

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung  
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Rolle von L1CAM bei der Anreicherung und Funktion von  
immunsuppressiven T-Zellen im duktalem Pankreasadenokarzinom**

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

vorgelegt von  
**Artur Gorys**  
aus Düsseldorf

Kiel 2016

**1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens**

**2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp**

**Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2017**

**Zum Druck genehmigt: Kiel, den 31.01.2017**

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
Vorbemerkung .....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren .....	1
1.1.3 Klinik.....	2
1.1.4 Pathologie .....	3
1.1.5 Progressionsmodell, Genetik und Epitheliale-Mesenchymale-Transition .....	4
1.2 Regulatorische T-Zellen .....	5
1.2.1 Einleitung .....	5
1.2.2 Herkunft.....	5
1.2.3 Charakterisierung.....	6
1.2.4 Funktion .....	7
1.2.5 Regulatorische T-Zellen im PDAC .....	7
1.3 L1CAM .....	8
1.4 Ziel der Arbeit.....	11
2 Material .....	12
2.1 Pankreasgangepithelzelllinien.....	12
2.2 Patienten .....	12
2.3 Antikörper und Reagenzien.....	13
2.3.1 Primärantikörper für Färbungen.....	13
2.3.2 Sekundärreagenz für Färbungen .....	14
2.3.3 Antikörper und Beads für T-Zell-Isolation .....	14
2.3.4 Weitere Antikörper .....	14
2.3.5 Weitere Reagenzien .....	14
2.4 Medien und Medienzusätze .....	15
2.5 Puffer, Lösungen und Chemikalien .....	15
2.6 Geräte .....	15
2.7 Pipetten .....	16

2.8 Verbrauchsmaterialien .....	16
3 Methoden .....	18
3.1 Isolation von Tregs und CD4+ Teffs aus dem Blut gesunder Spender .....	18
3.1.1 Prinzip der T-Zell-Isolation .....	18
3.1.2 Isolation von MNZ aus dem Blut gesunder Spender .....	18
3.1.3 Isolation von CD4+ T-Zellen aus MNZ .....	19
3.1.4 Negative Selektion von Teffs und Tregs aus CD4+ T-Zellen .....	20
3.1.5 Negative Selektion von Teffs und positive Selektion von Tregs aus CD4+ T-Zellen .....	20
3.2 Zellkultur der H6c7- und Panc1-Zelllinie und Cokulturen .....	21
3.2.1 Zellkultur der H6c7- und Panc1-Zelllinie .....	21
3.2.2 Bestimmung der Expression von L1CAM in den Pankreasgangepithelzelllinien .....	21
3.2.3 Anlegen der Cokultur von H6c7- und Panc1-Zellen mit T-Zellen .....	22
3.2.4 Kultur von Teffs auf L1CAM-Fc- und Kontroll-Fc-beschichteten Platten .....	23
3.2.5 Kultur von Teffs in Überständen von H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen .....	23
3.3 Durchflusszytometrie .....	23
3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie .....	23
3.3.2 Reinheitsfärbung frisch isolierter Teffs und Tregs .....	24
3.3.3 Analyse des immunsuppressiven Potenzials von Tregs durch Bestimmung der Teff-Proliferation im Vergleich zu positiv isolierten Tregs .....	25
3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation und des Phänotyps von Tregs und Teffs aus Cokultur mit H6c7- und Panc1-Zellen .....	26
3.3.5 Durchflusszytometrische Analyse von Teffs nach Kultur auf L1CAM-Fc- beschichteten Platten und in konditionierten Überständen .....	27
3.4 Analyse des Migrationsverhaltens von Tregs und Teffs nach Cokultur mit H6c7- mock- und H6c7-L1CAM-Zellen .....	28
3.4.1 Prinzip .....	28
3.4.2 Durchführung .....	28
3.5 Hemmversuch: Analyse der suppressorischen Aktivität von Teffs nach Cokultur mit H6c7- oder Panc1-Zellen .....	29
3.5.1 Prinzip .....	29
3.5.2 Durchführung .....	29
3.6 Charakterisierung von MNZ aus Blut und Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC .....	32
3.7 Statistische Analyse .....	34

