamentalen Veränderungen. So weist das normale Pankreasgewebe eine geringe Infiltration von Immunzellen auf [109]. Dies ändert sich allerdings mit der Ausbildung eines

immunsuppressiven Milieus, wobei es zur Anreicherung diverser Immunzellen kommt [73]. In den meisten Studien wird das Gewebe bzw. Immuninfiltrat der CP und des PDAC vergleichend untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass gut differenzierte Tumoren einige Charakteristika mit CP-Geweben gemeinsam haben [73]. Mäßig und schlecht differenzierte Tumoren hingegen weichen signifikant von CP-Geweben ab [73]. Der Hauptteil des Immuninfiltrats im Tumorstroma des PDAC wird von TAM und T-Zellen gebildet. TAM stellen dabei den größten Anteil und sind in CP, PanIN sowie im PDAC präsent [115, 124].

1.5.1 T-Zellen im PDAC

Während der PDAC-Progression kommt es zu einer Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen, darunter vor allem Treg. Die Zahl zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen hingegen nimmt ab [124]. Hiraoka et. al konnten diese Veränderungen während der Tumورprogression histologisch von der PanIN bis zum invasiven PDAC nachweisen [125]. Weitere Untersuchungen der genannten Arbeitsgruppe zeigen, dass es zu einer Anreicherung von CD4⁺FoxP3⁺ Treg im PDAC-Gewebe gegenüber des nicht-neoplastischen, aber auch inflammatorischen pankreatischen Stromas kommt [125]. Die Anreicherung von Treg korreliert dabei mit einem geringen Differenzierungsstadium der Tumoren [125]. Ergebnisse von Helm et. al unterstützen diese Befunde. Zwar wird hier im PDAC-Gewebe eine signifikant reduzierte Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu der CP nachgewiesen, allerdings zeigt sich der CD25⁺CD4⁺ bzw. FoxP3⁺CD4⁺ Treg-Anteil deutlich erhöht im PDAC gegenüber der CP [73]. Auch im Blut von PDAC-Patienten kommt es zu einer Anreicherung von CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺ oder CD4⁺FoxP3⁺ Treg [100, 126, 127]. Eine vermehrte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führt über die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (z.B. *TNF α* , *IL-1 β*) zu einer verstärkten Inflammation im PDAC und beschleunigten Tumورprogression [128, 129]. Außerdem entgeht das PDAC durch Anlockung und Anreicherung von Treg der Immunüberwachung [125]. Die Anreicherung von Treg in Blut und Tumorgewebe von PDAC-Patienten korreliert entsprechend mit einer schlechten Prognose [91, 125, 130]. Eine hohe CD8⁺ T-Zelldichte hingegen geht mit verlängertem Überleben einher [131].

1.5.2 Makrophagen im PDAC

Die Makrophageninfiltration des PDAC erfolgt zeitig und dominiert bereits das inflammatorische Geschehen in den frühen präinvasiven Läsionen [124]. Beim Vergleich von normalem Pankreasgewebe zu PDAC-Gewebe kann eine Erhöhung der CD68⁺ Makrophagen im PDAC-Gewebe festgestellt werden [132]. Eine Korrelation mit dem kumulativen Überleben lässt sich allerdings nicht herstellen [132]. Weiterführende Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Ino et al. zeigen, dass die Anzahl von M1-(HLA-DR⁺)-Makrophagen mit der Entwicklung einer CP zum PDAC abnimmt. Eine

starke Infiltration von M2-Makrophagen (CD163+ und CD204+) hingegen korreliert mit der venösen Gefäßinvasion und geht signifikant mit kürzerem krankheitsfreiem Intervall und Überleben einher [133]. Ähnliche Ergebnisse liefern diverse Studien der Arbeitsgruppe um Kurahara et al., die nachweislich eine hohe Inzidenz von TAM des M2-polarisierten Phänotyps (CD163+ und CD204+) im Gegensatz zu CD68+Makrophagen mit einer verstärkten bzw. beschleunigten Lymphangiogenese sowie Lymphknotenmetastasierung und einer schlechten Prognose korrelieren [115, 134].

Die Arbeitsgruppe um Helm et al. fand heraus, dass Makrophagen unabhängig von Phänotyp (M1- oder M2-polarisiert) in einer größeren Anzahl in der CP vertreten sind als im PDAC [73]. Dabei zeigen sich M1-(HLA-DR+)-Makrophagen auch in Arealen mit hoher Anzahl von M2-(CD163+) Makrophagen. Daraus erfolgt die Annahme, dass Makrophagen des PDAC-Infiltrats M1- und M2-Charakteristika gleichermaßen aufweisen und es sich vornehmlich um einen gemischten Phänotyp handelt [73]. Somit unterstützen nicht nur M2-polarisierte Makrophagen mit einem antiinflammatorischen Phänotyp EMT in prämaligen bzw. malignen pankreatischen duktalem Epithelzellen, sondern auch M1-polarisierte proinflammatorische Makrophagen [123]. Diese Erkenntnis macht die Notwendigkeit der Charakterisierung von TAM nicht nur mittels M2-, sondern auch durch M1-Makrophagenmarker ersichtlich.

1.6 Ziele der Arbeit

Die Ziele dieser Doktorarbeit waren:

- 1.) Untersuchung des Einfluss von PBMC auf die EMT von Pankreasgangepithelzellen.
- 2.) Untersuchung des Einfluss von PBMC auf das Apoptoseansprechen von Pankreasgangepithelzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabin.

unter Differenzierung der PBMC von gesunden Spendern und PDAC-Patienten sowie

- 3.) Charakterisierung des Phänotyps und Bestimmung der Prävalenz der PBMC.

Insgesamt sollte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis des Phänotyps von PDAC-assoziierten PBMC sowie deren Beitrag zur malignen Transformation des PDAC beitragen.

2 Material

2.1 Geräte

Autoklav	Systec, Wetzlar, D
Blotkammer Fastblot	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank	Kendro, Langenselbold, D
Brutschrank CO ₂ Inkubator BBD 6620	Heraeus Instruments, Hanau, D
ChemiDoc XRS	Bio-Rad Laboratories, München, D
Einkanal-Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson International, Bad Camberg, D
Elektrophoresekammer X Cell	Invitrogen, Karlsruhe, D
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS Canto flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, D
Finnpipette 0.2-2 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 2-20 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 100-1000 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
FusionSL	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Gelkammer Multigel	Biometra, Göttingen, D
GyroTwister Schwänker	Labnet, Woodbridge, USA
HERA Cell 240 Brutschrank	Thermo Scientific, Schwerte, D
iCycler MyiQ	Biorad, München, D
Kipptisch WT17	Biometra, Göttingen, D
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
LightCycler 480	Roche Diagnostic, Mannheim, D
Mikroskop Axiowert 25	Zeiss, Jena, D
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena, D
Minishaker MS2	IKA Werke, Staufen, D
Nano Drop Spectrophotometer 10-1000	peqLab Biotechnology, Erlangen, D

Neubauer Zählkammer	Omnilab, Hamburg, D
Photometer Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Pipet-Boy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Rollenmischer roller mixer SRT6D	VWR, Darmstadt, D
Stuart SRT9 Rollenmischer	Bibby Scientific Ltd., Stone, UK
Schüttler, Tumbling Table	Biometra, Göttingen, D
Semi Dry Blot Kammer Whatman Fasblot	Biometra, Göttingen, D
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau, D
Themal Cycler 2720	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Thermomixer/Thermoblock 5436	Eppendorf AG, Hamburg, D
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Hanau, D
Wasserbad Julabo U3	Julabo, Seelbach, D
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zentrifuge Labofuge Funciton Line 400	Heraeus Instruments, Hanau, D

2.2 Computerprogramme

CellQuest-Software	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS Diva Software	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fusion Capt Software 16.06	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
LightCycler 480 SW1.5.1	Roche Diagnostic, Mannheim, D
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Revelation QuickLink Software	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, D
Germany Sigma Plot 12.5	Systat Software GmbH, Erkrath, D
Win MDI 2.8 Software	Joe Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, USA

2.3 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon Cell Strainer, 40 / 100 µm	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
BD Trucount™ Tubes	BD Biosciences, Heidelberg, D
Deckgläser 18 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
FACS-Röhrchen	Sterilin, London, UK
Handschuhe Peha-Soft	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Handschuhe Microtouch Nitra-tex	Ansell Healthcare Europe NV, Brüssel, B
Parafilm „M“	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, D
Pasteurpipette Glas 230 mm	Assisten, Sondheim, D
Pasteurpipette Plastik	Assisten, Sondheim, D
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
24-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
96-Well-PCR Platten	Corning, Amsterdam, NL
96-Well-Platten, weiß	Roche, Basel, CH
12-/24-/96-Well-Flachbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Röhrchen 15 ml/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serumpipette 153 mm, lang	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Skalpell	Feather, Osaka, J
Transfermembran Immobilon-PVDF	Millipore, USA
Whatmann 3 MM, Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturpetrischalen 100x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen, D
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellsieb (Cell strainer (100 µm))	BD Bioscience, San Jose, USA

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht angegebenen Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, München bezogen.

6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München, D
BD Lysing buffer	BD Biosciences, Heidelberg, D
Beta-Mercaptoethanol	Biomol, Hamburg, D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Bovine serum albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, D
BSA, Fraktion V	Biomol, Hamburg, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Ethanol 70 %, vergällt	Walter, Kiel, D
Fixation/Permeabilization Concentrate	eBioscience, Frankfurt a.M., D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D
Gemcitabin	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, D über Apotheke des UKSH Campus Kiel, D
Glycin	Merck, Darmstadt, D
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München, D
HEPES-Puffer 1M	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Keratinocyten serumfreies Medium	Life Technologies, Darmstadt, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
LightCycler 480 Sybr Green	Roche Diagnostic, Mannheim, D
Methanol 100 %	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
M-MLV-Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg, D
MultiMark Multi-Colored Standard 1x	Invitrogen, Karlsruhe, D

Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, NL
Oligo-dT-Primer	Promega, Heidelberg, D
Pancoll	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience, Frankfurt a.M., D
Phosphate buffer saline (PBS)	PAA, Pasching, A
Polyacrylamid (PAA)	Biomol, Hamburg, D
Ribonuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, D
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Life Technologies, Darmstadt, D
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
Sodium dodecyl sulfate (SDS), ultra pure	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D
Sterilium classic pure	Paul Hartmann AG, Heidenheim, D
Super Signal West Dura Extended Duration Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, A
Tris Base	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München, D
X-Vivo Medium	Lonza, Köln, D

2.5 Kits

BD Multitest 6-color TBNK (M6T) Reagent	BD Biosciences, San Jose, USA
M30 Apoptosense ELISA	Peviva, Bromma, SWE
Proteinassay Dc	Biorad, München, D
peqGOLD Total RNA Kit	PeqLab, Erlangen, D
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoScientific, Darmstadt, D

2.6 Antikörper

2.6.1 Antikörper für den Westernblot

Westernblot Primärantikörper					
Primärantikörper Antigen (Klon)	Firma	Spezies/ Isotyp	Verdünnung (mit)	Proteingröße (kDA)	Zweitantikörper
E-Cadherin (32A8)	Cell Signaling, Frankfurt a.M., D	Maus/IgG ₁	1:1000 (BSA-PBS)	135	Anti-Kaninchen
HSP 90 (H-114)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Kaninchen/polyklonal	1:2000 (Blotto)	90	Anti-Kaninchen
L1CAM (L1 9.3)	Generiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Gerd Modlenhauer, DKFZ Heidelberg, D	Maus/IgG ₁	1:1000 (Blotto)	220	Anti-Maus
Vimentin (V9)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Maus/IgG ₁	1:200 (Blotto)	57	Anti-Maus

Tabelle 2: Primärantikörper für den Westernblot

Westernblot Sekundärantikörper			
Sekundärantikörper Spezifität	Firma	Spezies	Verdünnung AK
Kaninchen-IgG	Cell Signaling, Frankfurt a.M., D	Ziege	1:2000
Maus-IgG	Cell Signaling, Frankfurt a.M., D	Pferd	1:2000

Tabelle 3: Sekundärantikörper für den Westernblot

2.6.2 Antikörper der immunbiologischen Methoden

Antikörper der Durchflusszytometrie				
Antikörper (Klon)	Konjugat	Firma	Spezies/Isotyp	Verdünnung
Anti-CD4 (OKT4)	FITC	Biologend, Fell, D	Maus/IgG _{2b}	1:20
Anti-CD11b (M1/70.15.11.5)	PE	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, D	Ratte/IgG _{2b}	1:10
Anti-CD14 (Tük4)	PE	Biologend, Fell, D	Maus/IgG _{2a}	1:50
Anti-CD16 (3G8)	FITC	Biologend, Fell, D	Maus/IgG ₁	1:50
Anti-CD25 (4E3)	APC	Biologend, Fell, D	Maus/IgG _{2b}	1:12,5
Anti-CD45RO (UCHL1)	PE	Biologend, Fell, D	IgG _{2a}	1:10
Anti-CD68 (Y1/82A)	APC	Biologend, Fell, D	Maus/IgG ₁	1:10
Anti-CD69 (FN50)	APC	Biologend, Fell, D	Maus/IgG ₁	1:20
Anti-HLA-DR(L243)	FITC	Biologend, Fell, D	Maus/IgG _{2a}	1:50

Tabelle 4: Antikörper der Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde der *Multitest 6-color TBNK reagent* der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, D verwendet. Dieser enthält folgende Antikörper:

Antikörper zur Bestimmung der Gesamtzellzahl		
Antikörper (Klon)	Konjugat	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Anti CD3 (SK7)	FITC	2,3
Anti CD 4 (SK3)	PE-Cy TM 7	1,5
Anti CD8 (SK1)	APC-Cy7	6,3
Anti CD16 (B73.1)	PE	1,65
Anti CD19 (SJ25C1)	APC	2,3
Anti CD45 (2D)	PerCP-Cy TM 5.5	6,0
Anti CD56 (NCAM16)	PE	1,1

Tabelle 5: Antikörper zur Bestimmung der Gesamtzellzahl

2.6.3 Primer für die Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Nachfolgende Primer wurden von der Firma Biometra, Göttingen, D bezogen:

Primer für die Echtzeit Polymerasekettenreaktion		
Primer	Vorwärtsprimer 3'	Rückwärtsprimer 5'
E-Cadherin	TCTTCCCCGCCCTGCCAATC	GCCTCTCTCGAGTCCCCTAG
L1CAM	TCACGGGCAACAACAGCAACT	CGGCTTCTGTCAATCATGCT
TBP	GCTGGCCCATAGTGATCTTT	CTTCACACGCCAAGAAACAG
Vimentin	TGGCACGTCTTGACCTTGAA	GGTCATCGTGATGCTGAGAA

Tabelle 6: Primer für die Echtzeit Polymerasekettenreaktion

2.7. Humane pankreatische duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7)

Spezies	Name	Herkunft	Referenz
human	HDPE6c7	benignes Pankreasgewebe	Ming-Sound Tsao, Institut für Pathologie, Montreal General Hospital, Kanada

Tabelle 7: Humane pankreatische duktale Epithelzelllinie

2.8 Rezepturen

Rezepturen für die <i>rtPCR</i>	
Lösung	Zusammensetzung
Mastermix	12,5 µl <i>Sybr Green</i> 0,15 µl <i>Primer Forward</i> 0,15 µl <i>Primer Reverse</i> 2,2 µl H ₂ O
Rezeptur zur Bestimmung der Proteinkonzentration	
Lösung	Zusammensetzung
4x Farbpuffer	0,005 % (w/v) Bromphenolblau 2,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol in 2x Lämmli-Puffer
Rezepturen für SDS-Gelelektrophorese	
Lösung	Zusammensetzung
Trenngel (PAA Gel 10 %)	6,0 ml H ₂ O dest. 3,0 ml Trenngelpuffer; pH 6,8 3,0 ml PAA 40 % (w/v) 44 µl APS-Lösung 10 % (w/v) 8,8 µl Temed
Sammelgel	2363 µl H ₂ O dest. 938 µl Sammelgelpuffer; pH 6,8 375 µl PAA 40 % 19,5 µl APS 10 % 3,7 µl Temed
Laufgelpuffer (10x)	25 mM Tris-Base 0,1 % (w/v) SDS 19 mM Glycin
Rezepturen für das Westernblottin	
Lösung	Zusammensetzung
Blot Puffer A	300 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol; pH 11
Blot Puffer B	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol; pH 10,6
Blot Puffer C	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol 0,04 mM 6-Aminocapronsäure; pH 10,6

Rezepturen für den Proteinnachweis	
Lösungen	Zusammensetzung
Blotto	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween
BSA-PBS	5 % (w/v) BSA in PBS-Tween
TBS (10x)	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl; pH 7,6
TBS-Tween (TBS-T)	100 ml TBS (10 x) 500 µl Tween-20 ad 1000 ml Aqua dest.
Weitere Rezepturen	
Lösungen	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer (2x)	128 mM Tris-Base 4,6 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol; pH 7,6
MACS-Puffer	0,5 g BSA 100 ml PBS
HPDE-Medium	RPMI- und Keratinozytenmedium (1:1) 0,5 % (v/v) L-Glutamin 5 % (v/v) <i>Fetal calf serum (FCS)</i> 5 ng / ml <i>Epidermal Growth Factor (EGF)</i> 50 µg / ml Rinderhypophysenextrakt

Tabelle 8: Rezepturen

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Humane pankreatische duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7)

Als Modell für benignes Pankreasgangepithel wurde die Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7) verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Ming-Sound Tsao, Institut für Pathologie, Montreal General Hospital, Montreal, Kanada). HPDE6c7 ist eine benigne, aus humanem Pankreasgewebe isolierte Zelllinie [135]. Die Immortalisierung der Zellen wurde durch retrovirale Transduktion der Onkogene E6 und E7 des humanen Papillomavirus HPV 16 erzielt [136]. Die Arbeitsgruppe Tsao et al. konnte zeigen, dass die HPDE6c7-Zellen einen nahezu normalen Geno- und Phänotyp entsprechend dem duktaler Pankreasepithelzellen aufweisen, ohne Anhalt für eine maligne Transformation. Es konnte keine der mit dem PDAC-assoziierten Mutationen, beispielsweise in den Genen *KRAS*, *p53* oder *p16* nachgewiesen werden [135]. Ferner führte die Inokulation der Zelllinie in immundefizienten Mäusen zu keinerlei Tumorstadium und erwies sich somit als nicht-tumorigen [136]. Die epitheliale Pankreasgangzelllinie HPDE6c7 eröffnet somit im Gegensatz zu den zumeist verwendeten malignen Pankreasgangepithelzelllinien die Möglichkeit, Ereignisse im frühen Stadium der pankreatischen Tumorgenese *in vitro* zu untersuchen. Da in dieser Arbeit der Einfluss von PBMC auf den Phänotyp und das Verhalten von benignen Pankreasgangepithelzellen untersucht werden sollte, wurde diesen Gründen als Zellmodell speziell die HPDE6c7-Zelllinie ausgewählt.

3.1.2 Kultivierung der epithelialen Pankreasgangzelllinie HPDE6c7

Das Umsetzen bzw. Aussäen der Zellen erfolgte unter der Sterilwerkbank. Dabei wurden ausschließlich autoklavierte Materialien und steril filtrierte Lösungen verwendet. Die Kultivierung der HPDE6c7-Zellen erfolgte in HPDE-Medium (Rezeptur siehe **Tabelle 8**)

Die Teilung der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 80 % durchgeführt. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Anschließend wurden 5 ml einfaches Trypsin/EDTA in die Kulturflasche gegeben und für 5-10 Min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Kontrolle der Loslösung unter dem Lichtmikroskop wurde die Reaktion mit 5 ml HPDE-Medium beendet. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen zur Zentrifugation (1200 Umdrehungen pro Minute (UpM), 10 Min) überführt. Nachdem der Überstand abgesaugt und verworfen wurde, erfolgte das Resuspendieren des Pellets im vorgewärmten Medium. Daraufhin konnten die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt und im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % Feuchtigkeit kultiviert werden.

3.1.3 Isolierung der PBMC aus Vollblut

Die PBMC wurden mittels Ficollgradienten-Zentrifugation aus dem Vollblut von 5 gesunden Spendern (medianes Alter bei Blutentnahme: 65,8 Jahre), sowie 5 PDAC-Patienten (medianes Alter bei Blutentnahme: 68,6 Jahre) isoliert, wobei eine schriftliche Einwilligung aller Spender und die Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Ethikvotum A110/99D429/09) vorlag. Das Vollblut gesunder Spender sowie der PDAC-Patienten wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen und anschließend 1:2 mit Phosphate buffer saline (PBS) verdünnt. In 50 ml-Röhrchen wurden 15 ml Ficoll-Lymphozyten-Separations-Medium vorgelegt. Hierauf wurde das verdünnte Blut langsam mittels Serumpipette und Pipette Boy geschichtet. Die Separation selbst erfolgte in der Zentrifuge (1700 UpM, ungebremst, 20 Min, Raumtemperatur (RT)). Der Überstand wurde im Anschluss vorsichtig abgesaugt. Der darunter befindliche Leukozytenring wurde mit einer Plastikpipette durch Kreisbewegungen geerntet und in ein frisches 50 ml-Röhrchen gegeben. Dieses wurde mit kaltem PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1500 UpM, 10 Min). Danach wurde der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte noch zweimaliges Waschen mit PBS, Zentrifugieren (1200 UpM, 7 Min) und Überstand absaugen.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

In den Versuchsreihen wurden definierte Zellzahlen aller verwendeten Zelltypen eingesetzt. Dazu war eine Bestimmung der Zellzahl der initialen Zellsuspension notwendig. Es wurden 10 µl Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt, vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl in Zellen pro ml mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen in 4 Großquadraten}}{4} = X * 10^4 \text{ Zellen pro ml}$$

3.1.5 Co-Kultivierung von HPDE6c7-Zellen mit PBMC

Für die Versuchsreihen wurden die Epithelzellen in 24-Well-Kulturplatten ausgesät. Von den HPDE6c7-Zellen wurden dazu 1×10^4 Zellen pro Well in 500 µl HPDE-Medium eingesetzt und im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde in allen Wells das Medium abgesaugt und entweder 500 µl X-Vivo-Medium alleine oder zusammen mit $2,5 \times 10^4$ PBMC zugesetzt. In vier Wells wurden PBMC alleine kultiviert. Um das Apoptoseverhalten zu analysieren, wurde nach 48 Stunden Kultur einem Well der HPDE6c7 Mono- und einem der HPDE6c7 Co-Kultur je 10 µg/ml des Chemotherapeutikums Gemcitabin beigefügt. Die Kultivierung der Zellen wurde über 72 Stunden im

Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 85 % Raumfeuchte) durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 2** schematisch dargestellt.