4	Ergebnisse .....	35
4.1	Die Anzahl von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs ist im Blut von Patienten mit CP und PDAC leicht erhöht.....	35
4.2	Charakterisierung von Tregs, isoliert aus dem Blut gesunder Spender .....	38
4.3	Negativ isolierte Tregs besitzen einen stark immunsuppressiven Phänotyp .....	40
4.4	CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs kommen im Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC und CP vor.....	41
4.5	Tregs besitzen ein hohes migratorisches Potential, welches durch L1CAM weiter verstärkt wird .....	43
4.6	Die Proliferation von Teffs, nicht aber von Tregs, ist in Anwesenheit von L1CAM vermindert .....	45
4.7	L1CAM beeinflusst den Phänotyp von Teffs, wohingegen der Phänotyp von Tregs stabil bleibt .....	48
4.7.1	L1CAM vermindert die Expression von CD25 in Teffs.....	48
4.7.2	L1CAM erhöht die Expression von CD69 in Teffs .....	51
4.8	In Anwesenheit von L1CAM kokultivierte Teffs bilden einen immunsuppressiven Phänotyp aus .....	54
4.9	Eine erhöhte Anzahl von CD4+CD25-CD69+ T-Zellen im Pankreasgewebe ist mit einer malignen Progression des PDAC verbunden.....	55
5	Diskussion.....	58
6	Zusammenfassung .....	64
7	Literaturverzeichnis.....	66
	Danksagung.....	75
	Lebenslauf .....	76
	Publikationsverzeichnis.....	77

## Abbildungsverzeichnis

1	Versuchsschema für Hemmversuch von T-Effektorzellen (Teffs).....	31
2	Die Prävalenz von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs im Blut von Patienten mit CP und PDAC im Vergleich zu gesunden Spendern.....	37
3	Durchflusszytometrische Analyse frisch isolierter T-Zellen bezüglich der Expression von CD4, CD25, CD69, CD49d, CD127, CD45RO und FoxP3.....	39
4	„Untouched“ Tregs hemmen die Proliferation von Teffs.....	40
5	Hemmung der Proliferation von Teffs durch positiv isolierte Tregs im Vergleich zu negativ isolierten Tregs.....	41
6	Die Prävalenz von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs im Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC.....	42
7	Expression von L1CAM in H6c7-L1CAM- und Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1 <sup>L1low</sup> -Zellen.....	43
8	Migration von T-Zellen durch einen <i>Monolayer</i> aus H6c7-mock- bzw. H6c7-L1CAM-Zellen und Panc1 <sup>L1low</sup> - bzw. Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen.....	44
9	Proliferation von Tregs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1 <sup>L1low</sup> -Zellen.....	46
10	Proliferation von Teffs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1 <sup>L1low</sup> -Zellen.....	47
11	Expression von CD49d und CD127 in Teffs und Tregs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1 <sup>L1low</sup> -Zellen.....	49
12	Expression von CD25 in Tregs und Teffs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1 <sup>L1low</sup> -Zellen.....	50
13	Expression von CD69 in Teffs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1 <sup>L1high</sup> -Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1 <sup>L1low</sup> -Zellen.....	51
14	Expression von Ki-67, CD25 und CD69 nach Kultur von Teffs auf L1CAM-Fc-beschichteten Platten.....	52
15	Expression von Ki-67, CD25 und CD69 nach Kultur von Teffs in H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-konditionierten Medien.....	53
16	Hemmung der Proliferation von autologen Teffs durch kokultivierte Teffs.....	54
17	Verteilung von CD69+ T-Zellen im Blut und Pankreasgewebe von gesunden Spendern und Patienten mit CP und PDAC.....	56
18	Korrelation der Prävalenz CD69+ T-Zellen im Tumorgewebe mit klinischen Parametern bei Patienten mit PDAC.....	57

## Tabellenverzeichnis

1	Färbeschema zur Reinheitsfärbung von Teffs und Tregs .....	24
2	Färbeschema zur Bestimmung von Proliferation und Phänotyp von Teffs und Tregs .....	27
3	Färbeschema zur Charakterisierung von MNZ aus Blut und Pankreasgewebe .....	33
4	Charakteristika von gesunden Spendern sowie von Patienten mit CP und PDAC .....	35



## Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AML1/Runx1	<i>Acute myeloid leukemia 1 protein/runt-related transcription factor</i>
AP2 $\alpha$	<i>Activator protein 2 alpha</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BRCA2	Brustkrebsgen 2 ( <i>breast cancer 2</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CCL5	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 5
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CP	Chronische Pankreatitis
cpm	<i>Counts per minute</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FPC	Familiäres Pankreaskarzinomsyndrom
FSC	<i>Forward scatter</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOXA9	Homeobox A9
IER3	<i>Immediate early response 3 gene</i>
IL	Interleukin
iTregs	Induzierte regulatorische T-Zellen
kD	Kilodalton
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
LAG-3	Lymphozytenaktivierungsgen-3
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mIgG1	Maus-Immunglobulin G1

MNZ	Mononukleäre Zellen
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom ( <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> )
PRSS1	Protease, Serin, 1 (Trypsin 1)
RPMI	Medium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
shRNA	<i>Small hairpin ribonucleic acid</i>
SPINK1	<i>Serine protease inhibitor Kazal-type 1</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STK39	Serin Threonin Kinase 39
Teffs	T-Effektorzellen
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor-beta 1</i>
Tregs	Regulatorische T-Zellen
U/min	Umdrehungen pro Minute
$\mu$ Ci	Mikrocurie

## Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Grage-Griebenow E, Jerg E<sup>1</sup>, **Gorys A**<sup>1</sup>, 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, 982-997.

<sup>1</sup>zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen

Zudem wurden Teile dieser Arbeit auf folgenden Kongressen vorgestellt:

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

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie 2012 in Hamburg.

Grage-Griebenow E, Jerg E, **Gorys A**, Mennrich R, Freitag-Wolf S, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Wesch D, Kabelitz D, Sebens T, Schäfer H & Sebens S (2012). The adhesion molecule L1CAM has an impact on the prevalence of regulatory T-cells in pancreatic ductal adenocarcinoma.

35. Symposium Norddeutscher Immunologen 2012 in Borstel.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom, dessen weitaus häufigster Vertreter das duktales Pankreasadenokarzinom (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) ist (Hezel et al. 2006), zählt mit circa 16.000 Neuerkrankungen pro Jahr (im Jahr 2010) in Deutschland zu den zehn häufigsten Krebsarten. Fast ebenso viele Menschen erliegen jährlich dieser Erkrankung. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten von 8 % sowohl bei Frauen als auch bei Männern sind dabei so gering wie bei keiner anderen Tumorerkrankung. Mit dieser infausten Prognose liegt das PDAC bis heute auf dem vierten Platz der krebsbedingten Todesursachen. Die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten haben sich dabei seit Ende der 1990er Jahre kaum verändert (Kaatsch et al. 2013).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Das Risiko, an einem PDAC zu erkranken, steigt mit dem Alter. Für Männer liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren. Vor dem 40. Lebensjahr stellt die Erkrankung hingegen eine Rarität dar (Lüttges & Klöppel 2005; Kaatsch et al. 2013). Neben dem Alter sind Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und die chronische Pankreatitis (CP) von langjähriger Dauer als Risikofaktoren identifiziert worden (Hezel et al. 2006). Auch ein hoher Alkoholkonsum steigert das Erkrankungsrisiko (Kaatsch et al. 2013). Ältere Arbeiten gehen davon aus, dass bis zu 10 % der Erkrankungen mit einer familiären Prädisposition assoziiert sind (Hahn et al. 2003; Hezel et al. 2006). Neuere Studien zeigen allerdings nur in unter 3 % aller PDAC-Fälle eine familiäre Häufung (Fendrich et al. 2014). Der Großteil von erblich bedingtem PDAC wird durch das familiäre Pankreaskrebsyndrom (FPC) verursacht. Dies ist definiert als Erkrankung mindestens zweier Verwandter ersten Grades an einem PDAC, welche keine anderen Tumorsyndrome mit erhöhter Erkrankungswahrscheinlichkeit für ein PDAC aufweisen. Der Erbgang ist vorwiegend autosomal dominant. Der ursächliche Gendefekt ist noch unbekannt (Fendrich et al. 2014). Keimbahnmutationen in Tumorsuppressorgenen erhöhen das Erkrankungsrisiko. Dabei sind Mutationen im *BRCA2*-Gen am häufigsten und in 3-17 % von Fällen familiärer Pankreatitis nachweisbar (Murphy et al. 2002; Couch et al. 2007; Hahn et al. 2003). Außerdem ist eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an einem PDAC zu erkranken, mit einer Prädisposition für die