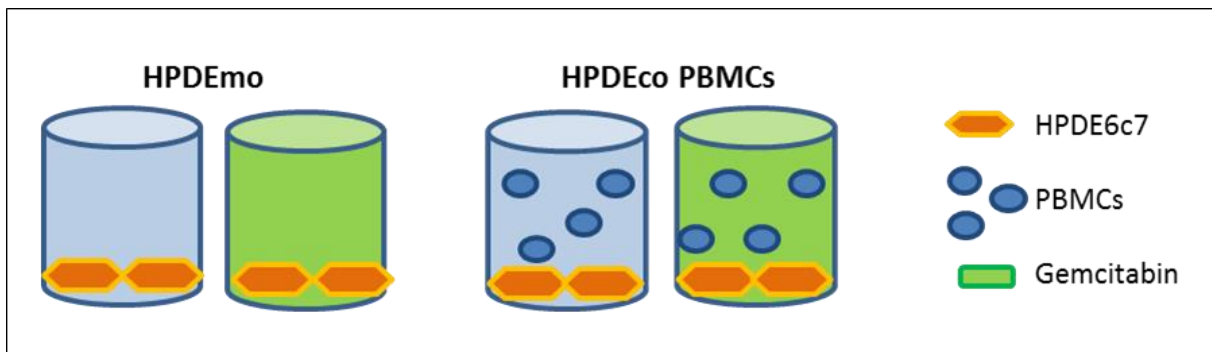


Abbildung 2: Versuchsaufbau von Mono-(HPDEmo) und Co-(HPDEco)Kulturen aus HPDE6c7-Zellen und PBMC
Vor jeder Aufarbeitung wurde die Morphologie der mono- und co-kulturierten Zellen mit der Mikroskopkamera festgehalten.

3.2 Immunbiologische Methoden

3.2.1 Oberflächenmarkierung mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie

Um die PMBCs zu charakterisieren, erfolgte nach der Ficollgradientenseparation eine Oberflächenmarkierung mittels Immunfluoreszenzfärbung und anschließender Durchflusszytometrie.

3.2.1.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) dient der Analyse und Separation von Einzelzellen in Suspension. So können Subpopulationen durch charakteristische Oberflächeneigenschaften identifiziert werden. Dazu wird die Zellsuspension in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geleitet. Die Zellen interagieren mit dem einfallenden Laserlicht und ändern dessen Richtung. Die detektierte Streuung wird beeinflusst von Zellgröße, Membranstruktur sowie intrazellulären Bestandteilen. Dabei entspricht das Vorwärtsstreulicht der Größe und das Seitwärtsstreulicht der Granularität der Zellen.

Zusätzlich nutzt man die Fluoreszenzeigenschaften von Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen. Das über einen Antikörper an die Zelle gebundene Fluorochrom wird im Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt und emittiert Licht mit bestimmter Wellenlänge. Dieses Licht wird detektiert und ist proportional zur Menge an Antikörpern, die an der Zelloberfläche oder intrazellulär gebunden sind.

3.2.1.2 Oberflächen- und intrazelluläre Markierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

Für die Oberflächenmarkierung der PBMC aus der Ficollgradienten Zentrifugation wurden 1×10^6 PBMC abgenommen. Diese wurden in kaltem MACS-Puffer resuspendiert und auf FACS-Röhrchen verteilt (pro Antikörpercocktail und Röhrchen 25 μ l MACS-Puffer). Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis. Zunächst wurden die extrazellulär bindenden Antikörper entsprechend **Tabelle 4** bei möglichst dunklen Verhältnissen verteilt und gevortext. Bei Mehrfachfärbungen wurden die Antikörper gleichzeitig inkubiert (4 °C, 15 Min). Anschließend wurde mit 200 μ l kaltem MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (1200 UpM, 7 Min).

Nach Abschluss der Oberflächenfärbung wurde die intrazelluläre Färbung von CD68 durchgeführt. Um die Zellen zu permeabilisieren wurde zunächst der Fixation/Permeabilization-Puffer in einem Verhältnis 1:4 mit dem entsprechenden Diluent angesetzt. Jeweils 50 μ l dieses Gemischs wurden auf die Proben gegeben, vermischt und bei RT in Dunkelheit für 10 Min inkubiert.

Im Anschluss wurde mit 200 μ l Permeabilisierungspuffer (1:10 Verdünnung mit Aqua dest.) gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1200 UpM für 10 Min. Nach Absaugen des Überstandes wurden 25 μ l Permeabilisierungspuffer zu jeder Probe hinzugegeben und der Anti-CD68 Antikörper entsprechend **Tabelle 4** verteilt. Vermischen, Inkubation (10 Min bei RT in Dunkelheit), Waschen und Zentrifugieren wurde wie oben beschrieben erneut durchgeführt.

Nach Entnehmen des Überstandes wurden die Proben mit einer 1 % igen Formalinlösung fixiert und im Kühlschrank bis zur Messung aufbewahrt. Die Messung der Zellen erfolgte an einem FACS Calibur unter Verwendung der CellQuest-Software.

3.2.1.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Daniela Wesch des Institutes für Immunologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl von T- und B-Lymphozyten sowie NK-, CD4+ und CD8+ T-Zellen wurde der *BD Multitest 6-color TBNK (M6T) Reagent* mit *BD Trucount™ Beads* (www.bd.com/resource.aspx?IDX=17743) von BD Biosciences verwendet. Als Grundlage diente das *BD trucount™ tube technical data sheet* (Version 8/2010). Es wurden zunächst 20 μ l der *BD Multitest 6-color TBNK* Reagenz in den *BD Trucount Tubes* vorgelegt (siehe **Tabelle 5**). Im Anschluss wurde 50 μ l antikoaguliertes Blut von PDAC-Patienten hinzugegeben. Nach Vortexen erfolgte für 15 Min die Inkubation bei RT im Dunkeln. Die Lyse der Erythrozyten wurde mit 200 μ l *BD lysing buffer* erzielt. Nach erneutem Vortexen und Inkubieren konnte die Detektion mittels *FACS Canto flow cytometer* sowie die Analyse mit der *FACS Diva Software* (beide BD Biosciences) durchgeführt werden.

3.3 RNA-Techniken

3.3.1 RNA-Isolierung und Präparation

Die Präparation der Gesamt-RNA der HPDE6c7-Zellen nach Mono- bzw. Co-Kultur wurde mit dem RNA-Isolierungskit *peq GOLD Total RNA Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zunächst wurde das Medium aus den Wells abgenommen. Danach wurde jedem Well je 200 µl RNA *Lysis Buffer T* zugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen mechanisch abgelöst und das Lysat in Eppendorf-Röhrchen überführt. Allen Zelllysaten wurde jeweils 10 µl *Carrier RNA Working Solution* zugesetzt, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen. Dazu wurde die *Carrier RNA Stock Solution* mit einer Konzentration von 400 ng/µl im Verhältnis von 1:100 mit *Lysis Buffer T* verdünnt. An dieser Stelle konnten die Lysate auch zur späteren RNA-Aufarbeitung eingefroren (-80 °C) werden.

Anschließend wurde das Zelllysate auf eine DNA-bindende Säule gegeben. Diese wurden in einem 2 ml-Röhrchen für eine Minute bei 12000 UpM zentrifugiert. Die Säule wurde mit der gebundenen DNA entsorgt, während sich die RNA im Durchfluss befand. Dem RNA-Durchflussgemisch wurde nun das gleiche Volumen an 70 % igen Ethanol, in diesem Fall 200 µl, zugesetzt. Nach Vortexen wurde die Flüssigkeit auf eine RNA-bindende Säule pipettiert, welche in ein neues 2 ml-Röhrchen gestellt wurde. Danach erfolgte die Zentrifugation (10.000 UpM, 1 Min). Im Anschluss daran wurde mit 500 µl *RNA-Wash Buffer I* gewaschen. Daraufhin musste erneut zentrifugiert (10.000 UpM, 15 s) und der Durchfluss verworfen werden. Dieses Prozedere wurde zweifach mit je 500 µl *Wash Buffer II* durchgeführt. Danach erfolgten zwei Runden Zentrifugation, je eine Minute bei 10.000 UpM. Zwischendurch wurden die Röhrchen um 180° gedreht, um die Reste der Flüssigkeit aus der Säule zu waschen. Nun wurden 35 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und für 3 Min ruhen gelassen. Die Säule wurde dafür in ein neues Eppendorf-Röhrchen gesetzt. Im Anschluss erfolgte erneut die Zentrifugation (7.000 UpM, 1 Min). Das Eluat wurde nochmals auf die Säule pipettiert und zweimal mit einem Positionswechsel von 180° zentrifugiert (7.000 UpM, 1 Min). Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nano Drop Spectrophotometer 10-1000 gemessen. Dafür wurden je 2 µl auf den Messbereich aufgetragen. Die aufgearbeitete RNA wurde bei -80° verwahrt.

3.3.2 Herstellung von cDNA

Die Herstellung von komplementärer DNA (*complementary DNA=cDNA*) erfolgte mittels *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*. Dazu wurde die RNA auf eine einheitliche Konzentration von 0,05 µg eingestellt. Ein Mikroliter *Oligo-dT-Primer* wurden der RNA beigemischt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl gebracht. Das Gemisch wurde gevortext, anschließend

im Thermomixer (65°C, 5 Min) denaturiert, auf Eis abgekühlt und herunterzentrifugiert. Danach wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge dazu gegeben:

4 µl 5x *Reaktion Buffer*

0,5 µl *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µl)

2 µl 10 mM *dNTP Mix*

1 µl *RevertAid M-MLV Reverse Transkriptase*

Das Gesamtvolumen (7,5 µl plus 12,5 µl RNA-Gemisch) betrug 20 µl. Das Gemisch wurde im Brutschank inkubiert (42°C, 6 Min). Abschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Inkubation im Thermomixer (70°C, 5 Min) beendet. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20°C.

3.3.3 Echtzeit Polymerasekettenreaktion

3.3.3.1 Prinzip der Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Bei der Echtzeit Polymerasekettenreaktion (*realtime polymerase chain reaction, rtPCR*) werden ausgesuchte DNA-Abschnitte amplifiziert und in Echtzeit gemessen. Dazu wird ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet (hier: *LightCycler 480 Sybr Green*, Roche Diagnostic). Frei und ungebunden in Lösung ist die Fluoreszenz gering. Reichert sich der Farbstoff in der Doppelstrang-DNA an, nimmt die Fluoreszenz bis zum 1000-fachen an Stärke zu. Daher ist die Zunahme an Fluoreszenz während einer Reaktion proportional zu der aktuellen Genamplifikation. Der *Threshold cycle* (*Crossing Point CP/ Ct*) entspricht dem Zyklus, in dem genügend Amplifikationen vorliegen, um ein Lichtsignal über die Hintergrundsignale hinaus hervorzurufen. Der Ct-Wert wird in der exponentiellen Phase gemessen, in der die Reagenzien noch ausreichend vorhanden sind, und ist demzufolge ein indirektes Maß für die Ausgangsmenge an DNA. Um die relative Genexpression zu erhalten, wurde die Pfaffl-Methode gewählt, in der die Genamplifikation eines Zielgens gegen die eines Referenzgens verrechnet wird. Als Referenzgen wurde das *Tatabox Binding Protein* (TBP) verwendet, welches eine konstante Expression in den Zellen zeigt. Es wurde dazu folgende Formel verwendet:

$$\text{Ratio} = \frac{2^{\text{Ct Zielgen (Kontrolle-Test)}}}{2^{\text{Ct Referenzgen (Kontrolle-Test)}}}$$

Kontrolle: Probe aus der Mono-Kultur

Test: Probe aus der Co-Kultur

Die Ratio gibt den Faktor an, um wie viel die Expression des Zielgens in der Co-Kultur gegenüber der Mono-Kultur verstärkt (Ratio > 1) bzw. vermindert (Ratio < 1) ist.

3.3.3.2 Durchführung der Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Zunächst wurden 20 µl des cDNA Mix 1:5 mit 85 µl RNase freiem Wasser verdünnt. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte in Doppelreihen-Messung. Es wurden von jeder Probe zweifach 10 µl auf einer 96-Well PCR-Platte verteilt und 15 µl *Master Mix* (Rezepturen siehe **Tabelle 8**) hinzugegeben. Die fertige Platte wurde mit einer selbstklebenden PCR-Folie verschlossen. In dem *LightCycler 480* (Roche Diagnostic) wurden die Proben mittels der *LightCycler 480 Software 1.5.1* ausgewertet.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Nach der Entnahme des Mediums mit und ohne PBMC wurden die HPDE6c7-Zellen in 50 µl zweifachen Lämmli-Puffer aufgenommen und lysiert. Die Lagerung der Ganzzelllysate erfolgte bei -20°C.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Ganzzelllysate wurde mit dem Proteinassay Dc der Firma Biorad nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Absorption wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 680 nm bestimmt und die Proteinkonzentration gegenüber einer Standardreihe ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Photometers Tecan Sunrise (Tecan) sowie der Revelation QuickLink Software (Dynex Technologies).

3.4.3 Westernblot

Im ersten Schritt des *Westernblots* kommt es zur Auftrennung der Proteinproben nach deren Molekülmasse in einem Gel mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*: SDS-PAGE). Anschließend wird der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgt schließlich mittels Antikörperfärbung der Membran.

3.4.3.1 Vorbereitung der Proteinproben für die Elektrophoretische Auftrennung

Nach der Messung der Proteinkonzentration wurden die Proben für die Gelelektrophorese auf 5 µg/Probe eingestellt und mit zweifachen Lämmli-Puffer auf ein Volumen von 15 µl gebracht. Fünf Mikroliter Farbpuffer entsprechend $\frac{1}{4}$ des Gesamtvolumens (20 µl) wurden dazu pipettiert. Danach

erfolgte die Denaturierung der Proben bei 95°C für 5 Min mit anschließendem Abkühlen auf Eis für eine Min (Rezepturen siehe **Tabelle 8**).

3.4.3.2 Prinzip der SDS-Gelelektrophorese

Die sogenannte SDS-Gelelektrophorese dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen in Ganzzelllysaten. Dazu werden im oben gelegenen Sammelgel die Proben fokussiert und im darunter folgenden Trenngel aufgetrennt. Die Porengröße des Sammel- und Trenngels richtet sich nach dem prozentualen Acrylamidanteil (4-20 %) und ermöglicht somit eine Auftrennung von Proteinen von einem Molekulargewicht von 5-200 kDa. Die Trennung erfolgt unabhängig von der Eigenladung der Proteine. Dies wird durch das anionische Detergenz SDS erreicht. Proteine werden denaturiert und erhalten mittels Komplexbildung einen Ladungsausgleich und eine negative Gesamtladung. Die Geschwindigkeit der Wanderung der Proteine zur Anode des elektrischen Feldes ist somit ausschließlich von der relativen Molekülmasse abhängig.

3.4.3.3 Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese wurden zunächst zwei Glasplatten mit Klammern gegeneinander fixiert und auf Füßen waagrecht aufgestellt. Dabei wurde ein Trenngummi zwischen den Gläsern angebracht. Das Trenngel wurde in einem 50 ml-Röhrchen vorbereitet und zügig mit einer Plastikpipette zwischen den Glasplatten verteilt. Um eine klare Kante zu erhalten, erfolgte die Überschichtung der Polyacrylamidlösung mit Isopropanol. Nach Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol abgegossen und gründlich mit Aqua dest. gespült. Danach wurde das Sammelgel auf das Trenngel aufgebracht. Um Probenaschen zu formen, wurde ein entsprechender Taschenkamm in das flüssige Gel zwischen den Glasplatten eingebracht.

Nach Aushärten des Gels über Nacht erfolgte die vorsichtige Entfernung der Gummidichtung zwischen der Glasplatten. Im Anschluss wurden die Platten mit dem Gel in die bereits mit Laufgelpuffer gefüllte Kammer ohne Luftblasenbildung eingespannt. Nach vollständigem Befüllen der Kammern mit Laufgelpuffer wurde der Kamm aus dem Sammelgel entfernt und die Proben sowie der Marker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung im 10 % igen Gel geschah bei 125 V, bis die blaue Lauffront aus dem Gel ausgetreten war. Die Stromstärke betrug dabei für ein Gel 30 mA und zwei Gele 50 mA (Rezepturen siehe **Tabelle 8**).

3.4.3.4 Proteintransfer

In diesem Schritt wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel mittels Semidry Blotverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dazu wurden mehrere Lagen Whatmann-Papier in Blot-Puffer A, B, C (Rezepturen siehe **Tabelle 8**) wie nachfolgend aufgeführt, getränkt und gestapelt:

- sechs in Blot-Puffer A getränkte Whatman-Papiere
- drei in Blot-Puffer B getränkte Whatman-Papiere
- Membran, 1 Min in Methanol getränkt und anschließend in Aqua dest. gewaschen
- Gel
- sechs in Blot-Puffer C getränkte Whatman-Papiere

Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte für 45 Min bei einer konstanten Stromstärke, die sich aus folgender Formel errechnete:

$$\text{Stromstärke [mA]} = \frac{\text{Länge [cm]} \times \text{Breite [cm]} \times 1,25 \text{mA}}{\text{cm}^2}$$

3.4.3.5 Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran wurde diese für 10 Min in TBS-Tween (TBS-T) auf einem Schütteltisch gewaschen, um anschließend für 2 Stunden auf dem Rollenmischer in Blotto bei RT blockiert zu werden (Rezepturen siehe **Tabelle 8**). Die spezifischen Primärantikörper (siehe **Tabelle 2**) wurden nach Herstellerangaben entsprechend verdünnt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBS-Tween für je 10 Min gewaschen, bevor mit dem entsprechenden Zweitantikörper für eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Alle Zweitantikörper wurden 1:2000 verdünnt (siehe **Tabelle 3**). Anschließend folgten drei Waschgänge mit TBS-T für je 10 Min, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran bei RT für eine Minute mit dem Chemolumineszenz-Substrat *Super Signal West Dura Extended Duration Substrat* (Thermo Scientific) inkubiert. Dabei katalysiert, die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase die Umsetzung des Substrates in ein lumineszierendes Produkt. Dank dieser Lichtreaktion können Banden im FusionSL Dokumentationssystem (Vilber Lourmat) detektiert und mit einer Digitalkamera festgehalten werden. Die Auswertung erfolgte mittels der Fusion Capt Software 16.06 (Vilber Lourmat). Das konstitutiv exprimierte Protein HSP90 diente als Ladekontrolle.

3.5 Apoptose Assay

Um das apoptotische Ansprechen von HPDE6c7-Zellen auf das Zytostatikum Gemcitabin, in Ab- und Anwesenheit von PBMC zu untersuchen, wurde der M30 Assay durchgeführt.

3.5.1 Prinzip des M30 Assays

Der M30 Assay ist ein einstufiger *in vitro* Immunoassay, welcher der quantitativen Bestimmung von Apoptose in epithelialen Zellen dient. Dabei wird die Menge eines Fragments des epithelialen Markers Keratin 18 bestimmt, welche durch Caspase vermittelte Spaltung in Rahmen der Apoptose gebildet wird. Der monoklonale Antikörper M30 bindet spezifisch gespaltenes Keratin 18 (*caspase cleaved keratin 18 cck18*, K18-Asp396), aber nicht natives K18. Damit stellt der M30 Assay eine spezifische quantitative Messung für Apoptose in Epithelzellen dar. In den direkten Co-Kulturen aus HPDE6c7-Zellen und PBMC wurde so ausschließlich die Apoptose der HPDE6c7-Zellen detektiert. Die Apoptoseinduktion erfolgte mit 10 µg/ml des Zytostatikums Gemcitabin, welches standardmäßig zur Therapie des PDAC eingesetzt wird. Dies wurde nach 48 Stunden Kultur mit einer Behandlungsdauer von 24 Stunden appliziert. Im Anschluss daran wurde der M30 Assay durchgeführt.

3.5.2 Durchführung des M30 Assays

Zur Durchführung des M30 Assays wurden die Überstände aus den kultivierten Wells abgenommen, in Eppendorf-Röhrchen überführt und zentrifugiert (3.500 UpM, 5 Min). Der zellfreie Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese wurden entweder direkt im M30 Assay gemessen oder bei -20 °C für eine spätere Aufarbeitung eingefroren. Der M30 Assay wurde bei RT durchgeführt. Dazu wurden alle Reagenzien auf RT gebracht und vor Benutzung gevortext. Die *Wash Solution* und das *M30 Horseradish-peroxidase-(HRP)-Konjugat* wurden entsprechend den Vorgaben verdünnt und vermischt. Anschließend wurden je 25 µL von *M30 Standard A–G*, *M30 Control Low* bzw. *High* und die Proben in eine 96-Well-Platte verteilt. Dazu wurde zügig 75 µl/Well verdünntes *M30 HRP-Konjugat* pipetiert. Die Platte wurde danach mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und für 4 Stunden auf einem Schüttler (600 U/Min) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Platten fünfmalig manuell mit 250 µl *Wash Solution* ausgespült. Nun wurden 200 µl *TMB Substrate* pro Well verteilt und 20 Min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mit 50 µl *Stop Solution* pro Well die Reaktion beendet. Die Platten wurden für 5-10 s geschüttelt, um die komplette Vermischung von *TMB Substrate* und *Stop Solution* zu gewährleisten. Die Absorption wurde nach 5 Min bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem Plattenphotometer gemessen.