Entwicklung einer CP verbunden. Diese kann erblich im Rahmen einer hereditären Pankreatitis über Keimbahnmutationen im *PRSS1*-Gen sowie -seltener- im *SPINK1*-Gen oder der zystischen Fibrose mit Mutationen im *CFTR*-Gen entstehen (Fendrich et al. 2014). Darüber hinaus sind Tumorprädispositionssyndrome wie das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis, das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom, das hereditäre Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom und das Peutz-Jegher-Syndrom mit einem erhöhten Risiko, ein PDAC zu entwickeln, verknüpft (Fendrich et al. 2014).

### **1.1.3 Klinik**

Das PDAC bereitet lange keine Symptome oder äußert sich allenfalls durch unspezifische Oberbauchschmerzen sowie Appetit- und Gewichtsverlust. Später kann als wegweisender Befund ein schmerzloser Ikterus, bedingt durch die extrahepatische Verlegung der Gallengänge, auftreten. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die Erkrankung meist so weit fortgeschritten, dass nur 10-20 % der Patienten noch operiert werden können. Die Tumoresektion ist dabei der einzig kurative Therapieansatz (Lüttges & Klöppel 2005). Jedoch ist die 5-Jahres-Überlebensrate selbst nach R0-Resektion mit 25 % beschränkt und sinkt 10 Jahre nach Operation auf unter 10 % (Schneider et al. 2005). Die Operationstechnik der Wahl ist beim Pankreaskopfkarzinom eine partielle Duodenopankreatektomie. Diese kann entweder als klassische Whipple-Operation unter Mitnahme des Pylorus oder pyloruserhaltend nach Traverso-Longmire durchgeführt werden. Beide Operationsverfahren scheinen bezüglich onkologischer Langzeitergebnisse und postoperativer Komplikationen gleichwertig. Im Falle von Pankreasschwanztumoren wird eine Pankreaslinksresektion angestrebt (Seufferlein et al. 2013). Anschließend wird in der Regel eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin durchgeführt. Von Vorteil ist hierbei insbesondere eine signifikant verlängerte Zeit bis zum Auftreten von Rezidiven, während das Gesamtüberleben möglicherweise unbeeinflusst bleibt (Oettle et al. 2007). Eine weitere Möglichkeit der adjuvanten Therapie des PDAC ist der Einsatz von 5-Fluoruracil. Die aktuelle Studienlage lässt keine Aussage zu einer Überlegenheit eines der beiden Chemotherapeutika zu (Antoniou et al. 2014).

Patienten mit lokal fortgeschrittenen Befunden oder Metastasen werden palliativ therapiert. Neben einer adäquaten Schmerztherapie und supportiven Maßnahmen ist die Chemotherapie mit Gemcitabin Standard und kann bei einigen Patienten die Beschwerden erleichtern (Vincent et al. 2004). Die Gemcitabin-Monotherapie kann zusätzlich durch den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib erweitert werden. Eine mediane Lebenszeitverlängerung von 12 Tagen ohne Verbesserung des Therapieansprechens oder

der Lebensqualität lassen den klinischen Nutzen allerdings bezweifeln (Eckel et al. 2006; Moore et al. 2007).