3.6 Statistik

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte mit Microsoft Excel 2010. Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 12.5 (Systat) benutzt. Für die Ermittlung der Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest angewandt. P-Werte unter $p = 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von PBMC gesunder Spender und PDAC-Patienten auf den Phänotyp und das Verhalten von Pankreasgangepithelzellen

Für die Karzinogenese spielt die EMT eine bedeutende Rolle. Im Rahmen derer verlieren Epithel- bzw. Karzinomzellen ihren epithelialen Charakter und erwerben Eigenschaften mesenchymaler Zellen, wie zum Beispiel eine spindelförmige Zellform, eine verminderte Expression von epithelialen Molekülen (z.B. E-Cadherin) und eine erhöhte Expression von mesenchymalen Proteinen (Vimentin, L1CAM, TGF- β -1). Da verschiedenste mononukleäre Zellen bereits im Stroma von Vorläuferläsionen (PanINs, CP) zu finden sind, sollte der Einfluss dieser Zellen auf die EMT in Pankreasgangepithelzellen untersucht werden. Um zu berücksichtigen, dass sich die Zusammensetzung bzw. Aktivität der PBMC während der pankreatischen Karzinogenese verändert, wurde der Einfluss von PBMC von 5 gesunden Spendern untersucht und mit dem von PBMC von 5 PDAC-Patienten verglichen.

4.1.1 Zellmorphologie mittels mikroskopischer Beurteilung

Um den funktionalen Einfluss von PBMC auf die EMT in der pankreatischen Tumorigenese zu untersuchen, wurden zunächst EMT-assoziierte Veränderungen in der Zellmorphologie der Zelllinie HPDE6c7 in Ab- und Anwesenheit von PBMC gesunder Spender und PDAC-Patienten in Mono- bzw. Co-Kultur analysiert.

Bei der Untersuchung der Zellmorphologie nach 72 Stunden Kultur mittels Lichtmikroskop zeigten die HPDE6c7-Zellen in Mono-Kultur ein für Epithelzellen typisches adhärentes Wachstum in einem Monolayer. Die Zellform war rundlich bis polygonal (**Abbildung 3**).

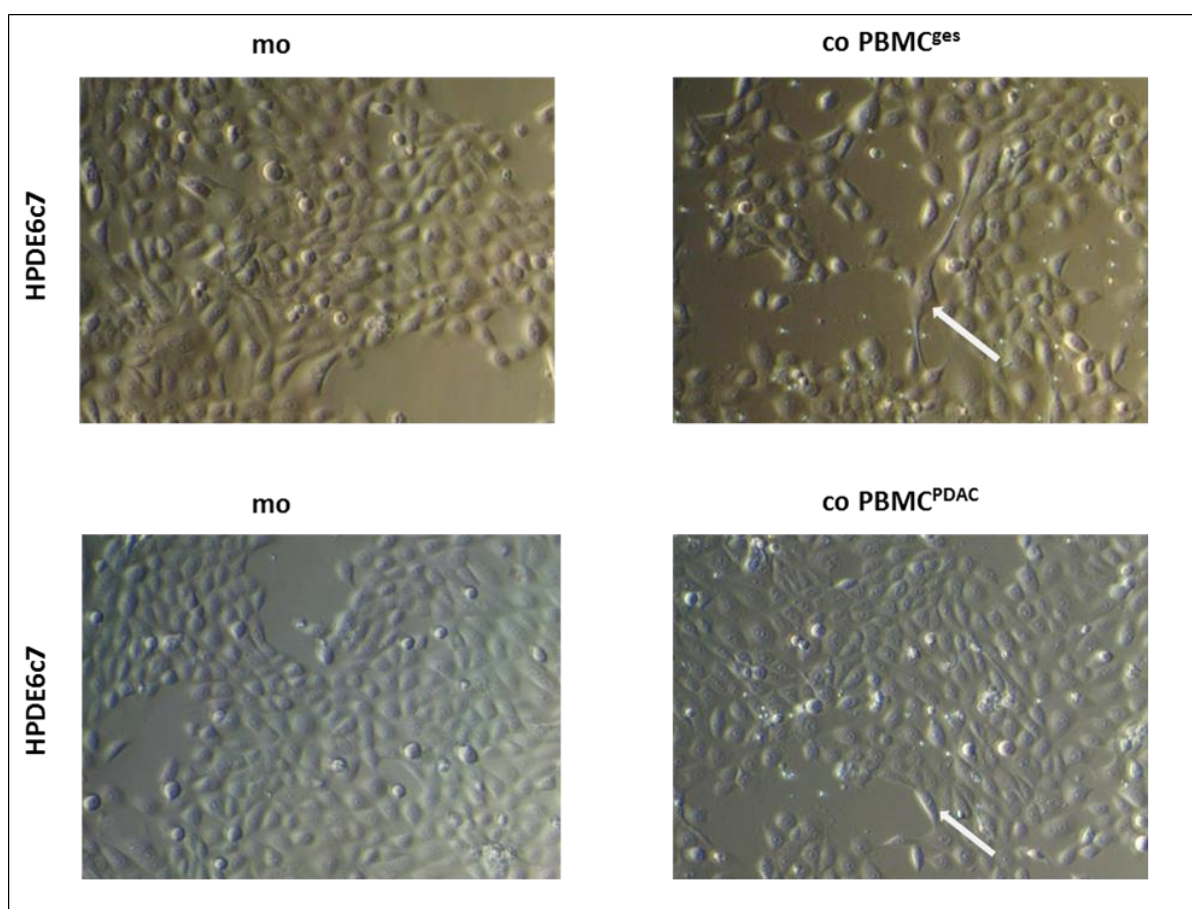


Abbildung 3: Repräsentative Aufnahmen der HPDE6c7-Zellen in Mono- (mo) und Co-Kultur (co) mit PBMC^{Ges} und PBMC^{PDAC} nach 72 Stunden. Die Pfeile zeigen exemplarisch spindelförmige Zellen. Vergrößerung 200-fach.

In den Co-Kulturen verteilten sich die PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten gleichermaßen über das gesamte Well. Der HPDE6c7-Zellrasen wirkte jedoch vereinzelt aufgelockert gegenüber der Mono-Kultur. Weiterhin zeigte sich nach Co-Kultur eine vermehrte spindelförmige Morphologie bei den HPDE6c7-Zellen, die mit einer EMT-Induktion assoziiert wird (**Abbildung 3**). Mikroskopisch konnte kein Unterschied bezüglich Größe, Struktur und Wachstum zwischen HPDE6c7-

Zellen in Co-Kultur mit PBMC von gesunden Spendern bzw. PDAC-Patienten festgestellt werden. Spindelförmige Zellen waren in beiden Ansätzen gleichermaßen zu erkennen.

4.1.2 Nachweis EMT-spezifischer Marker mittels Echtzeit Polymerasekettenreaktion

Als nächstes wurde die Expression von EMT-relevanten Genen auf mRNA-Ebene untersucht. Als epithelialer Marker wurde E-Cadherin, als mesenchymale Marker wurden Vimentin, L1CAM und TGF- β -1 untersucht (Abbildung 4).

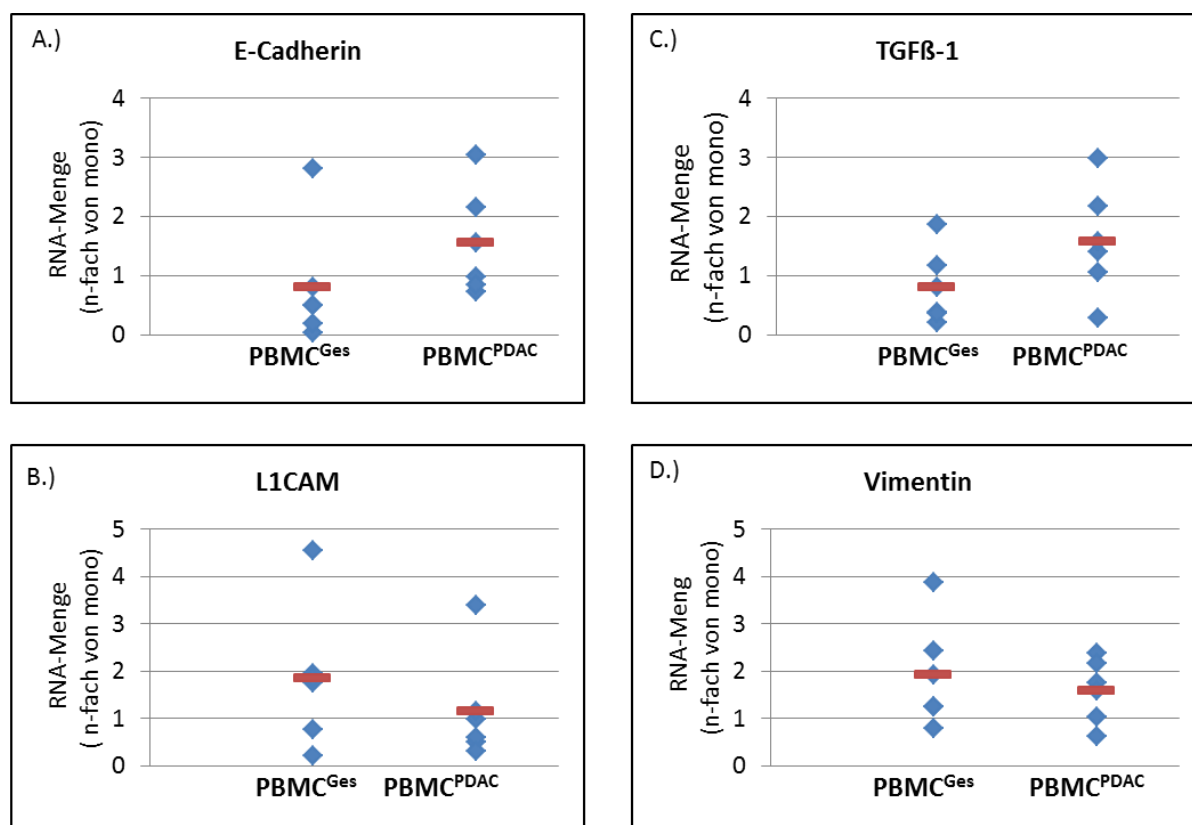


Abbildung 4: HPDE6c7-Zellen wurden für 72 Stunden in An- und Abwesenheit mit PBMC^{Ges} bzw. PBMC^{PDAC} kultiviert. Die RNA-Expression der Epithelzellen wurde per *rtPCR* auf A.) E-Cadherin, B.) L1CAM, C.) TGF- β -1 und D.) Vimentin untersucht. Angegeben ist die RNA-Menge normalisiert auf TBP, welches als Referenzgen verwendet wurde, und als n-faches der Expression der Mono-Kultur. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Versuche (blau) sowie der Mittelwert (rot) von jeweils 5 unabhängigen Versuchen.

Es zeigte sich eine leichte Verringerung der E-Cadherin Expression unter der Co-Kultur mit PBMC von gesunden Spendern (mittlere n-fache RNA Expression: 0,799). Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit von PBMC von PDAC-Patienten eine leichte E-Cadherin Expressionszunahme gegenüber monokultivierter HPDE6c7-Zellen verzeichnet werden (mittlere n-fache RNA Expression: 1,545; $p=0,095$) (Abbildung 4A).

Der mesenchymale Marker L1CAM zeigte im Mittel eine Induktion in HPDE6c7-Zellen in Gegenwart von PBMC gesunder Spender (mittlere n-fache RNA Expression: 1,842). In Gegenwart von PBMC von PDAC-Patienten war hingegen kein Effekt zu beobachten (mittlere n-fache RNA Expression: 1,147) (**Abbildung 4B**).

Eine Induktion von TGF- β -1 konnte in den HPDE6c7-Zellen nur in Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten beobachtet werden. Hier war ein Anstieg im Mittel um 58 % zu verzeichnen, während nach Co-Kultur mit PBMC gesunder Spender eine leichte Verringerung der Expression zu verzeichnen war (mittlere n-fache RNA Expression: 0,798) (**Abbildung 4C**).

Der mesenchymale Marker Vimentin zeigte in Gegenwart der PBMC von gesunden Spendern einen Anstieg der Expression (mittlere n-fache RNA Expression: 1,912). Bei den PBMC der an einem PDAC erkrankten Patienten zeigte sich eine geringe Expressionssteigerung (mittlere n-fache RNA Expression: 1,582) (**Abbildung 4D**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Veränderungen in der Expression EMT-relevanter Gene in HPDE6c7-Zellen in Gegenwart von PBMC zu beobachten waren, wobei es jedoch unterschiedliche Effekte durch PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten gibt. In Gegenwart von PBMC gesunder Spender war vornehmlich eine Induktion der mesenchymalen Marker L1CAM und Vimentin zu beobachten, wohingegen PBMC von PDAC-Patienten zu einem Anstieg von TGF- β -1 und Vimentin, aber auch von E-Cadherin führten.

4.1.3 Nachweis EMT-spezifischer Marker mittels Westernblot

Anschließend wurde die Expression von L1CAM, E-Cadherin und Vimentin in Ganzzelllysaten der HPDE6c7-Zellen aus Mono- bzw. Co-Kultur auf Proteinebene mittels Westernblot untersucht. Als Ladekontrolle diente das *Hitzeschockprotein 90* (HSP90).

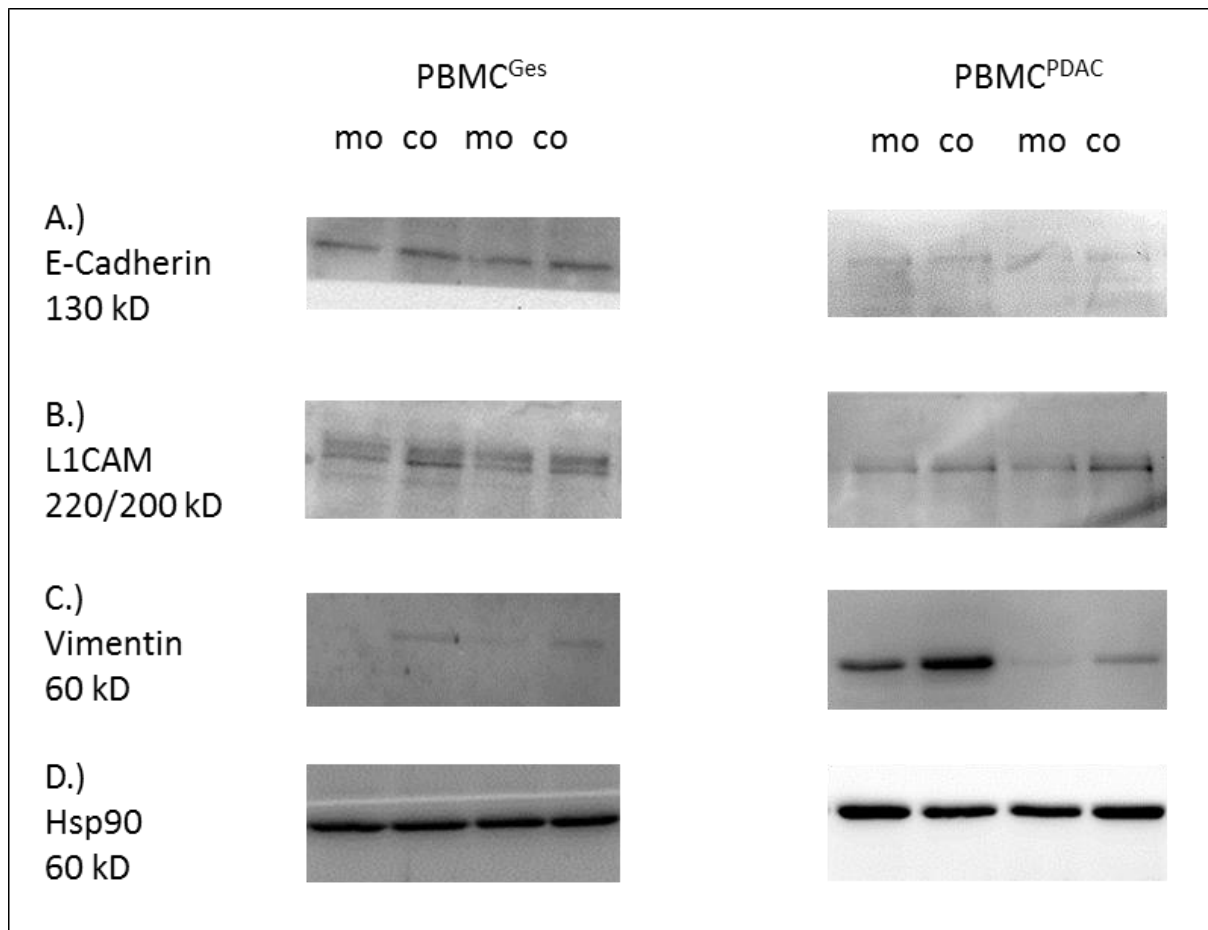


Abbildung 5: Analyse von epithelialen und mesenchymalen Markern in HPDE6c7-Zellen in An- und Abwesenheit von PBMC^{Ges} bzw. PBMC^{PDAC} mittels Westernblot. A.) L1CAM, B.) E-Cadherin, C.) Vimentin und D.) Hsp90, letzteres als Ladekontrolle verwendet, wurden in Ganzzelllysaten von mono- und co-kultivierten HPDE6c7-Zellen mittels Westernblot detektiert. Es werden repräsentative Ergebnisse von Versuchen mit PBMC von je zwei gesunden Spendern bzw. PDAC-Patienten gezeigt.

Nach Co-Kultur mit PBMC gesunder Spender konnte gegenüber monokultivierter HPDE6c7-Zellen ein leichter Anstieg des epithelialen Proteins E-Cadherin beobachtet werden. Nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten zeigte sich keine Veränderung der Expression, wobei der Proteinnachweis insgesamt schwächer war als bei der mit den Proben aus Versuchen mit PBMC gesunder Spender (**Abbildung 5A**).

Ferner stellte sich ein Anstieg der L1CAM-Expression unter Co-Kultur gegenüber der Mono-Kultur dar. Dieser präsentierte sich unter Co-Kultur mit PBMC gesunder Spendern ausgeprägter als nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten dar (**Abbildung 5B**).

Der mesenchymale Marker Vimentin wies in HPDE6c7-Zellen eine vermehrte Expression unter Co-Kultur mit PBMC gesunder Spender auf, wobei in monokultivierten Epithelzellen kaum Vimentin nachweisbar war. In Gegenwart von PBMC von PDAC-Patienten war die Expressionssteigerung von Vimentin deutlicher ausgeprägt als in Gegenwart von PBMC gesunder Spender. In einem Versuch konnte jedoch auch in monokultivierten HPDE6c7-Zellen eine prägnante Vimentinexpression detektiert werden (**Abbildung 5C**).

Das Kontrollprotein HSP90 wurde deutlich in allen Proben nachgewiesen und versichert, dass alle Proben mit dem gleichen Proteingehalt im Gel aufgetrennt wurden (**Abbildung 5D**).

Wie bereits in der *rtPCR* Analyse konnten auch im Westernblot EMT-assoziierte Veränderungen in den HPDE6c7-Zellen in Gegenwart von PBMC von gesunden Spendern und PDAC-Patienten beobachtet werden. Eine Induktion der mesenchymalen Marker L1CAM und Vimentin zeigte sich sowohl in den Co-Kulturen der PBMC gesunder Spender als auch mit den PBMC von PDAC-Patienten. Der epitheliale Marker E-Cadherin hingegen deutet mit einer Expressionszunahme unter Co-Kultur mit den PBMC gesunder Spender eher auf eine Reversion der EMT hin.

4.1.4 Bestimmung des Apoptoseverhaltens von HPDE6c7-Zellen gegenüber Gemcitabin mittels M30 Assay

Kennzeichnend für das PDAC ist seine ausgeprägte Chemoresistenz. Daher wurde als nächstes untersucht, ob PBMC das Ansprechen der HPDE6c7-Zellen auf Zytostaktika verändern. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde ein M30 Assay durchgeführt, mit dem ausschließlich die Apoptoseinduktion der epithelialen Zellen, nicht aber der PBMC gemessen wird. Dies gelingt durch Detektion des epithelialen Neopeptops K18, das im Rahmen der Apoptose Caspase-abhängig von Zytokeratin 18 abgespalten wird. Es dient damit als Maß für das Ansprechen auf einen Apoptosestimulus (Gemcitabin).

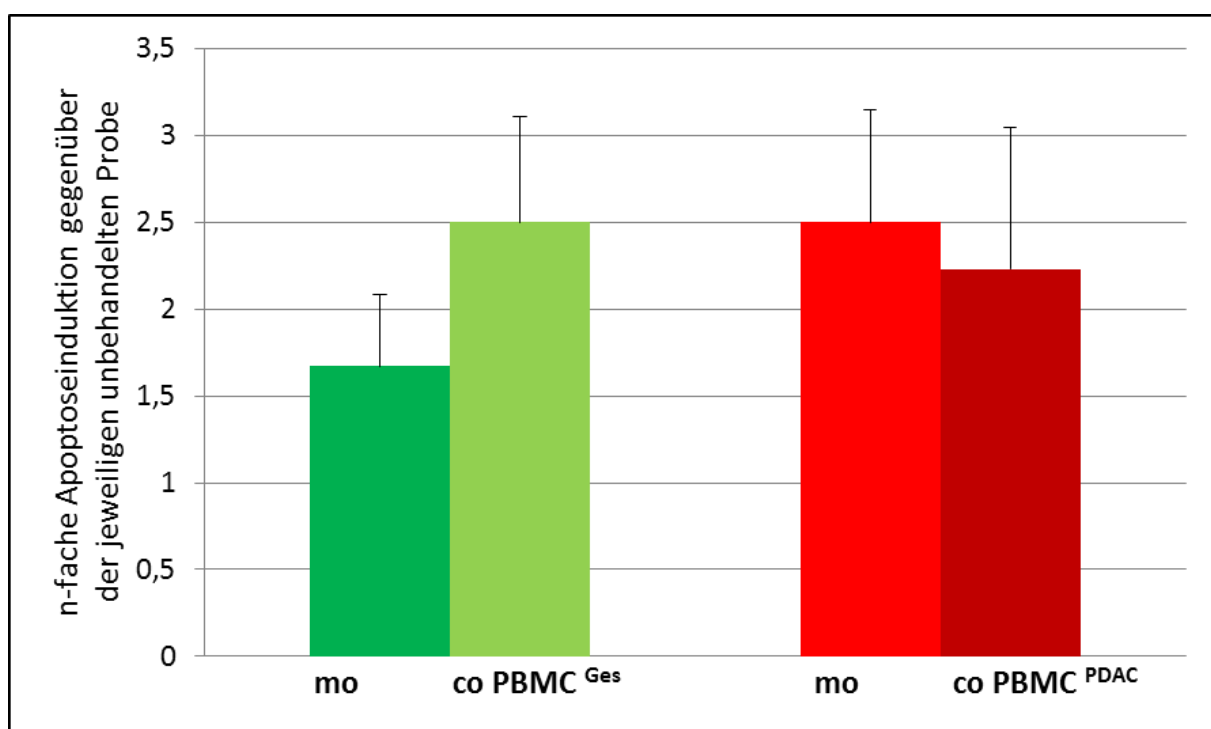


Abbildung 6: M30 Assay zur Detektion der Caspase-abhängigen Bildung des Neopeptops von Zytokeratin 18 in den Überständen der HPDE6c7-Zellen unter Mono- bzw. Co-Kultur mit PBMC^{Ges} und PBMC^{PDAC} 24 Stunden nach Stimulation mit Gemcitabin. HPDE6c7-Zellen wurden 72 Stunden in Abwesenheit (mo) oder Anwesenheit von PBMC^{Ges} und PBMC^{PDAC} (co) kultiviert und nach 48 Stunden über 24 Stunden mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte des luminometrisch gemessenen Neopeptops K18 von Zytokeratin 18, welches durch Caspasen gespalten wird. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung der Apoptoseinduktion als n-faches der jeweiligen unbehandelten Referenz aus 5 unabhängigen Versuchen.

In Gegenwart von PBMC gesunder Spender konnte eine deutliche, aber knapp nicht signifikante ($p=0,056$) Erhöhung der Konzentration des Zytokeratin 18 Neopeptops nach Stimulation mit Gemcitabin gegenüber der monokultivierten HPDE6c7-Zellen beobachtet werden (mono: 1,67 / co PBMC^{Ges}: 2,50). Im Gegensatz dazu wurde in Überständen von HPDE6c7-Zellen, die mit PBMC der PDAC-Patienten kultiviert wurden, eine leicht verminderte Konzentration des Neopeptops

gegenüber der monokultivierten HPDE6c7-Zellen detektiert (mo: 2,50 / co PBMC^{PDAC} 2,23) (**Abbildung 6**).

Zusammenfassend lassen diese Befunde den Schluss zu, dass PBMC das Ansprechen von HPDE6c7-Zellen gegenüber Gemcitabin beeinflussen, wobei PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten unterschiedliche Effekte auszuüben scheinen.

4.2 Charakterisierung der PBMC mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie

Um die partiell unterschiedlichen Effekte durch die Anwesenheit von PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten auf die pankreatischen Gängepithelzellen besser einordnen zu können, wurden die PBMC vor der Co-Kultur mit HPDE6c7-Zellen mittels Immunfluoreszenzmarkierung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse charakterisiert. Bei der Betrachtung eines möglichen Einflusses, standen vor allem die verschiedenen Untergruppen der Lymphozyten im Mittelpunkt. Von den verschiedenen Zellpopulationen wurde jeweils die Gesamtzellzahl pro ml Blut sowie der prozentuale Anteil bezogen auf Lymphozyten, PBMC oder CD4+ und CD68+ Zellen ermittelt.

4.2.1 Charakterisierung der T-Zellen

Die Gesamtzellzahl an CD3+ Zellen innerhalb der Lymphozyten war in PDAC-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (1467/ μ l versus 1218/ μ l) dezent erhöht (**Abbildung 7A.1**). Weiterhin zeigte sich ein höherer prozentualer Anteil an CD3+ Zellen unter den Lymphozyten gesunder Spender (Mittelwert: 74,83 %) gegenüber den PDAC Patienten (Mittelwert: 69,53 %) (**Abbildung 7A.2**).

Bei den CD8+ zytotoxischen T-Zellen war die Gesamtzellzahl innerhalb der Lymphozyten unter den gesunden Spendern (Mittelwert: 356,00/ μ l) gegenüber der von den PDAC-Patienten niedriger (Mittelwert: 485,60/ μ l) (**Abbildung 7B.1**), während sich beim prozentualen Anteil zwischen den Lymphozyten gesunder Spender (Mittelwert: 20,86 %) und PDAC-Patienten (Mittelwert: 21,67 %) kein relevanter Unterschied zeigte (**Abbildung 7B.2**).

Die Gesamtzellzahl der CD4+ T-Zellen erschien innerhalb der Lymphozyten gesunder Spender (Mittelwert: 817,60/ μ l) geringfügig vermindert im Vergleich zu den PDAC-Patienten (Mittelwert: 957,20/ μ l) (**Abbildung 7C.1**). Im prozentualen Anteil stellte sich eine geringe Erhöhung der CD4+

Zellen innerhalb der Lymphozyten der gesunden Spender (49,89 % versus 46,72 %) dar (**Abbildung 7C.2**).

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen (CD25+CD4+) fiel auf, dass diese unter den CD4+ Lymphozyten der PDAC-Patienten (Mittelwert: 65,96/ μ l) gegenüber den CD4+ Lymphozyten gesunder Spender (Mittelwert: 53,82/ μ l) in einer erhöhten Gesamtzellzahl auftraten (**Abbildung 7D.1**). Prozentual war diese T-Zellpopulation innerhalb der CD4+ Lymphozyten beider Gruppen jedoch ähnlich verteilt (7,85 % versus 7,21 %) (**Abbildung 7D.2**).

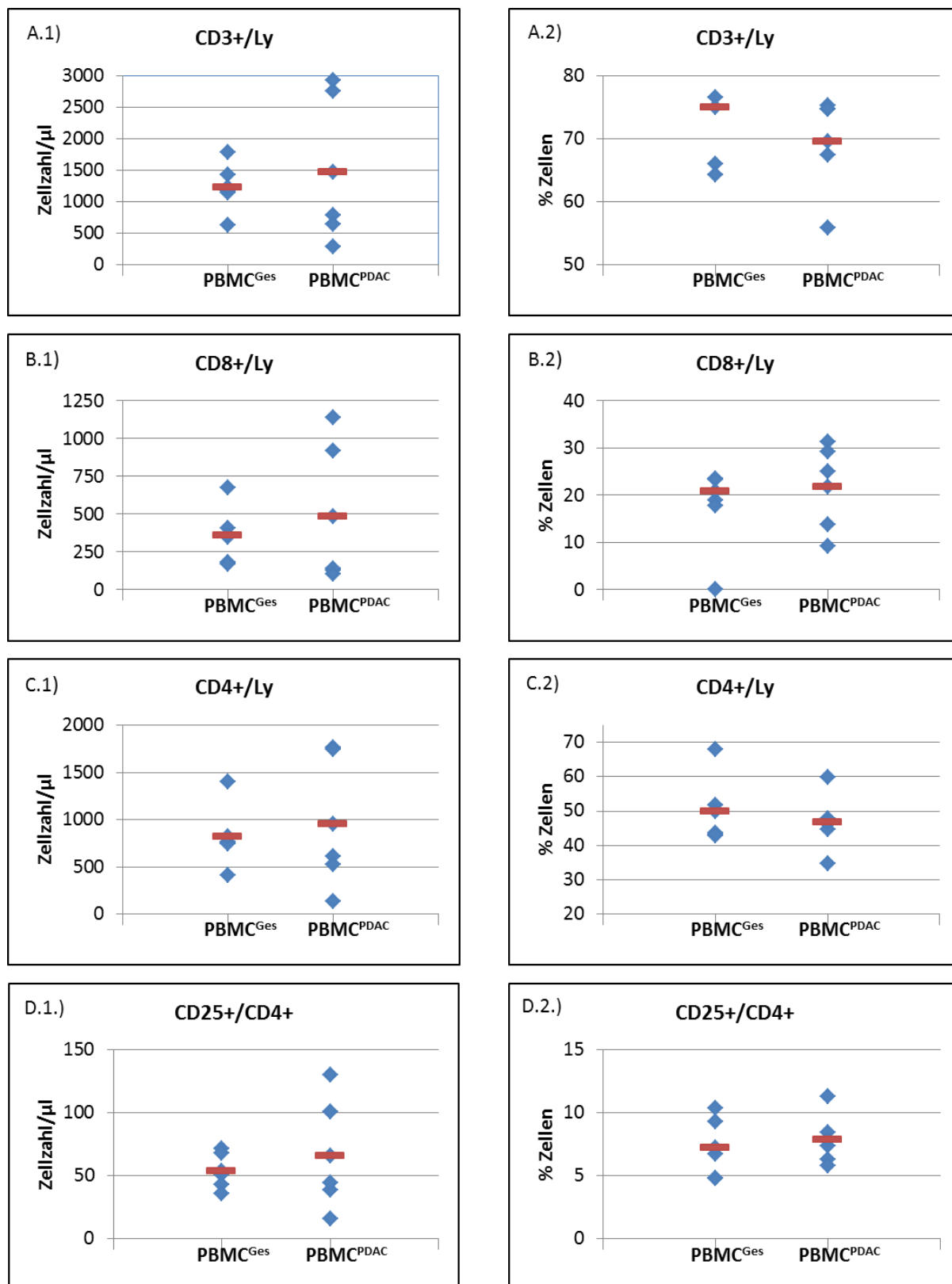


Abbildung 7: Charakterisierung der frisch isolierten PBMC aus dem Blut gesunder Spender (PBMC^{Ges}) oder von PDAC-Patienten (PBMC^{PDAC}) mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie. Folgende Marker der Charakterisierung von T-Zellen wurden analysiert: A.) CD3, B.) CD8, C.) CD4 und D.) CD25. Davon werden jeweils von A./B./C.) 1.) die Gesamtzellzahl/ μl und 2.) der prozentuale Anteil in Lymphozyten (Ly) dargestellt. Von D.) wird jeweils 1.) die Gesamtzellzahl/ μl und 2.) der prozentuale Anteil in CD4+ T-Zellen dargestellt. Gezeigt werden die Werte der einzelnen Spender (blau) sowie der Mittelwert (rot) von jeweils 5 Spendern.

4.2.1.1 Aktivierungs- und *Memory*-Marker der T-Zellen

Der Aktivierungsstatus von CD4⁺ T-Zellen wurde anhand der CD69-Expression bestimmt. Es zeigte sich, dass bei den PBMC von PDAC-Patienten sowohl die Gesamtzellzahl als auch der prozentuale Anteil an CD69⁺CD4⁺ T-Zellen (Mittelwert: 56,84/ μ l; 4,94 %) im Vergleich zu den PBMC gesunder Spender (Mittelwert: 26,35/ μ l; 3,33 %) erhöht war (**Abbildung 8A.1 und 2**).

Auch der Anteil der CD45RO⁺ Zellen unter den CD4⁺ T-Zellen in den PBMC erkrankter PDAC-Patienten (Mittelwert: 517,93/ μ l; 48,15 %) war im Gegensatz zu den PBMC gesunder Spender (Mittelwert: 285,72/ μ l; 36,51 %) erhöht (**Abbildung 8B.1 und 2**).

Es zeigte sich kein Unterschied bei dem Anteil von CD45RO⁺ regulatorischer CD25⁺CD4⁺ T-Zellen zwischen PBMC gesunder Spender (Mittelwert: 34,99/ μ l; 4,44 %) und der PBMC von PDAC-Patienten (Mittelwert: 35,75/ μ l; 3,79 %) (**Abbildung 8C.1 und 2**).

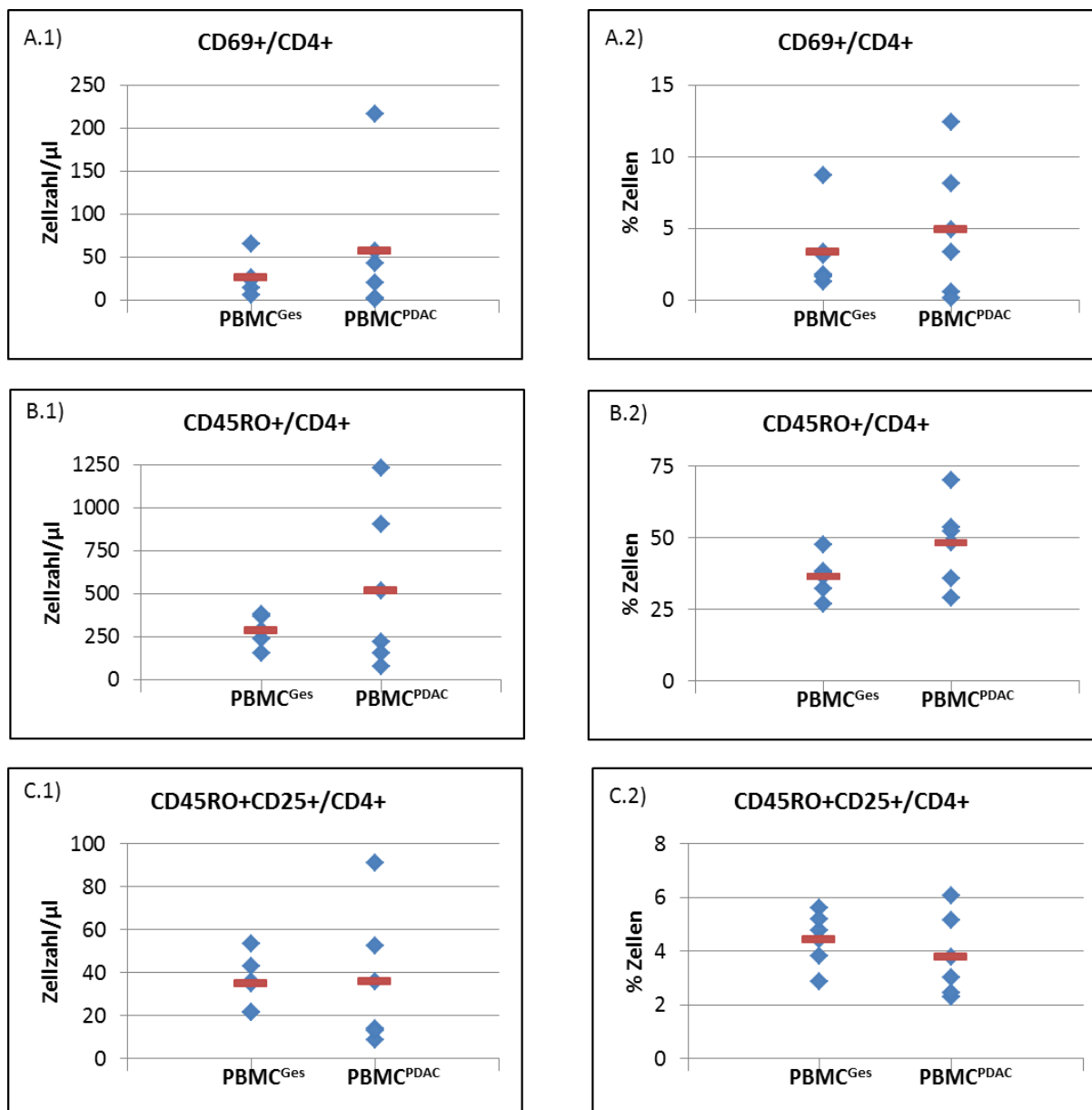


Abbildung 8: Charakterisierung der frisch isolierten PBMC aus dem Blut gesunder Spender (PBMC^{Ges}) oder von PDAC-Patienten (PBMC^{PDAC}) mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie. Folgende Marker der Aktivierung A.) CD69 und B.) CD45RO wurden in CD4+ T-Zellen und C) CD45RO in regulatorischen CD25+CD4+ T-Zellen analysiert. Davon werden jeweils die 1.) Gesamtzellzahl/ μl und der 2.) prozentuale Anteil an CD4+ T-Zellen dargestellt. Gezeigt werden die Werte der einzelnen Spender (blau) sowie der Mittelwert (rot) von jeweils 5 Spendern.

4.2.3 Charakterisierung der Monozyten und Makrophagen

Der prozentuale Anteil an CD68+ Zellen unter den PBMC gesunder Spender (Mittelwert: 13,71 %) sowie unter den PBMC von PDAC-Patienten (Mittelwert: 13,64 %) erwies sich als nahezu identisch (Abbildung 9).

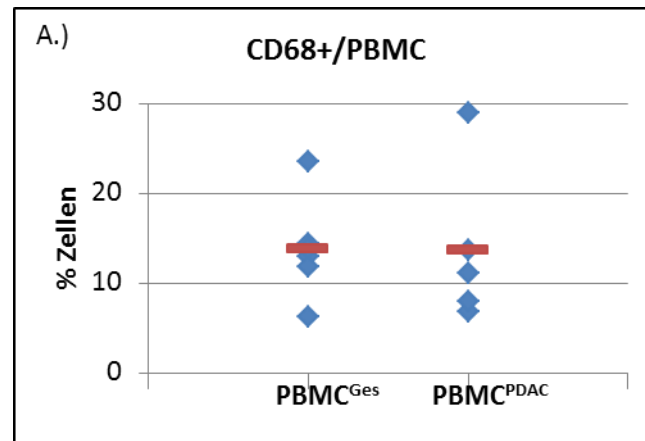


Abbildung 9: Charakterisierung der frisch isolierten PBMC aus dem Blut gesunder Spender (PBMC^{Ges}) oder von PDAC-Patienten (PBMC^{PDAC}) mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie. Folgende Marker der Charakterisierung von Monozyten wurden analysiert: prozentualer Anteil an A.) CD68+ Zellen bezogen auf PBMC. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Spender (blau) sowie der Mittelwert (rot) von jeweils 5 gesunden Spendern bzw. 4 PDAC-Patienten

Die CD14+ sowie die CD11b+ Zellen waren unter den CD68 positiven Zellen gesunder Spender (Mittelwert: 72,99 % / 77,29 %) gegenüber denen von PDAC-Patienten (Mittelwert: 77,49 % / 87,81 %) geringfügig verringert (**Abbildung 10A+B**).

Der Anteil an CD16+ innerhalb der CD68+-Zellen wies eine minimale Erhöhung unter CD68+ Zellen gesunder Spender (Mittelwert: 28,78 %) gegenüber denen von PDAC-Patienten (Mittelwert: 24,09 %) auf (**Abbildung 10C**).

Die HLA-DR-Expression unter den CD68+ Zellen von gesunden Spendern und PDAC-Patienten erwies sich nahezu identisch und lag im Mittel bei 75,84 % bzw. 73,56 % (**Abbildung 10D**)

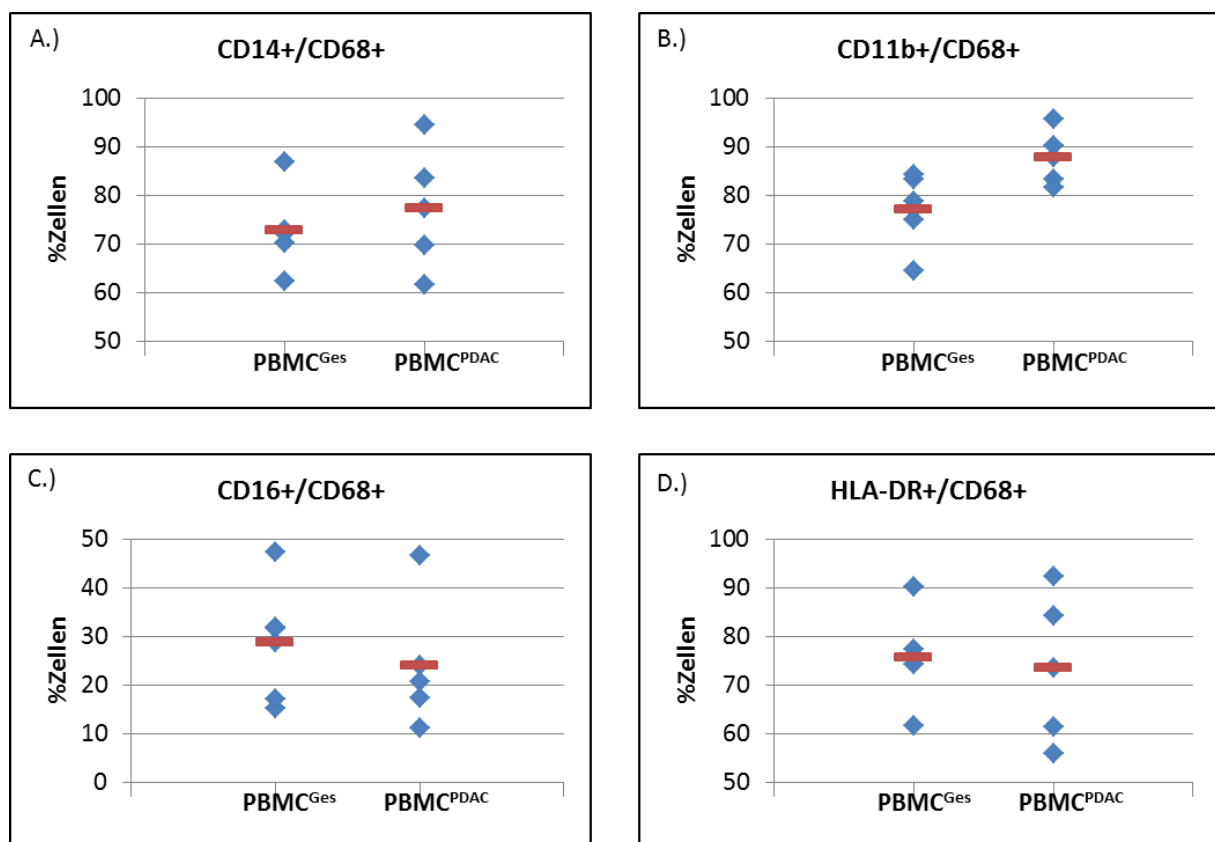


Abbildung 10: Charakterisierung der frisch isolierten PBMC aus dem Blut gesunder Spender (PBMC^{Ges}) oder von PDAC-Patienten (PBMC^{PDAC}) mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie. Folgende Marker der Charakterisierung von Monozyten wurden analysiert: prozentualer Anteil an A.) CD14, B.) CD11b, C.) CD16 und D.) HLA-DR+ Zellen innerhalb von CD68+ Zellen. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Spender (blau) sowie der Mittelwert (rot) von jeweils 5 gesunden Spendern bzw. 4 PDAC-Patienten.