Eine weitere Option für die Erstlinientherapie bei metastasiertem PDAC ist ein Chemotherapieregime mit den Wirkstoffen Oxaliplatin, Irinotecan, 5-Fluoruracil und Leucovorin (Folfirinox). Damit konnte im Vergleich zu Gemcitabin eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von 4,3 Monaten erreicht werden. Gleichzeitig weist die Therapie mit Folfirinox jedoch eine höhere Toxizität im Vergleich zur Therapie mit Gemcitabin auf. Deshalb beschränkt sich die Empfehlung zur Anwendung auf Patienten in gutem Allgemeinzustand, ohne kardiale Ischämie und mit normalen Bilirubinwerten (Conroy et al. 2011).

Weder diese Therapieansätze noch die Erweiterung um Radiotherapie oder andere Chemotherapeutika konnten die Prognose des PDAC bisher wesentlich verbessern. Daher ist es nach wie vor von größter Bedeutung, die Entstehung des PDAC besser zu verstehen und neue Möglichkeiten der Therapie zu finden.

#### **1.1.4 Pathologie**

Das Pankreas hat einen exokrinen Anteil, der mit seinen duktalem und azinären Zellen den Großteil der Organmasse ausmacht und Verdauungssaft in das Duodenum sezerniert. Dazwischen sind endokrine Zellen in so genannten Langerhans-Inseln organisiert, welche Insulin und Glukagon produzieren (Hezel et al. 2006).

Der weitaus häufigste Typ des Pankreaskarzinoms ist mit 90 % das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC). Dieses entsteht in den kleinen Pankreasgängen und ist am häufigsten im Pankreaskopf lokalisiert (Herold: Innere Medizin 2014). Die duktalem Epithelzellen werden als Ursprung der Krebsentstehung angenommen. Auch bei kleinsten Läsionen ist häufig schon eine Invasion in umgebende Lymphgefäße und Perineuralscheiden festzustellen. Außerdem finden sich bereits in einem frühen Krankheitsstadium häufig Fernmetastasen in Leber und Lunge (Hezel et al. 2006).

Charakteristisch für das PDAC ist ein ausgeprägtes Tumorstroma, bestehend aus Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen und extrazellulären Matrixproteinen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass vielfältige Interaktionen zwischen Tumorzellen und nicht-neoplastischen Stromazellen die Krebsentwicklung entscheidend beeinflussen. So führt zum Beispiel das inflammatorische Mikromilieu zur Stimulation pankreatischer Fibroblasten. Sie transformieren daraufhin zu aktivierten Myofibroblasten und sezernieren Kollagen Typ I und Typ III und Fibronectin (Kleeff et al. 2007). Es entsteht so eine ausgesprochen dichte extrazelluläre Matrix, welche den Krebszellen als Gerüst dienen kann und zu einer erhöhten Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch die Tumorzellen führt.

Darüber hinaus wirken die Immunzellen im Tumorstroma begünstigend auf die Progression des Tumors. Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und regulatorische T-Zellen schaffen zum Beispiel durch die Produktion von Interleukin-10 und TGF- $\beta$ 1 und der darüber vermittelten Hemmung dendritischer Zellen und T-Zellen ein immunsuppressives Milieu. So wird ein effektives Eingreifen der körpereigenen, spezifischen Immunabwehr verhindert. Außerdem können Immunzellen durch Induktion von Angiogenese die Vaskularisierung des Tumors fördern (Zou 2005; Korc 2007; Kleeff et al. 2007).

### **1.1.5 Progressionsmodell, Genetik und Epitheliale-Mesenchymale-Transition**

Bei einer Vielzahl von PDAC-Patienten wurden epitheliale Hyperplasien beobachtet, die bei Gesunden in geringerem Ausmaß zu finden sind. Diese Entdeckung führte zu der Annahme, dass sich das PDAC über nicht-invasive Vorstufen entwickelt. Anhand charakteristischer morphologischer Veränderungen wurden diese in einem Progressionsmodell in sogenannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) eingeteilt (Schneider et al. 2005).