4.2.4 Charakterisierung der B-Zellen und NK-Zellen

Bei Betrachtung der CD19⁺ B-Zellen zeigte sich eine Erhöhung der Gesamtzellzahl und des prozentualen Anteils unter den Lymphozyten von PDAC-Patienten (Mittelwert: 242,60/ μ l; 11,25 %) gegenüber der Lymphozyten gesunder Spender (Mittelwert: 141,20/ μ l; 9,08 %) (**Abbildung 11A1 und 2**).

In einem geringeren Ausmaß zeigte sich ein ähnliches Resultat bei den NK-Zellen. So war die Gesamtzellzahl und der prozentuale Anteil an CD16⁺ und CD56⁺ Zellen unter den Lymphozyten der PDAC-Patienten (Mittelwert: 293,80/ μ l; 17,52 %) höher als derer unter den Lymphozyten gesunder Spender (Mittelwert: 223,20/ μ l; 15,16 %) (**Abbildung 11B.1 und 2**).

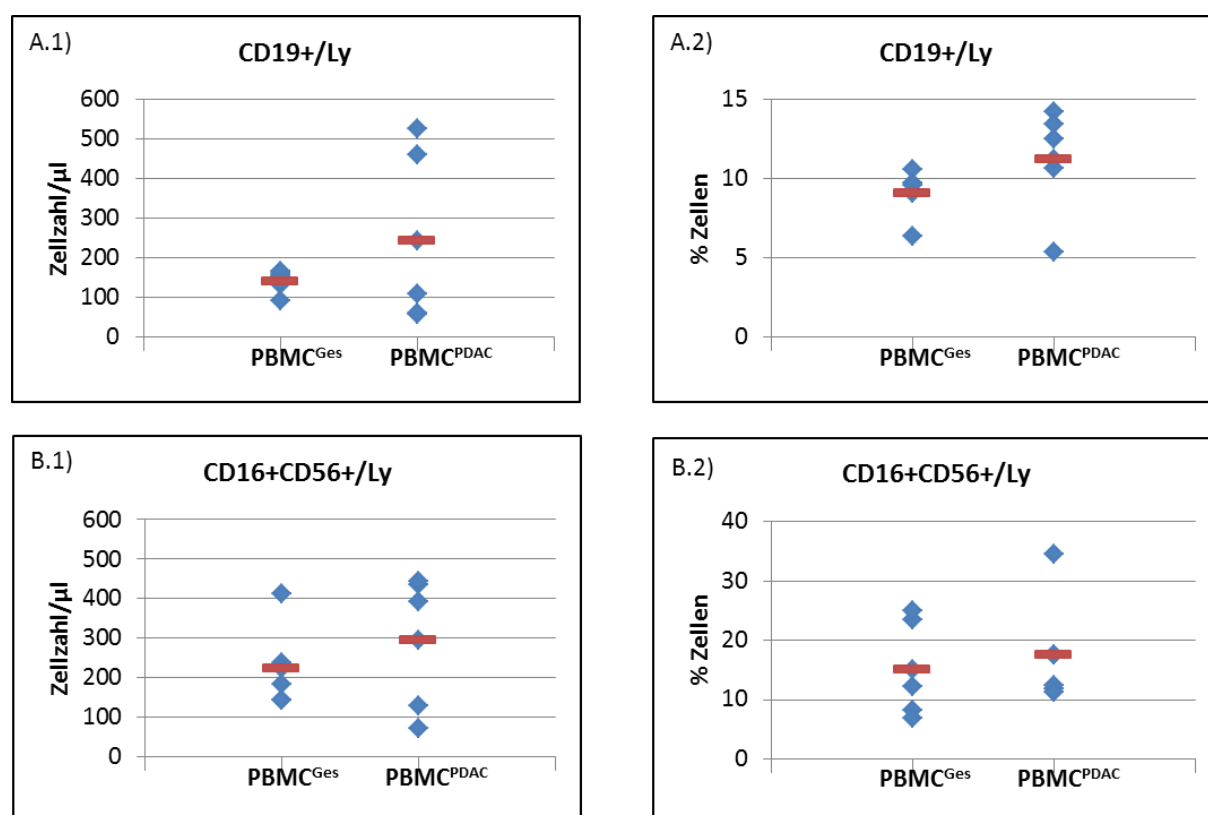


Abbildung 11: Charakterisierung der frisch isolierten PBMC aus dem Blut gesunder Spender (PBMC^{Ges}) oder von PDAC-Patienten (PBMC^{PDAC}) mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie. Folgende Marker der Charakterisierung von B-Zellen und NK-Zellen wurden analysiert: A.) CD19 und B.) CD16 und CD56. Gesamtzellzahl/ μ l und der 2.) prozentuale Anteil an Lymphozyten (Ly) dargestellt. Gezeigt werden die Werte der einzelnen Spender (blau) sowie der Mittelwert (rot) von jeweils 5 Spendern.

Zusammenfassend ließen sich bei Betrachtung der Charakterisierung von Lymphozyten mittels Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie aus dem Blut gesunder Spender und PDAC-Patienten unter den T-Zellen (CD3+, CD4+ und CD8+) keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kollektiven aufweisen. Der Anteil an aktivierten (CD69+ oder CD45RO+) Zellen unter den CD4+ T-Zellen bei den Lymphozyten aus dem Blut PDAC erkrankter Patienten stellte sich allerdings erhöht gegenüber dem gesunden Spender dar.

Ferner zeigte sich eine Anreicherung der regulatorischen T-Zellen (CD25+CD4+) unter den Lymphozyten von PDAC-Patienten gegenüber der Lymphozyten gesunder Spender. Hier stellte sich kein Unterschied bezüglich ihres Aktivierungsstatus dar.

Auch der Anteil an Makrophagen (CD68+) unter den PBMC gesunder Spender und PDAC-Patienten war nahezu identisch. Bei der weiteren Charakterisierung anhand der Expression von CD14, CD16 und HLA-DR offenbarten sich geringe Unterschiede der Verteilung. So waren der Anteil an CD14+ Zellen und CD11b+ Zellen unter den CD68+ Zellen von PDAC-Patienten erhöht gegenüber den CD68+ Zellen von gesunden Spendern. Dahingegen wurden minimal mehr M2-polarisierte CD16+ Makrophagen unter den CD68+ Zellen gesunder Spender gefunden.

Abschließend ergab die Analyse von B- und NK-Zellen, dass beide Zellpopulationen tendenziell vermehrt im Blut von PDAC-Patienten auftreten.

So lässt sich im Überblick sagen, dass bei diesem kleinen Kollektiv distinkte Unterschiede in der Zusammensetzung sowie des Aktivierungsstatus von PBMC bei gesunden Spendern und PDAC-Patienten detektierbar sind.

5 Diskussion

Nach wie vor gibt es keine zufriedenstellende frühe Diagnostik und effektive Therapie des PDAC. Mangelnde Vorsorgeuntersuchungen in Kombination mit unspezifischen bzw. fehlenden Frühsymptomen bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium und häufig bereits erfolgter Metastasierung lassen meist nur noch eine palliative Behandlung zu. Die suffiziente Therapie wird zudem durch eine ausgeprägte Resistenz gegen Chemotherapeutika erschwert. Gemcitabin wird zwar als Standardtherapeutikum in der Behandlung des PDAC eingesetzt, ermöglicht aber nur eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit und nimmt auf das Beschwerdebild kaum Einfluss. So stellt das PDAC auch heute noch eine infauste Prognose dar. Eine Besserung der Situation soll durch neuartige Diagnose- und Therapieverfahren erreicht werden. Ansatzpunkte bieten hierfür u.a. EMT, Tumorstroma, Immunzellen und ihre diversen Wechselwirkungen untereinander über Zytokine bzw. Chemokine.

Diese Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, den Einfluss von PBMC auf das duktales Pankreasgangepithel zu untersuchen, um ein besseres Verständnis über die anfänglichen Veränderungen in der pankreatischen Tumorgenese zu erhalten. Zur Untersuchung der frühen Tumorigenese wurde die benigne Pankreasgangepithelzelllinie HPDE6c7 gewählt. Nach direkter Co-Kultur der Zelllinie mit PBMC aus dem Blut gesunder Spender und von PDAC-Patienten wurden die HPDE6c7-Zellen hinsichtlich Tumor-assoziierten Veränderungen im EMT-Status und im Ansprechen auf Apoptosestimuli untersucht. Unter allen Co-Kulturbedingungen zeigte sich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Induktion von EMT in den Epithelzellen. Dabei fielen unterschiedliche Effekte durch die PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten auf die EMT-Markerexpression auf (diskutiert in **Kapitel 5.1**). Weiterhin wies der Apoptoseassay auf eine herabgesetzte Sensibilität der HPDE6c7-Zellen, die mit PBMC von PDAC-Patienten kokultiviert wurden, gegenüber Gemcitabin hin (diskutiert in **Kapitel 5.2**). Dabei werden die Ergebnisse in Hinblick auf die phänotypischen Unterschiede der PBMC gesunder und von PDAC-Patienten betrachtet.

Insgesamt untermauern die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse die Hypothese, dass das Tumorstroma und die dort angereicherten Immunzellen nicht nur eine immunmodulatorische Komponente während der Tumorigenese sind, sondern vielmehr direkten Einfluss auf die Epithelzellen und damit auf die Entwicklung epithelialer Tumore einnehmen. Therapiekonzepte, die auf neusten Erkenntnissen basieren, werden in **Kapitel 5.3** vorgestellt und diskutiert.

5.1 Einfluss von PBMC auf die EMT in Pankreasgangepithelzellen

Im Pankreasgewebe hat die zeitliche Fluktuation der Anreicherung der unterschiedlichen Zellpopulationen (T-Zellen, Makrophagen, Myofibroblasten etc.) sowie deren Zusammensetzung und Verteilung im Stromalen Kompartiment der CP und des PDAC [73] einen nicht unerheblichen und variablen Einfluss auf den EMT-Prozess während der Tumorgenese. CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen dominieren das Geschehen im Gewebestroma der CP. Im PDAC-Gewebe hingegen sind vor allem Myofibroblasten und Treg präsent, die den Hauptpromotor der EMT in späteren Stadien darstellen [70, 73, 123].

Nach Co-Kultur der HPDE6c7-Zellen mit PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten konnten in dieser Arbeit EMT-typische Veränderungen der Epithelzellen beobachtet werden, wie bei Betrachtung der Co-Kulturen unter dem Lichtmikroskop zu sehen war. Die Annahme einer spindelförmigen Morphologie der HPDE6c7-Zellen unter Co-Kultur stach gegenüber der Mono-Kultur hervor. In der folgenden *rtPCR* überwog eine Erhöhung der mesenchymalen Marker (L1CAM, Vimentin und TGF- β -1) in den co-kultivierten epithelialen Zellen. Dabei zeigten sich Differenzen zwischen den vermittelten Effekten beider PBMC-Kollektive. In Gegenwart von PBMC gesunder Spender wurde in den HPDE6c7-Zellen vornehmlich eine Induktion von L1CAM und Vimentin beobachtet, während die TGF- β -1- und E-Cadherin-Expression vermindert erschienen. Nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten hingegen erfolgte eine gesteigerte TGF- β -1- und Vimentin-Expression. Die L1CAM-Expression blieb nahezu unverändert, während gleichzeitig eine Expressionszunahme von E-Cadherin nachgewiesen wurde.

Da nicht immer alle Ereignisse während der EMT eine strenge Abfolge einhalten, ist ein Nebeneinander von epithelialen und mesenchymalen Charakteristika durchaus möglich. Dies offenbarte sich auch in *in situ* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Bereits in PanINs der CP geht die E-Cadherin-Expression verloren, während die Expression von Vimentin und L1CAM, welche beide im normalen Pankreasdukt fehlen, erhöht exprimiert wird [74, 137]. Die Veränderungen dieser Marker konnten nicht immer gleichzeitig in demselben PanIN nachgewiesen werden [137]. Auch hier wurden mesenchymale Proteine detektiert, während die E-Cadherin-Expression noch erhalten war und umgekehrt [137].

Weiterhin wurden in dieser Arbeit im Westernblot verschiedene Effekte in Gegenwart von PBMC von gesunden Spendern und PDAC-Patienten beobachtet. So wies der epitheliale Marker E-Cadherin unter Co-Kultur mit den PBMC gesunder Spender eine Expressionszunahme auf, während sich unter Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten keine Expressionsveränderung darbot. Eine Induktion

unterschiedlichen Ausmaßes der mesenchymalen Marker L1CAM und Vimentin zeigte sich in den Co-Kulturen sowohl mit PBMC gesunder Spender als auch mit den PBMC von PDAC-Patienten. Somit sind zwar gewisse Diskrepanzen in der Ausprägung der Expressionsveränderungen der EMT-Marker in den HPDE6c7-Zellen unter Co-Kultur mit PBMC gesunder und PDAC-Patienten auf RNA- und Proteinebene zu verzeichnen, jedoch stellt sich bei allen Versuchen (auch in Zusammenschau mit den morphologischen Veränderungen) ein vorwiegend EMT-fördernder Einfluss der PBMC auf die HPDE6c7-Zellen dar. Dabei muss der geringe Umfang von jeweils 5 Proben von gesunden Spendern sowie von PDAC-Patienten beachtet werden. Dies stellt ein sehr kleines Kollektiv dar. Daneben wurden tiefgehende Analysen der Signalwege in den verschiedenen Zellpopulationen (z.B. NF- κ B) bzw. die Interaktion der Zellen durch diverse Zytokine (z.B. IL-10) sowie weitere funktionelle Analysen, die das Migrations- und Invasionsvermögen untersuchen, aufgrund des limitierten Zellmaterials nicht durchgeführt. Diese sind jedoch als weiterführende Untersuchungen geplant. Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen daher als Anhaltspunkt und werden unterstützt bzw. ergänzt durch diverse Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [70, 73, 123, 129, 137, 138].

In der Zusammenschau mit der durchflusszytometrischen Analyse und Charakterisierung der PBMC ergeben sich Hinweise darauf, welche Zellen des PBMC-Kollektivs Promotoren und Unterstützer der beobachteten mesenchymalen Veränderungen in den pankreatischen Gangepithelzellen verkörpern könnten. Die meisten Tumor-assoziierten Immunzellen sind immunsuppressiv. Ihre Anwesenheit dient dem Tumor als immuner *escape*-Mechanismus, der das Überleben von prä-/neoplastischen Zellen ermöglicht und somit die Tumorgenese fördert [139-141]. Neben dieser immunologischen Funktion steuern Immunzellen zur Initiierung und Progression von Tumoren durch Erleichterung von Angiogenese sowie Migration und Metastasierung bei [73, 139, 140].

In der Analyse der T-Zellen fielen in dieser Arbeit anhand der Charakterisierung der verschiedenen Subtypen (CD3+, CD4+ und CD8+) keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden PBMC-Kollektiven auf. In der Literatur sind Ergebnisse zu finden, die *ex vivo* eine höhere CD4+ bzw. CD8+ T-Zell-Reaktivität (mehr als 50%) von PDAC-Patienten gegenüber Patienten mit anderen Krebsentitäten (25-60%) zeigen [142-146]. Die Befunde deuten darauf hin, dass PDAC-Patienten zwar durchaus Effektorzellen haben, die potentiell Tumorreaktiv sind, diese im Tumor/Patienten jedoch nicht funktionell sind. Ursächlich hierfür ist das immunsuppressive Milieu des PDAC. So wird eine hohe T-Zell-Antwort im Knochenmark durch Antigene ausgelöst, jedoch unterbleibt im Primärtumor die Aktivierung der T-Zellen [139]. Zur Ausbildung des immun-suppressiven Tumormilieus tragen vorwiegend Treg durch die Sekretion inhibitorischer Zytokine wie z.B. TGF- β -1 oder IL-10 bei [139, 147].

Treg stellen zweifellos die am besten charakterisierten immunsuppressive Subpopulation der CD4+ T-Zellen dar. Dabei repräsentieren sie nur einen sehr kleinen Anteil unter den CD4+ T-Zellen und dennoch werden sie bisweilen als die potentesten Inhibitoren der Antitumorimmunität angesehen. Sie inhibieren die Aktivität von CD4+ und CD8+ als auch von NK-Zellen und unterstützen EMT bzw. PDAC-Progression in späten Phasen [137]. Ungeachtet dessen ließen sich in dieser Arbeit keine signifikanten Veränderungen in der CD25+/CD4+ Treg-Anreicherung oder deren Aktivierungsstatus im Blut von PDAC-Patienten gegenüber gesunder Spender wahrnehmen.

In der Arbeit von Grage-Griebenow et al., in der in einem größeren Umfang Blutproben von 22 PDAC-Patienten und 22 gesunden Spendern charakterisiert wurden [138], konnte eine vermehrte CD4+CD25+ T-Zell Anreicherung im Blut von PDAC-Patienten gegenüber gesunden Spendern dokumentiert werden. Dies deckt sich mit weiteren Publikationen [125, 130, 146, 149]. Zur genaueren Identifizierung von Treg wird in diesen Studien der konstitutiv exprimierte Transkriptionsfaktor FoxP3 benutzt [101, 125, 148, 150]. Die Arbeitsgruppe um Kleinewietfeld et al. etablierte ferner eine Identifikation von Treg über die Charakterisierung eines CD4+CD25+CD127-CD49d- Phänotyps, der eine bessere Abgrenzung gegenüber CD4+ T-Effektorzellen für funktionelle Analysen ermöglicht [151]. Bis dato konnte in Versuchen nicht ausgeschlossen werden, dass EMT-Effekte, die unter Co-Kultur mit CD4+CD25+ Treg beobachtet wurden, nicht eventuell durch Verunreinigung von aktivierten CD4+ T-Effektorzellen, die ebenfalls CD25 exprimieren können, resultierten. Anhand dieser Diskriminierung konnte die Arbeitsgruppe um Kleinewietfeld eine grenzwertig erhöhte Anreicherung von CD4+CD25+CD127-CD49d- Treg im Blut von PDAC-Patienten gegenüber gesunder Kontrollen zeigen [151]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigten dies [138]. Weiterhin konnte eine leichte Erhöhung von CD4+CD25+ bzw. CD4+CD25+CD127-CD49d- Treg im PDAC-Gewebe gegenüber CP-Gewebe aufgedeckt werden [138]. Neben dieser Treg-Anreicherung konnten aber vor allem CD4+CD25- T-Zellen in hohen Zahlen in der CP und in etwas geringerer Ausprägung im PDAC nachgewiesen werden [137].

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Verteilung von PBMC in der Blutzirkulation von gesunden Spendern bzw. PDAC-Patienten sich nicht zwangsweise unterscheiden muss, damit es zu Differenzen in der Anreicherung der Immunzellen im Pankreasgewebe kommt. So wäre die physiologische Zusammensetzung des Immuninfiltrats der Gewebe für eine exakte funktionelle Analyse der Co-Kulturen wünschenswert, doch ist dies nicht umsetzbar. Gewebeproben von gesunden Spendern sind ethisch nicht vertretbar und das aus Operationen gewonnene Material fällt nur gering aus. So wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen des aus Blut isolierten PBMC-Kollektivs auf die HPDE6c7-Zellen sowie wie mögliche Mechanismen ihrer Anreicherung untersucht. Der Auftrennung der Treg für eine funktionelle Untersuchung kam hierbei keine Relevanz zu.

Die vergleichende Analyse von aktivierten T-Effektorzellen und CD4+CD25+CD127-CD49d- Treg durch Goebel et. al enthüllte jedoch ein aufschlussreiches Ergebnis [137], das auch für diese Arbeit relevant sein kann. T-Effektorzellen wurde eine außerordentliche und bisher nicht betrachtete Rolle in der Induktion der EMT im Pankreasgangepithel/Karzinomzellen nachgewiesen [137]. So zeigten HPDE6c7-Zellen nach Co-Kultur sowohl mit aktivierten CD4+ T-Effektorzellen als auch mit CD4+CD25+CD127-CD49d- Treg EMT-assoziierte Alterationen wie Annahme eines spindelförmigen Phänotypes, eine erhöhte Expression der mesenchymalen Proteine Vimentin und L1CAM sowie eine reduzierte Expression von E-Cadherin einhergehend mit einem verstärktem invasiven Verhalten [137]. Dabei stellten sich diese Veränderungen unter Co-Kultur mit T-Effektorzellen sogar ausgeprägter dar [137]. Die ergänzende immunhistochemische Untersuchung des duktales Pankreasepithels der CP zeigte darüber hinaus EMT-assoziierte Alterationen vor allem in der Nähe eines Stromas mit einer CD4+ T-Zell Anreicherung [137].

Einen zusätzlichen Hinweis für einen protumorigenen Effekt der CD4+ T-Zellen lieferte die Arbeitsgruppe Zhang et al. [152]. Sie demonstrierten, dass es in CD4+ T-Zell-abladierten Mäusen nach induzierter Pankreatitis zwar zur Entwicklung von PanIN kommt, diese allerdings keine Proliferation und Fortschreiten präsentieren, sondern vielmehr durch massive Apoptose aus dem Gewebe entfernt werden [152]. Weiterhin zeigte die Gruppe, dass inhibitorische CD4+ T-Zellen eine CD8+ T-Zell gesteuerte Antitumorantwort, die die PDAC-Karzinogenese verhindern könnte, inhibieren [152]. Dies unterstreicht die Bedeutung von CD4+ T-Zellen in der pankreatischen Tumorgenese.