Im frühesten Stadium PanIN-1A kommt es zur Umwandlung des kuboiden Epithels in Zylinderepithel mit reichlicher Muzinproduktion. Dazu kommt im Stadium PanIN-1B die Anordnung in papillären Strukturen. Charakteristisch für das Stadium PanIN-2 sind moderate Kernatypien und ein Zellpolaritätsverlust. Das Stadium PanIN-3 ist mit schweren Kernatypien dem *Carcinoma in Situ* gleichzusetzen (Schneider et al. 2005; Lüttges & Klöppel 2005).

Unterstützt wird das Progressionsmodell durch den Nachweis von Genmutationen, deren Zahl mit dem Fortschreiten des PanIN-Stadiums zunimmt. Eine der frühesten Mutationen betrifft das Onkogen *K-Ras*, welches eine wichtige Rolle bei Proliferation, Differenzierung und Überleben spielt. Eine aktivierende Punktmutation in Codon 12 ist bei 30 % der frühen PanIN-Stadien und bei fast 100 % der fortgeschrittenen PDAC nachweisbar (Hezel et al. 2006).

Des Weiteren kann eine Mutation des Tumorsuppressorgens *P16* in ca. 95 % aller fortgeschrittenen PDAC nachgewiesen werden. Zudem sind bei über der Hälfte fortgeschrittener PDAC Mutationen des *TP53*-Gens beschrieben, welche vorwiegend ab Stadium PanIN-3 auftreten (Schneider et al. 2005). Hierdurch kommt es zu einer gestörten Funktion des Transkriptionsfaktors p53, welcher bei DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest oder die Induktion von Apoptose vermittelt.

Ähnlich häufig in fortgeschrittenen Läsionen ist eine Mutation im *MADH4/SMAD4/DPC4*-Gen, welche über eine Störung des TGF- $\beta$ 1-Signalweges zu einer verminderten Wachstumsinhibition führen kann (Hansel et al. 2003).

Einen wichtigen Erklärungsansatz für die Entwicklung von Invasivität, Apoptoseresistenz und der Fähigkeit zur Dissemination liefert das Modell der Epithelialen-Mesenchymalen-

Transition (EMT). Dabei verlieren Epithelzellen, beziehungsweise in fortgeschrittenen Stadien Krebszellen, ihren epithelialen Phänotyp und verändern sich in Richtung eines mesenchymalen Phänotyps. Dies ist charakterisiert durch den Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, die vermehrte Expression mesenchymaler Proteine wie Vimentin und N-Cadherin, die Ausbildung eines spindelförmigen Phänotyps und eine erhöhte Motilität. Bei der Regulation dieser Vorgänge sind die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist und Zeb1/2 beteiligt (Hanahan & Weinberg 2011). Letztlich können diese Veränderungen die Ausbildung von Metastasen ermöglichen und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Progression von Tumoren (Thiery 2002). Im Mausmodell konnten bereits bei PanIN-2 und PanIN-3 Veränderungen im Sinne einer EMT nachgewiesen werden. Zudem waren in diesen Stadien im Blut zirkulierende Pankreaszellen epithelialen Ursprungs mit einem vornehmlich mesenchymalen Phänotyp sowie Absiedlungen einzelner dieser Zellen in der Leber nachweisbar. Nach Induktion einer Pankreatitis stieg die Anzahl disseminierter Pankreasepithelzellen an (Rhim et al. 2012). In Übereinstimmung damit konnte im Blut von Patienten mit zystischen Läsionen des Pankreas eine erhöhte Zahl von zirkulierenden Pankreasepithelzellen im Vergleich zu gesunden Spendern nachgewiesen werden (Rhim et al. 2014). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EMT und Dissemination von Pankreasepithelzellen bereits vor der Entwicklung eines manifesten PDAC stattfinden und durch entzündliche Prozesse und darin involvierte Immunzellen unterstützt werden.

## **1.2 Regulatorische T-Zellen**

### **1.2.1 Einleitung**

Regulatorische T-Zellen (Tregs) spielen eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz des menschlichen Immunsystems sowie der Vermeidung überschießender Immunreaktionen und der Limitierung klonaler Expansion (Sakaguchi & Sakaguchi 2005).