Ferner wird in neusten Studien ein neuartiger Treg-Subtyp beschrieben, der sich durch eine erhöhte CD69-Expression auszeichnet. CD69 galt bisher vornehmlich als Leukozytenaktivierungsmarker. Neuerdings wird ihm jedoch auch eine immunregulatorische Funktion zugesprochen. Interessanterweise zeigte sich bei der Betrachtung des Aktivierungsmarker CD69 in dieser Arbeit unter den CD4+ T-Zellen eine deutliche Erhöhung unter den PBMC von PDAC-Patienten gegenüber derer gesunder Spender. In einer Mausstudie wurde dieser alternative CD4+CD25-CD69+ T-Zell-Subtyp mit einem FoxP3-negativen Phänotyp beschrieben. Dennoch präsentierte er in Treg-ähnlicher Weise eine erhöhte Sekretion von IL-10 bzw. TGF- β -1 und inhibierte die Proliferation von T-Effektorzellen [107, 138]. Auch unsere Arbeitsgruppe stieß auf diesen regulatorischen CD4+CD25-CD69+ T-Zell-Typ, der bei der Charakterisierung von T-Zellen durch eine Anreicherung in dem Blut und Tumor-Gewebe von PDAC-Patienten auffiel [129]. Weiterführende Untersuchungen bestätigten einen regulatorischen Phänotyp. CD4+CD25-CD69+ T-Zellen stellen somit potente Immunsuppressoren dar [129, 138].

Eine Assoziation zwischen der Akkumulation von CD4+CD25-CD69+ T-Zellen und nodaler Invasion bzw. höheren Tumorgraden sowie maligner Progression in PDAC-Patienten konnte gezeigt werden

[129, 138]. Daneben korreliert die Anreicherung der „klassischen“ Tregpopulation (CD4+CD25+ oder CD4+FoxP3+ Treg) in diversen Tumoren sowie im Blut und Tumorgewebe von PDAC-Patienten ebenfalls mit einer schlechten Prognose [125, 126, 130, 146].

So ist der Mechanismus der Akquirierung dieser immunsuppressiven Zellen in das PDAC-Stroma von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang rückt vor allem das Adhäsionsmolekül L1CAM in den Fokus. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weisen auf ein Zusammenspiel von L1CAM mit unterschiedlichen Entzündungszellen hin. So konnte nachgewiesen werden, dass neben pankreatischen Myofibroblasten auch Makrophagen sowie CD4+ T-Effektorzellen potente Induktoren von L1CAM sowie EMT-assoziiierter Veränderungen sind [73, 129, 137, 138]. Weiterhin fördert eine erhöhte Expression von L1CAM im Gangepithel die Migration bzw. Infiltration von CD4+CD25+CD127-CD49d- Treg in das Pankreas und beeinträchtigt die Proliferation von CD4+ T-Effektorzellen [138]. Ferner unterstützt L1CAM die Generation von immunsuppressiven CD4+CD25-CD69+ T-Zellen durch eine Verringerung der CD25- sowie Erhöhung der CD69-Expression in CD4+ T-Effektorzellen [129, 138]. In Anwesenheit von L1CAM nehmen CD4+ T-Zellen somit einen immunsuppressiven Phänotyp an [138]. In dieser Arbeit konnte eine L1CAM-Expressionszunahme in den HPDE6c7-Zellen unter Co-Kultur mit PBMC gesunder Patienten festgestellt werden. Nach Co-Kultur der HPDE6c7-Zellen der PBMC von PDAC-Patienten dominierte hingegen eine vermehrte TGF- β -1-Expression. TGF- β -1 trägt ebenfalls zur Akkumulation von immunsuppressiven Zellen z.B. durch Konversion von konventionellen T-Zellen zu Treg bei [102]. Darüberhinaus nimmt TGF- β Einfluss auf den Phänotyp von Makrophagen [119]. Diese tragen zusammen mit Treg, Tumorzellen sowie anderen stromalen Zellen wiederum zu einer erhöhten TGF- β -1 Konzentration in CP und PDAC bei [103, 104].

Die Verteilung der CD68+ Makrophagen im Blut von PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten erwies sich in dieser Arbeit als nahezu identisch. Bei der weiteren Charakterisierung anhand von allgemeinen Makrophagenmarkern, CD14 bzw. CD11b, zeigte sich eine geringe Anreicherung in den PBMC von PDAC-Patienten gegenüber gesunden Spendern. Die Einteilung der Makrophagen in M1-(HLA-DR+/CD68+)- bzw. M2-(CD16+/CD68+)-polarisierte Makrophagen zeigte eine minimale Anreicherung des M2-Markers unter PBMC gesunder Spender. Signifikante Unterschiede ließen sich nicht darstellen.

Die Wichtigkeit der Bestimmung beider Makrophagen-Marker ergibt sich aus den Untersuchungen von Helm et al. [123]. So zeigte sich im Rahmen einer ausführlichen immunhistochemischen Untersuchung von Pankreasgewebe von CP- und PDAC-Patienten, dass sich Makrophagen M1- und M2- Charakteristika entgegen bisheriger Annahme teilen. Dementsprechend kommt es auch im PDAC-Gewebe zur Anreicherung eines gemischten Makrophagen-Typs [123]. TAM besitzen somit sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften und repräsentieren potente Induktoren von

EMT in prämaligen und malignen Pankreasgangepithelzellen [73, 123]. Sie tragen außerdem zu einer erhöhten TGF- β -1 Produktion bei. So wirkte sich möglicherweise in dieser Arbeit bereits die dezente Anreicherung von CD11b+ bzw. CD14+ unter den CD68+ Makrophagen der PBMC von PDAC-Patienten auf den Erwerb der EMT-assoziierten Veränderungen in den HPDE6c7-Zellen aus.

In dieser Arbeit demonstrierten PBMC unabhängig von ihrer Herkunft (Blut gesunder Spender bzw. von PDAC-Patienten) eine EMT-fördernde Wirkung unterschiedlicher Ausprägung auf die HPDE6c7-Zellen. In der Zusammenschau mit Ergebnissen anderer Publikationen u.a. von unserer Arbeitsgruppe mehren sich die Hinweise, dass CD4+ T-Zellen, darunter CD69+CD4+ T-Zellen eine zunehmend wichtige Rolle neben den bisher bekannten Hauptpromotoren wie Myofibroblasten, Treg und Makrophagen in der PDAC-Entwicklung eingeräumt werden muss. Aktivierte CD4+ T-Zellen stellen offenbar potente Induktoren der EMT dar und erhöhen darüber die Zellinvasivität in prämaligen und malignen epithelialen Pankreasgangzellen. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus sein, über den CD4+ T-Zellen bereits sehr früh in der Entstehung eines PDAC einen tumorfördernden Einfluss auf das Gangepithel ausüben [137].

5.2 Einfluss von PBMC auf Apoptoseverhalten und Chemoresistenz in Pankreasgangepithelzellen

Gemcitabin gilt als leitliniengerechte Therapie des PDAC. Allerdings sind die Auswirkungen auf Symptome sowie Tumorlast aufgrund ausgeprägter Chemoresistenz gering. Eine verbesserte Therapie des PDAC fordert daher ein verbessertes Verständnis der vielfältigen Prozesse, mit welchen Tumoren chemoresistent werden, um Strategien zu entwickeln, diese Resistenz zu überwinden. Mechanismen, die zur Chemoresistenz in PDAC-Zellen beitragen, beinhalten aberrante Gen-Expressionen, Mutationen, Deregulation von Schlüsselsignalwegen, EMT sowie die Präsenz hochresistenter Krebsstammzellen [94]. In dieser Arbeit wurde vornehmlich die ausgeprägte Chemoresistenz im Zusammenhang mit EMT analysiert. EMT ist nachweislich mit einem verminderten Überleben im PDAC assoziiert [82].

Die Apoptosensitivität wurde in dieser Arbeit mittels M30 Assay detektiert. In Gegenwart von PBMC gesunder Spender konnte eine deutliche (knapp nicht signifikante ($p=0,056$)) Erhöhung der Konzentration des Zytokeratin-18-Neoepitops nach Stimulation mit Gemcitabin gegenüber der monokultivierten HPDE6c7-Zellen beobachtet werden (mono: 1,67 / co PBMC^{Ges}: 2,50). Im Gegensatz dazu wurde in Überständen von HPDE6c7-Zellen nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten eine geringere Konzentration des Neoepitops gegenüber der monokultivierten HPDE6c7-Zellen detektiert

(mo: 2,50/co PBMC^{PDAC} 2,23). PBMC gesunder Spender und von PDAC-Patienten haben daher offenbar einen unterschiedlichen Einfluss auf das Apoptoseverhalten und die Sensitivität gegenüber Gemcitabin. Es stellt sich die Frage, welcher Mechanismus zu der gesteigerten Apoptoseresistenz in den HPDE6c7-Zellen nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten beiträgt.

So zeigten sich die Treg, die bekanntermaßen zu Chemoresistenz beitragen, in ihrer Gesamtzellzahl unter den PBMC von PDAC-Patienten kaum erhöht. Vermehrt wurden CD69+ sowie CD45RO+ CD4+ T-Zellen unter den PBMC von PDAC-Patienten gefunden. Auch die Makrophagen wiesen anhand der Charakterisierung von CD11b und CD14 eine leichte Erhöhung unter den PBMC von PDAC-Patienten auf. Weiterhin manifestierte sich in der Analyse der B- und NK-Zellen eine tendenziell gesteigerte Anreicherung unter den PBMC aus dem Blut von PDAC-Patienten gegenüber gesunder Spender.

Es ist bisher wenig bekannt über die Verteilung von NK- und B-Zellen sowie deren Einfluss auf EMT bzw. Chemoresistenz im PDAC. Eine reduzierte NK-Zellzahl wird in der Literatur mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium [153], eine NK-Zellanreicherung mit einem verbesserten Überleben assoziiert [154]. Die Rolle der B-Zellen in der Tumorprogression ist nicht eindeutig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass sich in Abwesenheit von B-Zellen eine verstärkte T-Zell-Antitumorantwort etabliert. Darüberhinaus konnte ein Zusammenhang zwischen Proliferation von Treg und B-Zell-Infiltration hergestellt sowie ein Einfluss von B-Zellen auf die TAM-Funktion verzeichnet werden [155]. B-Zellen weisen ein komplexes Zusammenspiel mit anderen Immunzellen auf und sind möglicherweise ein wichtiger Mitspieler, der an der Entwicklung von EMT sowie Ausbildung einer Chemoresistenz beteiligt ist.

Es ist bekannt, dass eine Gemcitabinresistenz in PDAC-Zellen mit der Ausbildung eines aggressiveren und invasiveren Phänotypes einhergeht [61, 80]. Arumugam et al. zeigten, dass PDAC-Zelllinien mit EMT-Charakteristika resistent gegenüber konventioneller Chemotherapie (Gemcitabin, 5-FU, Cisplatin) sind [54]. Ein zentraler Mechanismus der EMT stellt der Verlust des epithelialen Markers E-Cadherin dar. So zeigen chemosensitive Pankreaszelllinien eine starke E-Cadherin-Expression, während resistente Pankreaszelllinien eine hohe Expression der mesenchymalen Marker Vimentin und ZEB-1 aufweisen [61, 80]. Bei der immunhistochemischen Färbung von chirurgisch reseziertem PDAC-Gewebe konnte eine erhöhte Vimentin- bzw. eine verringerte E-Cadherin-Expression mit vermindertem Überleben korreliert werden [82]. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Stilllegung des transkriptionellen Repressors von E-Cadherin, ZEB-1, in mesenchymalen Zelllinien nicht nur zu einer verstärkten E-Cadherin-Reexpression, sondern auch zur Hochregulation anderer epithelialer Marker und einer wieder hergestellten Chemosensitivität führt [54].

In dieser Arbeit fiel bei Betrachtung des epithelialen Markers nach Co-Kultur mit PBMC gesunder Spender eine verringerte Expression auf, während nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten eine verstärkte E-Cadherin Expression zu verzeichnen war. Weiterhin wurde eine ausgeprägte Expression des mesenchymalen Markers Vimentin unter Co-Kultur mit PBMC gesunder Spender gefunden, jedoch weniger ausgeprägt nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten. So kann in den HPDE6c7-Zellen nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten bzw. gesunder Spender zwischen der Expression dieser EMT-Marker und dem Apoptoseverhalten nach Gemcitabinbehandlung kein eindeutiger Zusammenhang hergestellt werden.

Entsprechend der parallelen Hochregulation mesenchymaler Marker im Rahmen der EMT wies L1CAM auf mRNA-Ebene ein ähnliches Expressionsmuster wie Vimentin auf [156]. Unsere Arbeitsgruppe demonstrierte bereits den Zusammenhang einer gesteigerten L1CAM-Expression mit einer Verstärkung der Tumorigenität, Invasivität, und Apoptoseresistenz von Epithel- bzw. Karzinomzellen während der Tumorprogression [70, 71, 123, 157]. Auch in *in vivo* Untersuchungen zeigte sich, dass L1CAM-überexprimierende HPDE6c7-Zellen eine erhöhte Tumorigenität und ein höheres Metastasierungspotential gegenüber der Kontrollzellen besitzen [76]. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Apoptoseschutz / Chemoresistenz und einer gesteigerten L1CAM-Expression hergestellt werden, was der kleinen Größe bzw. der Heterogenität des Patienten- bzw. Probandenkollektivs geschuldet sein mag.

Im Gegensatz dazu zeigte TGF- β -1 eine Expressionsverstärkung unter den HPDE6c7-Zellen, die mit PBMC von PDAC-Patienten co-kultiviert wurden und eine verstärkte Chemoresistenz aufwiesen. In der Literatur werden hohe TGF- β -Spiegel mit einer Therapieresistenz assoziiert [110, 158]. Dazu trägt unter anderem seine profibrotische Eigenschaft bei [159], die u.a. ein mechanisches Hindernis für die Medikamentenzufuhr etabliert. Radio- und Chemotherapie induzieren und fördern ihrerseits wiederum TGF- β -1-Aktivität und Metastasierung [159].

Daneben hängt die Ausbildung von Chemoresistenz vieler Tumore von der konstitutiven Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ab, der in dieser Arbeit nicht Untersuchungsgegenstand war. Verschiedenste Studien zeigen, dass dessen konstitutive Aktivierung in diversen Tumorentitäten, so auch im PDAC, mit Apoptose- und Chemoresistenz sowie einem malignen Phänotyp assoziiert ist [160-163]. Für die Aktivierung von NF- κ B sowie der Vermittlung von Chemoresistenz scheint IL-1 β unentbehrlich [162, 164-166]. Die Inhibition von NF- κ B mittels IL-1 β -Signaltransduktion verstärkt signifikant die Sensitivität von PDAC-Zellen gegenüber Chemotherapie *in vitro* und *in vivo* [162, 167]. Darüber hinaus stellt IL-1 β den Link zwischen NF- κ B und dem Adhäsionsmolekül L1CAM her. IL-1 β ist ein Induktor von L1CAM [166]. L1CAM wiederum fördert in einem Integrinabhängigen Prozess die Hochregulation der IL-1 β -Expression in PDAC-Zellen [166] und verstärkt so ebenfalls die NF- κ B-

Aktivierung [156]. Dies resultiert über vielfältige Wege in verstärkter Invasivität, Motilität [156] und Chemoresistenz der Zellen.

Zusammenfassend ist folgendes Szenario *in vivo* bzw. im Patienten unter der Mitwirkung verschiedenster Stromazellen denkbar, worüber das Stroma zur Ausbildung von EMT und Chemoresistenz im PDAC beiträgt. Während einer pankreatischen Inflammation unterschiedlicher Genese (CP, altersbedingt, alkoholinduziert) kommt es durch infiltrierende CD4⁺ T-Effektorzellen über TNF- α und IL-6-Sekretion zusammen mit einem Anstieg der L1CAM-Expression zur Manifestation von EMT und Chemoresistenz in den dukalen Epithelzellen [137]. L1CAM wiederum verringert die Proliferation von T-Effektorzellen und unterstützt gleichzeitig die Anreicherung der verschiedenen Treg-Subtypen, die zu einer immunsuppressiven Mikroumgebung durch TGF- β -1-Sekretion beitragen. Neben immunregulatorischer Funktionen unterstützt TGF- β -1 über EMT sowie gesteigerter Chemoresistenz die PDAC-Initiation bzw. -progression und trägt zur weiteren Treg-Anreicherung bei.

5.3 Neue Möglichkeiten der PDAC-Therapie

Die aktuellen Behandlungsstandards des PDACs stellen keine zufriedenstellende Therapieoption dar. Erkenntnisse aus Untersuchungen neuer potentieller Ziele (Tumor-assoziiertes Stroma, Immunsystem) können Ansätze liefern, die Hemmung der Tumorprogression-unterstützenden Inflammation oder die Modulation des protektiven fibrotischen Stromas zu erreichen [87]. So können Immunzellen selbst als Zielstruktur dienen. Die Immuntherapie solider Tumoren stellt allerdings eine große Herausforderung dar. Im PDAC erweisen sich vor allem ausgeprägte Toleranzmechanismen seitens der Tumorzellen sowie die Ausbildung eines immunsuppressiven Milieus, zu der eine erhöhte Treg-Zahl [125, 130, 133, 168] und verstärkte Expression regulatorischer Moleküle beitragen [169], als Hürde in der Aktivierung einer Tumorspezifischen Immunantwort [168].

Erste Studien mit Treg als Zielstruktur sind gescheitert, was u.a. durch die unvollständige Eliminierung bedingt durch die Vielfalt von akkumulierten Treg erklärt werden kann [108]. So wurde der erst kürzlich identifizierte CD4⁺CD25⁺CD69⁺FoxP3⁺ T-Zellsubtyp in diesen Studien nicht erfasst, die ursächlichen Mechanismen der Anreicherung (z.B. erhöhte L1CAM-Expression) nicht behoben oder die Konversion von T-Zellen in Treg nicht verhindert [108]. Neuste Therapieansätze visieren daher regulatorische Moleküle, sogenannte *Imm checkpoints*, an. Diese dämmen die Antitumorimmunität der T-Zellen ein [170-173]. Dazu zählen die inhibitorischen Lymphozytenrezeptoren wie *programmed cell death protein 1* (PD-1) und *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4). Eine CTLA-4-Expression wird auf T-Effektorzellen, aber insbesondere

auf Treg gefunden [174]. So führt die CTLA-4-Blockade in murinen Tumormodellen zu einer Inhibition der negativen Signale in T-Effektorzellen und einer Elimination bzw. Depletion der Treg [175-177]. Monoklonale Antikörper, die PD-1 bzw. dessen Ligand PD-L1 oder CTLA-4 blockieren, induzieren so eine T-Zell abhängige Tumorregression in vielen experimentellen Systemen [172, 173]. Auch in klinischen Studien konnten erstaunliche Tumorregressionen in diversen Tumorentitäten, primär jedoch in immunogenen Tumoren wie dem Malignen Melanom beobachtet werden [178-185]. Als Monotherapie des metastasierten und fortgeschrittenen PDACs blieben die Erfolge bisher jedoch aus [186-189]. Kombinatorische Strategien (anti-CTLA-4 oder anti-PD1 plus Chemotherapeutika) zeigten im fortgeschrittenen Malignen Melanom ein verbessertes Ansprechen [190].

Dieser Erfolg ließ sich allerdings nicht auf den Großteil der Patienten anderer Tumorentitäten übertragen [190]. Das PDAC unterscheidet sich zu hoch immunogenen Tumoren durch eine deutlich geringere Tumordinfiltration von CD8+ T-Zellen [125, 131, 191, 192] und ein ausgeprägtes Stroma mit immunsuppressiv wirkenden Myofibroblasten. Dabei deuten verschiedene Studien im PDAC-Mausmodell auf eine ausgeprägte Sensitivität der PDAC-Tumoren gegenüber der T-Zell-Zytotoxizität hin [193]. Allerdings wird eine verminderte immune Erkennung bzw. eine schwache Induktion der T-Zell-Immunität für ein Versagen der *Immunecheckpoint* Therapien verantwortlich gemacht. Aus einem weiteren Grund könnte sich die CTLA-4-Blockade schwierig gestalten. Denn neben einer Depletion von Treg führt sie zu einer Stimulation von T-Effektorzellen. Wie Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, gelten T-Effektorzellen als potente EMT-Induktoren und könnten darüber entscheidend zur PDAC-Tumorprogression beitragen [137]. Ein Überwiegen dieses protumorigenen Effektes gegenüber der Ausschaltung des immunsuppressiven Einflusses würde folglich die Tumorprogression eher beschleunigen als hemmen.

Makrophagen, die den Großteil des PDAC-Immuninfiltrats darstellen, bieten sich ebenfalls als Zielzellen an. In einer Studie konnten vereinzelte klinische Antworten auf die kombinatorische Therapie eines CD40-Agonisten und Gemcitabin in PDAC-Patienten beobachtet werden [194]. CD40 diente dabei der Stimulation zur Entwicklung eines proinflammatorischen M1-Phänotyps. Es zeigte sich eine Tumordinfiltration mit CD40-aktivierten Makrophagen, die zur Depletion des Tumorstromas führte [194, 195]. Allerdings wies die Makrophagenpolarisierung kein Vorteil für das Überleben der Patienten gegenüber einer Monotherapie mit Gemcitabin auf. Neueste Therapieansätze zielen daher auf die komplette Elimination des M1- und M2-Makrophagenmischtypes ab. Das bereits in der Therapie des Sarkoms eingesetzte Chemotherapeutikum Trabectedin wirkt z.B. durch die Auslösung von Apoptose in allen Makrophagen. In Mausmodellen konnte eine signifikante Reduktion der Tumor-infiltrierenden Monozyten und der Tumolvaskularisierung nachgewiesen werden.

Trabectedin scheint daher auch für das PDAC eine erfolgsversprechende Therapieoption darzustellen [196].

In einer aktuellen Studie von Winograd et al. wird im Mausmodell mit spontanem PDAC ein Antitumoreffekt durch eine kombinatorische Therapie aus Chemotherapie und verschiedenen Antikörpern, wie anti-CD40, anti-PD-1 und anti-CTLA-4, postuliert. Die Grundlage dazu stellt die Bewältigung der immunologischen Begünstigungen des PDAC [174]. So spielt CD40 auch in der Entwicklung der T-Zell-abhängigen Antitumorimmunität eine Rolle. Die Förderung der Antigenpräsentation ist die Voraussetzung zum tumorspezifischen T-Zell *Priming* und der T-Zell-Aktivierung [197-202]. Die Kombination eines anti-CD40 Antikörpers mit einem Chemotherapeutikum soll die Widerstandsfähigkeit gegenüber Checkpointinhibitoren im PDAC überwinden. Im Mausmodell konnte die Regression von subkutanen Tumoren sowie verbessertes Gesamtüberleben gezeigt werden [174]. Klinische Studien sind in Planung.

Neben den Immunzellen kommt den Botenstoffen eine fundamentale Bedeutung in der Manifestation und Progression von Tumoren zu. In dieser Arbeit präsentierte sich eine erhöhte TGF- β -Expression in HPDEc6c7 Zellen nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC-Patienten. Ein erhöhter TGF- β -Spiegel gilt als negativer prognostischer Indikator im PDAC und bietet sich daher als attraktives Ziel an [203]. Allerdings ist die klinische Applikation von pharmazeutischen TGF- β -Inhibitoren herausfordernd [203]. Die TGF- β -vermittelten Signalwege sind komplex und resultieren in Abhängigkeit von ihrem Kontext in Zeit, Raum und Mikroumgebung in sowohl pro- also auch antitumoralen Aktivitäten in Epithel-/Karzinomzellen [159].

Die direkte Neutralisation von TGF- β führte beispielsweise zur Tumorprogression in genetischen PDAC-Mausmodellen [203]. Eine differenziertere Neutralisierung mittels monoklonalen Antikörper, gegen den murinen TGF- β -2-Rezeptor, zeigte eine potente antimetastatische Aktivität in präklinischen PDAC-Modellen [203]. Dabei ließ sich eine Reduktion von aktivierten Fibroblasten, Kollagenablagerungen und der Mikrogefäßdichte feststellen [203]. Dies resultierte in einer epithelialen Differenzierung der Tumorzellen mit potenter Reduktion der Metastasierung [203]. Weiterhin ermöglichen diese Stroma-spezifischen Veränderungen eine verbesserte Medikamentenzufuhr [159]. Somit könnte die kombinatorische TGF- β -Inhibition mit konventioneller Therapie zu einer verstärkten Tumorsensitivität gegenüber Chemo- und Radiotherapie beitragen [158]. Daneben wäre die Therapie von TGF- β -Inhibitoren zusammen mit Immuntherapeutika eine Option zur Wiederherstellung der zytotoxischen Lymphozytenaktivität [91, 158]. Eine Potenzierung der Effekte von *Immunecheckpoint* Therapeutika durch TGF- β -Inhibitoren wäre ebenfalls vorstellbar.

In der Ausbildung von Chemoresistenz und Zellwachstum/-migration der Tumorzellen nimmt auch L1CAM eine vielfältige Rolle ein [70, 204-206]. Eine hohe L1CAM-Expression im PDAC kann mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und schlechter Prognose assoziiert werden [68, 70, 71, 76, 91, 138, 157, 204]. Ferner konnte eine Verbindung zwischen L1CAM-Expression und Schmerz hergestellt werden [68], sodass es sich als optimale Zielstruktur, um in verschiedene Tumor-assoziierten Phänomene einzugreifen, anbietet [74]. Somit würde L1CAM in zweifacher Hinsicht als Zielstruktur für neuartige Therapeutika dienen. Einerseits über seine Bedeutung in der Tumorprogression, andererseits durch seine Bedeutung bei Tumor-assoziierten Schmerzen. Erfolgsversprechend erscheinen therapeutische Optionen, bei denen L1CAM als Zielstruktur mit anderen therapeutischen Verfahren (z.B. Chemo-/Radiotherapie) kombiniert wird [74, 75]. Ein chemosensitivierender Effekt von PDAC-Zellen mittels L1CAM-Blockade konnte bereits in präklinischen Modellen gezeigt werden [74, 75].

Ein vielversprechender Ansatz und einen Link zwischen Immunzellen und ihren Botenstoffe zeigte sich in Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Goebel et al. [137]. Hohe Konzentrationen von TNF- α und IL-6 wurden v.a. in den Überständen von Co-Kulturen aus Pankreasgangepithelzellen und aktivierten CD4+ T-Effektorzellen nachgewiesen [137]. Eine Neutralisierung von TNF- α durch Etanercept *in vitro* konnte zu einer effektiven Reversion EMT-assoziiierter Alterationen in co-kultivierten HPDE6c7-Zellen führen [137]. Ein ähnlicher Effekt wurde weniger ausgeprägt bei Neutralisierung von IL-6 mittels Tocilizumab (anti-IL-6R Antikörper) beobachtet [137]. In Einklang damit wurde in einem orthotopen PDAC-Xenograft-Mausmodell mit abladierten T-Zellen gezeigt, dass der anti-TNF- α Antikörper Infliximab potent Metastasierung reduziert [207]. Daneben wurde über eine TNF- α -Blockade mittels NF- κ B-Hemmung eine verminderte Invasivität der PDAC-Zellen erzielt [207]. In einer Phase I/II-Studie konnte durch die kombinatorische Therapie von Etanercept und Gemcitabin von Patienten im fortgeschrittenen PDAC-Stadium zwar die Verträglichkeit der Medikation gezeigt werden, allerdings ließ sich keine signifikante Verbesserung gegenüber der Gemcitabinmonotherapie aufweisen [208]. Möglicherweise ist der Einsatz von Kombinationstherapien in früheren Krankheitsstadien erfolgreicher.

Bei einem solch malignen Tumor wie dem PDAC sind immunologisch basierte Strategien als Monotherapie wahrscheinlich nicht effektiv, weswegen sie in Kombination mit anderen Therapiestrategien wie Operation, Chemo-/ Radiotherapie eingesetzt werden müssen.

Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) zählt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8 % zu den bösartigsten Tumoren. Durch die frühzeitige Metastasierung sowie ausgeprägte Chemoresistenz stellt es noch heute eine infauste Prognose dar. Ein wichtiger Mechanismus dabei ist die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT), bei der epitheliale Zellen die Charakteristika von beweglicheren mesenchymalen Zellen annehmen. Unterstützt wird die EMT durch ein inflammatorisches nicht-neoplastisches Stroma, zu dem diverse Immunzellen zählen. So geht die Anreicherung von Makrophagen, regulatorischen T-Zellen und T-Effektorzellen im PDAC-Stroma einher mit einer niedrigeren Lebenserwartung der Patienten. Diese Arbeit hat einen Beitrag dazu geleistet, den Einfluss von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) auf das duktales Pankreasgangepithel zu untersuchen, um ein besseres Verständnis über die frühen Veränderungen in der pankreatischen Tumorgenese zu erhalten. Dabei wurden Hinweise darüber erarbeitet, ob es Unterschiede zwischen PBMC von gesunden Individuen und PDAC-Patienten gibt. Dafür wurde die Pankreasgangepithelzelllinie HPDE6c7 in An- und Abwesenheit mit PBMC von je 5 gesunden Spendern oder PDAC-Patienten in direkter Co-Kultur für 72 Stunden co-kultiviert. Anschließend erfolgte die Untersuchung auf Tumor-assoziierte Veränderungen wie dem EMT-Status und des apoptotischen Ansprechens auf eine Gemcitabinbehandlung. Parallel wurde die Prävalenz und der Phänotyp der PBMC durchflusszytometrisch charakterisiert. Unter Co-Kultur erwarben die epithelialen Zellen in Gegenwart der PBMC beider Kollektive einen mesenchymalen Phänotyp, der sich in einer spindelförmigen Zellform sowie in einer gesteigerten Expression der mesenchymalen Marker L1CAM, Vimentin und TGF- β auf RNA- und Proteinebene nachweisen ließ. Im M30 Apoptoseassay fiel nach Co-Kultur mit PBMC von PDAC Patienten eine herabgesetzte Sensibilität gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabin in den HPDE6c7-Zellen auf. Darüber hinaus ließen sich bei der Analyse des Phänotypes der PBMC deutliche Abweichungen in der Anreicherung der verschiedenen Zelltypen zwischen beider PBMC Kollektive feststellen. Insgesamt untermauern die in der vorgelegten Arbeit präsentierten Ergebnisse die Hypothese, dass die im Tumorstroma angereicherten Immunzellen nicht nur eine immunmodulierende Komponente während der Tumorigenese sind, sondern vielmehr eine direkte protumorigene Rolle in der Entwicklung epithelialer Tumore einnehmen. Hauptpromotoren der PDAC-Progression scheinen neben regulatorischen T-Zellen, Myofibroblasten und Makrophagen auch T-Effektorzellen darzustellen. Zur vollständigen Klärung der Rolle von Immunzellen, der von ihnen genutzten Signalwege bzw. ihrer Interaktion mit anderen Zellen genutzten Botenstoffe sind weiterführende Untersuchungen in größeren Kollektiven notwendig. Eine genaue Analyse und Übersicht des Zusammenspiels aller beteiligten Immunzellen schafft die Voraussetzung für effektive immunbasierte Antitumorthérapien.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetisches Progressionsmodell des PDAC:	3
Abbildung 2: Versuchsaufbau von Mono- und Co-Kulturen aus HPDE6c7-Zellen und PBMC	30
Abbildung 3: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der HPDE6c7-Zellen in Mono- und Co-Kultur mit PBMC ^{Ges} / ^{PDAC}	40
Abbildung 4: RNA-Expressionsanalyse von A.) E-Cadherin, B.) L1CAM, C.) TGF- β -1 und D.) Vimentin mittels <i>rtPCR</i>	41
Abbildung 5: Proteinexpressionsanalyse von A.) L1CAM, B.) E-Cadherin, C.) Vimentin und D.) Hsp90 der HPDE6c7-Zellen mittels Westernblot.....	43
Abbildung 6: Apoptosesensitivitätsanalyse der HPDE6c7-Zellen in Mono- und Co-Kultur mit PBMC ^{Ges} / ^{PDAC} mittels M-30 Assay	45
Abbildung 7: Phänotypische durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellen von PBMC ^{Ges} / ^{PDAC} mittels folgender Marker A.) CD3, B.) CD8, C.) CD4 und D.) CD25.....	48
Abbildung 8: Phänotypische durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zell-Aktivierung von PBMC ^{Ges} / ^{PDAC} mittels folgender Marker A.) CD69 und B.) CD45RO in CD4+ T-Zellen und C) CD 45RO in regulatorischen CD25+CD4+ T-Zellen	50
Abbildung 9: Phänotypische durchflusszytometrische Charakterisierung der Monozyten von PBMC ^{Ges} / ^{PDAC} mittels folgendem Marker A.) CD68	51
Abbildung 10: Phänotypische durchflusszytometrische Charakterisierung der Monozyten von PBMC ^{Ges} / ^{PDAC} mittels folgender Marker A.) CD14, B.) CD11b, C.) CD16 und D.) HLA-DR	52
Abbildung 11: Phänotypische durchflusszytometrische Charakterisierung der B- und NK-Zellen von PBMC ^{Ges} / ^{PDAC} mittels folgender Marker: A.) CD19 und B.) CD16 und CD56.	53

Abkürzungsverzeichnis

Physikalische Einheiten wurden mit dem internationalen SI (Système international d'unités)- Einheiten abgekürzt und werden im Abkürzungsverzeichnis nicht weiter erläutert.

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BHLH	<i>Basic helix-loop-helix = Twist</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2, early-onset</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCK 18	Caspase cleaved keratin 18 = K18-Asp396
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) = Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1)</i>
CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)= Macrophage Inflammatory Protein-3 (MIP3A)</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>

CIS	<i>Carcinoma in Situ</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Chronische Pankreatitis
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPC4	SMAD4, Tumorsuppressorgen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
5-FU	5-Fluoruracil
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FPC	<i>Familial pancreatic cancer</i>
FoxC2	<i>Forkhead box protein C2</i>
FoxP3	<i>Forkhead-box-protein P3</i> : Transkriptionsfaktor von Treg exprimiert
HBOC	Familiäres Mamma-und Ovarialkarzinom
HER-2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor-1α</i>
HLA-DR	<i>Human leucocyte antigen-DR</i>
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolorektales Karzinom
HPDE6c7	Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie 6c7
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KRAS	<i>Kirsten ras oncogene</i>
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
MAPkinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte chemotactic Protein
MET	Mesenchymal-Epitheliale-Transition
MHC-I/-II	<i>Major histocompatibility complex –I/-II</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NK- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NO	<i>Nitric oxid</i> (Stickstoffmonoxid)
P16	CDK-Inhibitor 2A
PAA	Polyacrylamid
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie

PBMC	Periphere mononukleare Blutzellen
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PD-1	<i>Programmed 71ell death protein 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> (Duktales Pankreasadenokarzinom)
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i> oder <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNI	<i>Reactive nitrogen intermediate</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Medium, benannt nach <i>Roswell Park Memorial Institut</i>
RtPCR	<i>Realtime Polymerase chain reaktion</i>
α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
SA	Standardabweichung
SIP1	<i>Smad interactin protein-1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAD	<i>Small body size mothers against decapentaplegic</i>
Strept-PerCP5.5	Streptavidin PerCP-Cyanine5.5
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TCR	T-Zell Rezeptor
Temed	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
T β RI/II	<i>Transforming growth factor, beta receptor I/II</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor -alpha</i>
Tp53	Tumorsuppressorgen 53
Treg	Regulatorische T-Zellen
Tween	<i>Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZEB-1	<i>Zinc finger E-Box-binding Homeobox-1</i>
ZEB-2	<i>Zinc finger E-box-binding-protein</i>
ZO-1	<i>Zonula Occludens Protein 1</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht EMT-assoziiierter Veränderungen in Epithelzellen, modifiziert nach [17, 23]	6
Tabelle 2: Primärantikörper für den Westernblot	24
Tabelle 3: Sekundärantikörper für den Westernblot	24
Tabelle 4: Antikörper der Durchflusszytometrie	24
Tabelle 5: Antikörper zur Bestimmung der Gesamtzellzahl	25
Tabelle 6: Primer für die Echtzeit Polymerasekettenreaktion	25
Tabelle 7: Humane pankreatische duktales Epithelzelllinie	25
Tabelle 8: Rezepturen.....	27

Literaturverzeichnis

- [1] Bundes-Gesundheitsberichterstattung (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010 9. Ausgabe.
- [2] Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J (2008) Gastroenterologie, das Referenzwerk für Klinik und Praxis, Band2: Leber, Galle, Pankreas. Georg Thieme Verlag KG.
- [3] Hiddemann, Huber, Bartram (2004) Die Onkologie: Solide Tumoren, Lymphome, Leukämien. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [4] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, deutsche Krebshilfe, WEMF): S3-Leitlinie zum Exokrinen Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013: 1-136.
- [5] Pfeifer B, Preiß J, Unger C (2006) Onkologie, Konventionelle und komplementäre Therapie. 1. Auflage Elsevier GmbH, München.
- [6] Grover S & Syngal S (2010) Hereditary Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 139: 1076-1080.
- [7] Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH (2013) Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA Cancer J Clin.* 63 (5): 318-348.
- [8] Riede UN, Werner M, Schaefer HE (2004) Allgemeine und spezielle Pathologie 5. Auflage. Georg Thieme Verlag.
- [9] Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH (2005) Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol*; 12:81–91.
- [10] Maitra A & Hruban RH (2008) Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3: 157-188.
- [11] Hruban RA, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000) Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2969-2972.
- [12] Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH (1998) Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 22:163–69.
- [13] Hay ED (1968) Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In: Fleischmajer R, Billingham RE, editors. *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. Williams and Wilkins; Baltimore. 31–55.
- [14] Thiery JP & Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Rev, Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- [15] Greenburg G & Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95: 333-339.
- [16] Yang J & Weinberg RA (2008) Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.
- [17] Maier HJ, Wirth T, Beug H (2010) Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Cancers* 2: 2058-2083.

- [18] Kalluri R and Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-1784.
- [19] Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20: 1218-1249.
- [20] Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442-454.
- [21] Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW (2007) Epithelial-Mesenchymal and Mesenchymal-Epithelial Transitions in Carcinoma Progression. *J. Cell Physiol.* 213, 374-383.
- [22] Peinado H, Poritillo F, Cano A: Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48:365-375.
- [23] Kalluri R & Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J.Clin.Invest.* 119: 1420-1428.
- [24] Huber MA, Kraut N, Beug H, (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548-558.
- [25] Polyak K & Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273.
- [26] Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D (2009) Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir* 64: 489–500.
- [27] Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM, (2001) Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61: 4222-4228.
- [28] Heldin CH, Landström M and Moustakas A (2009) Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 21: 166-176
- [29] Massagué J (2008): TGF β in Cancer. *Cell* 25: 1215-230
- [30] Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kimura K, Kanno A, Masamune A, Shimosegawa T (2007) Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *J Cell Physiol* 213: 768-774
- [31] Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype. *Nat Rev Cancer* 7: 415-428.
- [32] Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83.

- [33] Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-89.
- [34] Vernon AE, LaBonne C (2004) Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol* 14: R719-R721.
- [35] Comijn J, Bex G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7: 1267-1278.
- [36] Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Bex G, Cano A, Beug H, Foisner R (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24: 2375-2385.
- [37] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890.
- [38] Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K and Weinberg RA (2005) The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70: 291–297.
- [39] Yang J, Mani SA and Weinberg RA (2006) Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 66: 4549–4552.
- [40] Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10069–10074.
- [41] Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715.
- [42] Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA (2006) The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18969–18974.
- [43] Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M and Kamata N (2006) Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 28: 487–496.
- [44] Jechlinger M, Grunert S and Beug H (2002) Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 415–432.
- [45] Shi Y and Massague J (2003) Mechanisms of TGFbeta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685–700.

- [46] Medici D, Hay ED and Olsen BR (2008) Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factorbeta3. *Mol Biol Cell* 19: 4875–4887.
- [47] Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K (2008) Snail is required for TGF {beta}-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* 121: 3317–3324.
- [48] De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G (2008) Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 130: 481–494.
- [49] Natalwala A, Spychal R, Tselepis C (2008) Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterology* 14: 3792-3797.
- [50] Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E, Birchmeier W (1995) Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene* 11: 475-484.
- [51] Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Aitra N, Bailey JM, McAllister F, Reicher M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, z. Stanger B (2012) EMT and Dissemination Precede Pancreatic tumor Formation. *Cell* 148: 349-261.
- [52] Rhim AD, Thege FI, Santana SM, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, Maggs LR, Kochman ML, Ginsberg GG , Lieb JG, Chandrasekhara V, Drebin JA, Ahmad N, Yang Y-X, Kirby BJ and Stanger BZ (2014) Detection of Circulation Pancreas Epithelial Cells in Patients With Pancreatic Cystic Lesions. *Gastroenterology* 146: 647-651.
- [53] von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid RM, Schneider G, Saur D (2009) E-Cadherin Regulates Metastasis of Pancreatic Cancer In Vivo and Is Suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 Repressor Complex. *Gastroenterology* 137: 361–371.
- [54] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W (2009) Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic Cancer. *Cancer Res* 69: 5820–8.
- [55] Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz H (2007) Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13: 4769-4776.
- [56] Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19: 156-172.

- [57] Geng MM, Ellenrieder V, Wallrapp C, Muller-Pillasch F, Sommer G, Adler G, Gress TM (1999) Use of representational difference analysis to study the effect of TGFB on the expression profile of a pancreatic cancer cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 70-79.
- [58] Song J (2007) EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell Res* 17: 289–290.
- [59] Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, Parmigiani G, Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Eshleman JR, Goggins M, Jaffee EM, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Cameron JL, Olin K, Schulick R, Winter J; Herman JM, Laheru D, Klein AP, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Hruban RH (2009) SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 15: 4674-4679.
- [60] Zeisberg M & Neilson EG: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J.Clin. Invest.* 119:1429-1437 (2009)
- [61] Shaah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE (2007) Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol.* 14:3629-37
- [62] Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927–939.
- [63] Domagala W, Lasota J, Dukowicz A, Markiewski M, Striker G, Weber K, Osborn M (1990) Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas. *Am J Pathol* 137: 1299–1304.
- [64] Handra-Luca A, Hong S-M, Walter K, Wolfgang C, Hruban R and Goggins M (2011) Tumor epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas. *BJC* 104: 1296-1302
- [65] Domagala W, Yumli;niak L, Lasota J, Weber K, Osborn M (1990) Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* 137: 1059–1064.
- [66] Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner P, Herman JM, Swartz MJ, Hsu CC, Winter J, Pawlik TM, Sugar E, Robinson (1993) Vimentin expression in benign and malignant breast epithelium. *J Clin Pathol* 46: 441–445.
- [67] Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y (2008) Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct* 26: 571–577.
- [68] Ben Q-W, Wang J-C, Liu J, Zhu Y, Yuan F, Yao WY, Yuan YZ (2010) Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 38: 1-12.

- [69] Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO j* 3: 1-10.
- [70] Geismann C, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, Arlt A, Tsao MS, Bachem MG, Altevogt P, Sipos B, Fölsch UR, Schäfer H, Mürköster SS (2009) Up-regulation of L1CAM in Pancreatic Duct Cells is Transforming Growth Factor β 1- and Slug-Dependent: Role in Malignant transformation of Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 69: 4517-4526.
- [71] Sebens Mürköster S, Werbing V, Sipos B, Debus MA, Witt M, Grossmann M, Leisner D, Kötteritzsch J, Kappes H, Klöppel G, Altevogt P, Fölsch UR, Schäfer H (2007) Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene* 26: 2759-2768.
- [72] Huszar M, Moldenhauer G, Gschwend V, Ben-Arie A, Altevogt P, Fogel M. (2006) Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. *Human Pathol* 37: 1000-1008.
- [73] Helm O, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg HH, Wesch D, Sebens S (2014) Comparative Characterisation of Stroma Cells and Ductal Epithelium in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 9 (5): e94357.
- [74] Bergmann F, Wandschendier F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B, Welsch T, Schirmacher P, Klöppel G, Altevogt P, Schäfer H, Sebens Mürköster S (2010) Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 24: 909-915.
- [75] Schäfer H, Dieckmann C, Korniienko O, Moldenhauer G, Kiefel H, Salnikov A, Krüger A, Altevogt P, Sebens S (2012): Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma. *Cancer Lett* 319: 66-82.
- [76] Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts J-H, Korniienko O, Kiefel H, Moldenhauer G, Bachem MG, Kalthoff H, Altevogt P, Sebens S (2012): Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. *Carcinogenesis* 33: 84–93.
- [77] Fogel M, Gutwein P, Mechtersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P (2003) L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362: 869–75.
- [78] Fogel M, Mechtersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P, Gutwein P (2003) L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 189 (2): 237–47.