### **1.2.2 Herkunft**

Die am besten bekannte Subpopulation von Tregs entspringt, wie alle T-Zellen, Vorläuferzellen im Knochenmark und entwickelt sich dann im Thymus. 1995 konnte Sakaguchi zeigen, dass thymektomierte Mäuse schwere Autoimmunkrankheiten entwickelten, nachdem sie mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen inokuliert worden waren. Die gleichzeitige Gabe von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen verhinderte die Erkrankung (Sakaguchi et al. 1995). Dies ließ auf eine wichtige Rolle von CD25, welches die alpha-Kette des Interleukin-2-



Rezeptors bildet, schließen. So wurde CD25 als Treg-Marker identifiziert und die Population von CD4+CD25+ Zellen aufgrund ihrer Generierung im Thymus fortan als natürliche Tregs bezeichnet. Ca. 5-10 % aller CD4+ T-Zellen in der Peripherie exprimieren CD25 (Sakaguchi 2004). Zudem sind die natürlichen Tregs durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3) charakterisiert (siehe 1.2.3).

Eine weitere Population von Tregs kann in der Peripherie durch Konversion aus CD4+CD25- T-Zellen entstehen. Die beiden größten Gruppen dieser sogenannten induzierten Tregs (iTregs) machen hierbei Typ 1 regulatorische T-Zellen (Tr1) und T-Helfer-3-Zellen (Th3) aus. Tr1 werden durch Interleukin-10 induziert und exprimieren kein FoxP3. Th3 werden durch TGF- $\beta$ 1 induziert und exprimieren dann FoxP3. Ihre suppressorische Aktivität üben sie dabei durch Sekretion derselben Zytokine aus, die auch an ihrer Induktion beteiligt sind (Workman et al. 2009). Darüber hinaus können FoxP3+ Tregs in der Peripherie unter unterschiedlichen Bedingungen induziert werden. Ihre Funktion und Bedeutung im Verhältnis zu natürlichen T-Zellen ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Yadav et al. 2013).

### 1.2.3 Charakterisierung

Es hat sich gezeigt, dass CD25 als alleiniger Marker für Tregs unzureichend ist, da auch aktivierte CD4+ T-Effektorzellen (Teffs) CD25 exprimieren. Der derzeit spezifischste Marker für Tregs ist der Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3). Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von natürlichen Tregs und kann auch bei induzierten Tregs nachgewiesen werden. FoxP3 interagiert mit Transkriptionsfaktoren wie NFAT und AML1/Runx1, die an der Aktivierung und Induktion von Teffs beteiligt sind. Es wird angenommen, dass FoxP3 auf diese Weise an der Generierung des Treg-Phänotyps beteiligt ist (Askenasy et al. 2008; Sakaguchi et al. 2008).

Für die Isolierung von Tregs ist FoxP3 aufgrund seiner Expression im Nukleus nicht geeignet. Die Isolierung von Tregs für experimentelle Zwecke wird daher vorwiegend als positive Selektion von CD4+CD25+ T-Zellen durchgeführt. Die großen Nachteile dieser Methode sind die oben beschriebene unzureichende Spezifität des Markers CD25 sowie die Kontamination der isolierten Zellen durch gebundene anti-CD25-Antikörper, die vor allem bei nachfolgenden funktionellen Untersuchungen störend sein können.

2009 führte Kleinewietfeld die Methode der negativen Selektion sowie zwei weitere Marker der Differenzierung von Tregs und aktivierten CD4+ Teffs ein, die auch bei dieser Arbeit Anwendung fanden. Dabei wird die Erkenntnis genutzt, dass Tregs im Gegensatz zu anderen CD+ T-Zellen weder CD49d noch CD127 exprimieren. Aus einem CD4+ Zellpool werden dabei alle Zellen mit diesen Markern markiert und durch magnetische Zellseparation entfernt. So verbleiben CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs, welche „*untouched*“ sind, d.h.

keine kontaminierenden Antikörper gebunden haben und darüber hinaus nahezu frei von CD25+ Tregs sind (Kleinewietfeld et al. 2009).