- [79] Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A (2005) L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168 (4): 633–42.
- [80] Li Y, VandenBoom TG II, Kong D, Wang Z, Ali S, Philip PA, Sarkar FH (2009) Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 69: 6704–6712.
- [81] Du Z, Qin R, Wei C, Wang M, Shi C, Tian R, Peng C (2011) Pancreatic cancer cells resistant to chemoradiotherapy rich in “stem-cell-like” tumor cells. *Dig Dis Sci* 56: 741–750.
- [82] Javle MM, Gibbs JF, Iwata KK, Pak Y, Rutledge P, Yu J, Black JD, Tan D, Khoury, T (2007) Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 14: 3527-3533.
- [83] Hirohashi, S. (1998) Inactivation of the E-cadherin mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 153:333–339.
- [84] Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.
- [85] Friess H, Yamanaka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI, Korc M (1993) Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 105: 1846-1856.
- [86] Bellone G, Smirne C, Mauri FA, Tonel E, Carbone A, Buffolino A, Dughera L, Robecchi A, Pirisi M, Emanuelli G (2006) Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: Implications for survival. *Cancer Immunol Immunother* 55: 684-698.
- [87] Steele CW, Jamieson NB, Evans TRJ, McKay CJ, Sansom OJ, Morton JP and Carter CR (2013) Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer. *BJC*: 1-7
- [88] Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F (2003) MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195: 346–355.
- [89] Bui JD, Schreiber RD (2007) Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* 19: 203–208.
- [90] Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H and Hass R (2011) Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Communication and Signaling* 9: 18
- [91] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, Inflammation and Cancer. *Cell* 140 (6): 883-899.
- [92] Coussens, LM_& Werb Z (2002): Inflammation and Cancer. *Nature* 420: 860-867
- [93] Vasievich EA & Huang L (2011) The Suppressive Tumor Microenvironment: A Challenge in Cancer Immunotherapy. *Mol Pharm* 8(3): 635-41

- [94] Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674
- [95] Maeda H, Akaike T (1998) Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry* 63: 854–865
- [96] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436–444.
- [97] Sparmann A, Bar-Sagi D (2004) Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6: 447–458
- [98] Farrow B, Albo D and Berger DH (2008) The role of the tumormicroenvironment in the progression of pancreatic cancer. *J Surg Res* 149: 319–328
- [99] Murphy K, Travers P, Walport M (2009) *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- [100] Evans A and Costello E (2012) The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion. *Frontiers in Physiology* VI.3
- [101] Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T (2013): *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*, 2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- [102] Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, Tan MC, Hawkins WG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC (2009) Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother* 32: 12-21.
- [103] Farrow B, Evers BM (2002) Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol* 10: 153–69.
- [104] Yen TW, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, Bell Jr. RH (2002) Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 131: 129-134.
- [105] Grage-Griebenow E, Lorenzen D, Fetting R, Flad HD, Ernst M (1993) Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur J Immunol* 23: 3126–3135.
- [106] Linehan DC, Goedegebuure PS (2005) CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res.* 32(1-3):155-68.
- [107] Sancho D, Gómez M and Sánchez-Madrid F (2005): CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *TRENDS in Immunology* Vol. 26
- [108] Han Y, Guo Q, Zhang M, Chen Z, Cao X (2009) CD69+ CD4+ CD25-T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J.Immunol.* 182: 111-120.

- [109] Protti MP, De Monte L (2013) Immune infiltrates as predictive markers of survival in pancreatic cancer patients. *Front Physiol* 4: 210.
- [110] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G (2003) Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348: 203–213.
- [111] Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Galon J, (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353, 2654–2666.
- [112] Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953–964.
- [113] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, and Clements VK (2012) Crosstalk between myeloid derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immunosuppression. *Semin Cancer Biol* 22: 275–281.
- [114] Ruffell B, Affara NI and Coussens LM (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33: 119–126.
- [115] Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S (2011) Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* 167 (2): e211–e219.
- [116] Dale DC, Boxer L, Liles WC (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935–945.
- [117] Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996) Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56: 4625–4629.
- [118] Vakkila J, Lotze MT (2004) Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol* 4: 641–648.
- [119] Condeelis J, Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124: 263–266.
- [120] Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2008): Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18: 349–355.
- [121] Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122 (3): 787–795
- [122] Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8: 618–631.

- [123] Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren U, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S (2014) Tumor associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* 135: 843–861
- [124] Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH (2007) Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res* 67 (19): 9518–9527.
- [125] Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S (2006) Prevalence of FOXP3+regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* 12: 5423–5434.
- [126] Zou W (2006) Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6: 295- 307.
- [127] Gabbitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA and Middleton GW (2011). Elevated myeloid derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 60: 1419–1430.
- [128] Ochi A, Graffeo CS, Zambirinis CP, Rehman A, Hackman M, Fallon N, Barilla RM, Henning JR, Jamal M, Rao R, Greco S, Deutsch M, Medina-Zea MV, Saeed UB, Ego-Osuala MO, Hajdu C, Miller G (2012) Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J Clin Invest* 122 (11): 4118–4129.
- [129] Grage-Griebenow E, Schäfer H, Sebens S (2014) the fatal alliance of cancer and T cells: How pancreatic tumor cells gather immunosuppressive T Cells. *Onco Immunology* 3, e29382
- [130] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169 (5): 2756–2761.
- [131] Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H (2004) CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 28 (1): e26–e31.
- [132] Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, Bevilacqua G, Campani D (2004) Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 57, 630–636.

- [133] Ino Y, Yamazaki-Itho R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y and Hiraoka N (2013) Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *British Journal of cancer*: 1-10.
- [134] Kurahara H, Takao S, Maemura K, Mataka Y, Kuwahata T, Maeda K, Sakoda M, Iino S, Ishigami S, Ueno S, Shinchi H, Natsugoe S (2013) M2- Polarized Tumor-Associated Macrophage Infiltration of Regional Lymph Nodes Is Associated With Nodal Lymphangiogenesis and Occult Nodal Involvement in pN0 Pancreatic Cancer. *Pancreas* 42: 155–159.
- [135] Liu N, Furukawa T, Kobari M, Tsao MS (1998) Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 153: 263–269.
- [136] Furukawa T, Duguid WP, Rosenberg L, Viallet J, Galloway DA and Tsao MS (1996) Long-Term Culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the EE7 gene of human Papilloma Virus 16. *Am J Pathol* 148 (6).
- [137] Goebel L, Grage-Griebenow E, Gorys A, Helm O, Genrich G, Lenk L, Wesch D, Ungefroren H, Freitag-Wolf S, Sipos B, Röcken C, Schäfer H, Sebens S (2015) CD4+ T cells potently induce epithelial-mesenchymal-transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells- novel implications of CD4+ T cells in pancreatic cancer development. *Oncoimmunology* Jan 22;4(4).
- [138] Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, Wicklein D, Wesch D, Freitag-Wolf S, Goebel L, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Altevogt P, Schumacher U, Schäfer H, Sebens S (2014) L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression. *Mol Oncol* 8 (5): 982-97
- [139] Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Löhr JM, Friess H. (2007) Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer* 121: 699–705.
- [140] Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev. Cancer* 5: 263–274.
- [141] Fogar P, Basso D, Fadi E, Greco E, Pantano G, Padoan A, Bozzato D, Facco M, Sanzari MC, Teolato S, Zambon CF, Navaglia F, Semenzato G, Pedrazzoli S and Plebani M (2011). Pancreatic cancer alters human CD4+ T lymphocyte function: a piece in the immune evasion puzzle. *Pancreas* 40: 1131-37.
- [142] Schmitz-Winnenthal FH, Volk C, Z'graggen K, Galindo L, Nummer D, Ziouta Y, Bucur M, Weitz J, Schirrmacher V, Büchler MW, Beckhove P (2005) High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res* 65:10079–87.

- [143] Schmitz-Winnenthal FH, Escobedo LV, Beckhove P, Schirmmacher V, Bucur M, Ziouta Y, Volk C, Schmied B, Koch M, Antolovic D, Weitz J, Büchler MW, Z'Graggen K (2006) Specific immune recognition of pancreatic carcinoma by patient-derived CD4 and CD8 T cells and its improvement by interferon-gamma. *Int J Oncol* 28(6):1419-28.
- [144] Choi C, Witzens M, Bucur M, Feuerer M, Sommerfeldt N, Trojan A, Ho A, Schirmmacher V, Goldschmidt H, Beckhove P (2005) Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 105:2132-4.
- [145] Feuerer M, Beckhove P, Bai L, Solomayer EF, Bastert G, Diel IJ, Pedain C, Oberniedermayr M, Schirmmacher V, Umansky V (2001) Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7:452-8.
- [146] Müller-Berghaus J, Ehlert K, Ugurel S, Umansky V, Bucur M, Schirmmacher V, Beckhove P, Schadendorf D (2006) Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients: association with disease stage and disease duration. *Cancer Res* 66:5997-6001
- [147] Byrne WL, Mills KH, Lederer JA, O'Sullivan GC (2011) Targeting regulatory T cells in cancer. *Cancer Res* 71: 6915-20.
- [148] Ikemoto T, Yamaguchi T, Morine Y, Imura S, Soejima Y, Fujii M, Maekawa Y, Yasutomo K, Shimada M (2006) Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas* 33: 386-390
- [149] Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, Yui R, Yamao J, Kim S, Kwon AH (2012) Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 41: 409-415.
- [150] Tang Y, Xu X, Guo S, Zhang C, Tang Y, Tian Y, Ni B, Lu B, Wang H (2014) : An increased Abundance of Tumor-Infiltrating regulatory T Cells Is Correlated with the Progression and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One* 9 (3): e915511.
- [151] Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, Borsellino G, Battistini L, Röttschke O, Falk K (2009). CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 113: 827-836.
- [152] Zhang Y, Yan W, Mathew E, Bednar F, Wan S, Collins MA, Evans RA, Welling TH, Vonderheide RH, di Magliano MP (2014) CD4+ T lymphocyte ablation prevents pancreatic carcinogenesis in mice. *Cancer Immunol Res* 2: 423-35.
- [153] Duan X, Deng L, Chen X, Lu Y, Zhang Q, Zhang K, Hu Y, Zeng J, Sun W (2011) Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med Oncol* 28(2):466-74.

- [154] Davis M, Conlon K, Bohac GC, Barcenas J, Leslie W, Watkins L, Lamzabi I, Deng Y, Li Y, Plate JM (2012) Effect of pemetrexed on innate immune killer cells and adaptive immune T cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *J Immunother* 35(8):629–40
- [155] Zhang Y, Eliav Y, Shin SU, Schreiber TH, Podack ER, Tadmor T, Rosenblatt JD (2013) B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer Immunol Immunother* 62(1):87-99.
- [156] Kiefel H, Bondong S, Pfeifer M, Schirmer U, Erbe-Hoffmann N, Schäfer N, Sebens S, Altevogt P (2012) EMT – associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signaling and NF- κ B activation. *Carcinogenesis* 33 (10): 1919-29
- [157] Sebens Mürköster S, Kötteritzsch J, Geismann C, Gast D, Kruse M, Altevogt P, Fölsch UR & Schäfer H (2009) alpha5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Oncol* 34 (1): 243-253.
- [158] Drabsch Y and ten Dijke P (2012) TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31(3-4):553-68.
- [159] Neuzillet C, de Gramont A, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E (2014) Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget*. 15; 5 (1): 78-94.
- [160] Arlt, A, Gehrz, A, Mürköster, S, Vorndamm, J, Kruse, M, Fölsch, UR & Schäfer, H (2003) Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 22 (21): 3243-3251.
- [161] Arlt A, Vorndamm J, Mürköster S, Yu H, Schmidt WE, Fölsch UR & Schäfer H (2002), Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 62 (3): 910-916.
- [162] Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE & Schäfer H (2001) Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20 (7): 859-868.
- [163] Arlt A, Sebens Mürköster S, Schäfer H (2013) Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 332: 346-358.
- [164] Sebens Mürköster S, Lust J, Arlt A, Häsler R, Witt M, Sebens T, Schreiber S, Fölsch UR, Schäfer H (2006) Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1 β and NO lead to inactivation of caspases. *Oncogene* 25: 3973-81.
- [165] Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Fölsch UH, Schäfer H (2004) Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta, *Cancer Res* 64: 1331– 1337.

- [166] Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, Hazin J, Riedle S, Wolf J, Pfeifer M, Arlt A, Schäfer H, Mürköster SS & Altevogt P (2010) L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF-kappaB activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1beta expression. *Oncogene* 29 (34) :4766-4778.
- [167] Mürköster S, Arlt A, Witt M, Gehrz A, Haye S, March C, Grohmann F, Wegehenkel K, Kalthoff H, Fölsch UR & Schäfer H (2003) Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 104 (4): 469-476.
- [168] Uram JN, Le DT (2013) Current advances in immunotherapy for pancreatic cancer *Curr Probl Cancer* 5:273-9.
- [169] Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T and Sakamoto M (2010) Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. *Lab invest* 90(9):1339- 1345.
- [170] Odorizzi PM, Wherry EJ (2012) Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. *J Immunol* 188:2957-65.
- [171] Sznol M, Chen L (2013) Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 19:1021-4.
- [172] Page DB, Postow MA, Callahan MK, Allison JP, Wolchok J (2014) Immune Modulation in Cancer with Antibodies. *Annu Rev Med* 65:185-202.
- [173] Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252-64.
- [174] Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, Clendenin C, Stanger BZ, Furth EE, Wherry EJ, Vonderheide RH (2015) Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol Res* 4:399-411.
- [175] Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210:1695-710.
- [176] Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* 206:1717-25.
- [177] Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, Korman AJ (2013) Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 1:32-42.

- [178] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26):2455-65.
- [179] Powles T1, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, Bellmunt J, Burris HA, Petrylak DP, Teng SL, Shen X, Boyd Z, Hegde PS, Chen DS, Vogelzang NJ (2014) MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515(7528):558-62.
- [180] Herbst RS, Soria J, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrik A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515:563-7.
- [181] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 363:711-23.
- [182] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 366:2443-54.
- [183] Hamid O1, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumei PC, Chmielowski B, Ebbinghaus SW, Li XN, Kang SP, Ribas A (2013) Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 369:134-44.
- [184] Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL, Gilson MM, Wang C, Selby M, Taube JM, Anders R, Chen L, Korman AJ, Pardoll DM, Lowy I, Topalian SL (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28(19):3167-75.
- [185] Tabernero J, Powderly JD, Hamid O, Gordon MS, Fisher GA, Braiteh FS, Garbo LE, Fine GD, Kowanetz M, McCall B, Shen X, Chen DS, Kohrt HE (2013) Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced

- or metastatic CRC, gastric cancer(GC), SCCHN, or other tumors. ASCO MeetingAbstracts2013; 31 (15_suppl):3622.
- [186]** Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Lowy I, Rosenberg SA (2010) Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* 33(8):828-33.
- [187]** ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet]. Identifier: NCT00836407. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT00836407>
- [188]** ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet]. Identifier: NCT00556023. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT00556023>
- [189]** ClinicalTrials.gov [homepage on the Internet]. Identifier: NCT01473940. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=NCT01473940>
- [190]** Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Sznol M (2013) Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369:122-33.
- [191]** De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, Braga M, Di Carlo V, Doglioni C, Protti MP (2011) Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med* 208(3):469-78.
- [192]** von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Jöhnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H (2001) Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Can Res* 7:925s-32s
- [193]** Vonderheide RH, Bayne LJ. (2013) Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma. *Curr Opin Immunol* 25:200-5.
- [194]** Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, Huhn RD, Song W, Li D, Sharp LL, Torigian DA, O'Dwyer PJ, Vonderheide RH (2011) CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 331(6024):1612-6.
- [195]** Sideras K, Braat H, Kwekkeboom J, van Eijck CH, Peppelenbosch MP, Sleijfer S, Bruno M. (2014) Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 4: 513-22.
- [196]** Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce A Liguori M, Erba E, Uboldi S, Zucchetti M, Pasqualini F, Nebuloni M, van Rooijen, Mortarini R, Beltrame L, Marchini S, Nerini IF, Sanfilippo R, Casali PG, Pilotti S, Galmarini CM, Anichini A, Mantovani A, D'Incalci M and

- Allavena P (2013) Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 23: 249–62.
- [197] Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480–3
- [198] Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478–80.
- [199] Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998) A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474–8.
- [200] French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ (1999) CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* 5:548–53.
- [201] Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP, van der Voort EI, Schumacher TN, Melief CJ, Offringa R, Toes RE (1999) CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med.* 5:774–9.
- [202] Sotomayor EM, Borrello I, Tubb E, Rattis FM, Bien H, Lu Z, Fein S, Schoenberger S, Levitsky HI (1999) Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. *Nat Med* 5(7):780-7.
- [203] Ostapoff KT, Cenik BK, Wang M, Ye R, Xu X, Nugent D, Hagopian MM, Topalovski M, Rivera LB, Carroll KD, Brekken RA (2014) Neutralizing murine TGFβR2 promotes a differentiated tumor cell phenotype and inhibits pancreatic cancer metastasis. *Cancer Res.* 2014 Sep 15;74(18):4996-5007.
- [204] Arlt MJ, Novak-Hofer I, Gast D, Gschwend V, Moldenhauer G, Grünberg J, Honer M, Schubiger PA, Altevogt P, Krüger A (2006) Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res* 66: 936–43.
- [205] Gast D, Riedle S, Schabath H, Schlich S, Schneider A, Issa Y, Stoeck A, Fogel M, Joumaa S, Wenger T, Herr I, Gutwein P, Altevogt P (2005) L1 augments cell migration and tumor growth but not h3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 115: 658–65.
- [206] Stoeck A, Gast D, Sanderson MP, Issa Y, Gutwein P, Altevogt P (2007) L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 104: 461–9.
- [207] Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniwind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, kneitz C, Tepe J, et al (2008): Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68: 1443-50.
- [208] Wu C, Fernandez SA, Criswell T, Chidiac T, Guttridge D, Villalona-Calero M, Bekaii-Saab T (2013) Manuscript title: Disrupting cytokine signaling in pancreatic cancer: A phase I/II study

of Etanercept in combination with Gemcitabine in patients with advanced cancer. *Pancreas* 43(5): 813-818.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Elfi Jerg
Geburtsdatum und -ort	19. Februar 1987, Weinheim

Schulbildung

Juli 1993 - Juni 1996	Birch Hill School, Nashua New Hampshire (USA)
Juli 1996 – Juni 1997	Grundschule Unter-Abtsteinach
Juli 1997 - Juni 2006	Überwald-Gymnasium Wald-Michelbach
	Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin

Sept. 2007 - Aug. 2009	Semmelweis Universität, Budapest (Ungarn) Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2010 - April 2014	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Wissenschaftliches Arbeiten

Dissertation Seit Mai 2011	Institut für Experimentelle Medizin Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Schleswig-Holstein <u>Thema:</u> „Vergleichende Analyse des Einflusses von mononukleären Zellen aus dem Blut gesunder Spendern und von Pankreasadenokarzinompatienten auf humane pankreatische Gangepithelzellen“ <u>Betreuerin:</u> Prof. Dr. Susanne Sebens
Publikation	Grage-Griebenow E, Jerg E , Gorys A, Wicklein D, Wesch D, Freitag-Wolf S, Goebel L, Vogel I, Becker T, Ebsen M, et al. L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression. Mol Oncol 2014; (Forthcoming); PMID:24746181; http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2014.03.001

Facharztausbildung

Seit Mai 2015	Lubinus Clinicum, Kiel Assistenzärztin in der Orthopädie und Unfallchirurgie
---------------	--

Danksagung

Mein tiefster Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Dr. rer. nat. Susanne Sebens für die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung dieser Arbeit. Neben der Bereitstellung des Themas war sie durch ihre unglaublich positive Art eine stetige Stütze und mein Antrieb. Ich möchte ihr von Herzen für ihre vorbehaltlose, stets konstruktive und immerwährende turboschnelle Unterstützung danken.

Die Arbeit im Team der inflammatorischen Karzinogenese war ein unvergessliches Vergnügen. Innerhalb der gemeinsamen Stunden der Zusammenarbeit herrschte ein einmaliges Klima. Durch Menschen wie Evelin Grage-Griebenow wurde die Zeit im Labor zu einer tollen Erfahrung und Bereicherung. Ihr unvergleichbarer Beistand sowie ihr jederzeit offenes Ohr machte nicht nur die Auswertungen zu einer Leichtigkeit. Auch Maike Witt-Ramdor und Dagmar Leisner möchte ich für ihre ruhige Art und Unterstützung im Laboralltag danken. Weiterhin haben Ole Helm und Lennart Lenk mich durch ihre unkomplizierte und unterhaltsame Art ungemein unterstützt. Danke dafür.

Außerdem möchte ich den Mitgliedern des Instituts für Immunologie des UKSH, Campus Kiel, für die Erlaubnis der Nutzung des FACS und Anja Trauzold und ihrer AG für die Kooperation danken.

Ferner gilt mein Dank Heiner Schäfer, seiner Arbeitsgruppe (Iris Bauer, Maike Großmann, Maike Witt-Ramdor) sowie Claudia Geismann und Frauke Grohmann für die hilfreichen Tipps und Ratschläge.

Meinen Freunden möchte ich für ihren moralischen Beistand, aufheiternden sowie ansporenden Worten und Taten danken. Von Herzen gilt insbesondere meinen Eltern aber auch meiner gesamten Familie meine größte Dankbarkeit für ihre unerschöpfliche Unterstützung in allen Lebenslagen und bei jeder Herausforderung. Ohne sie wären diese Arbeit und so vieles mehr nicht möglich gewesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Vergleichende Analyse des Einflusses von mononukleären Zellen aus dem Blut gesunder Spender und von Pankreasadenokarzinompatienten auf humane pankreatische Gangepithelzellen“ eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner Betreuerin in der Arbeitsgruppe für Inflammatorische Karzinogese des Institutes für Experimentelle Medizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt habe.

Diese Doktorarbeit wurde bisher weder im In- und Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, noch wurde sie zur Veröffentlichung eingereicht. Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel,

Unterschrift