#### **1.2.4 Funktion**

Ihre suppressive Wirkung entfalten Tregs vor allem durch die Beeinflussung von dendritischen Zellen und Tregs. Dabei sind verschiedene Mechanismen von Bedeutung. Costimulation und Antigenpräsentation dendritischer Zellen werden durch Tregs reduziert (Shevach 2009). Dies wird vor allem durch die Interaktion von Oberflächenmolekülen wie dem *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4) und dem Lymphozytenaktivierungsgen-3 (LAG-3), welche von Tregs exprimiert werden sowie CD80/86 und MHC II auf dendritischen Zellen erreicht (Workman et al. 2009). Zudem können Tregs Tregs auch direkt affektieren. Ähnlich zytotoxischen Zellen können Tregs Tregs durch direkten Zellkontakt eliminieren. Dabei kommen bei natürlichen Tregs vorwiegend Granzyme und Perforine zum Einsatz, während iTregs Apoptose bevorzugt über den Fas-Liganden einleiten (Askenasy et al. 2008).

Des Weiteren können Tregs durch Veränderung der Zytokinproduktion bzw. des Zytokinspiegels Einfluss auf die Aktivität von Tregs nehmen. Zum einen ist hierbei die Hemmung der Interleukin-2-Produktion in der frühen Aktivierungsphase von Tregs zu nennen, welche zur Anergie der Tregs führt. Zum anderen können Tregs durch ihre hohe Expression von CD25, der alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors, Interleukin-2 phagozytieren. Dies kann bei Tregs, welche ebenfalls um Interleukin-2 kompetieren, zu der Einleitung von Apoptose führen (Shevach 2009).

Ein weiterer Mechanismus umfasst die Sekretion der immunsuppressiven Zytokine TGF- $\beta$ 1 und Interleukin-10 durch iTregs. Diese regulieren die Immunantwort sowohl durch eine Hemmung der Zytokinproduktion oder der Einleitung eines Zellzyklusarrests von CD4+ T-Zellen als auch durch eine Modulation der Funktion von antigenpräsentierenden Zellen (Askenasy et al. 2008; Shevach 2009).

#### **1.2.5 Regulatorische T-Zellen im PDAC**

Es konnte gezeigt werden, dass Tregs in erhöhtem Maße im Blut und Tumorgewebe von PDAC-Patienten vorkommen (Liyanage et al. 2002). Die Inzidenz von Tregs im Tumorstroma steigt mit abnehmendem Differenzierungsgrad des PDAC deutlich an. Eine hohe Inzidenz ist dabei mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden (Hiraoka et al. 2006).

Ein Anstieg der Treg-Inzidenz ist bereits im Pankreasgewebe und Blut bei Patienten mit chronischer Pankreatitis, welche als Risikofaktor für das PDAC gilt, sowie in seinen prämaligen Vorstufen zu beobachten (Schmitz-Winnenthal et al. 2010; Hiraoka et al. 2006). Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, die eine Anreicherung von Tregs im Tumorgewebe erklären können. So wird das *Homing* von CD4+CD25+FoxP3+ Tregs zum einen durch chemotaktische Signale gefördert, wie beispielsweise die vermehrte Expression des CCR5-Rezeptors durch Tregs und seines Liganden CCL5 durch Tumorzellen (Tan et al. 2009). Zum anderen kann ein verändertes Profil von Adressinen auf Endothelzellen des Tumors die Transmigration von Tregs fördern (Nummer et al. 2007). Darüber hinaus kann TGF- $\beta$ 1, welches sich im Stroma des PDAC anreichert (Korc 2007), eine Induktion von peripheren Tregs im Tumor vermitteln (Moo-Young et al. 2009).

### 1.3 L1CAM

L1CAM (CD171) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 200-220 kD und gehört der Immunglobulin-Superfamilie von Adhäsionsmolekülen an. Diese vermitteln calciumunabhängige Zelladhäsion. Der Genlocus von L1CAM befindet sich auf dem X-Chromosom. Das Aminoende dieses Typ-I Transmembranproteins wird von sechs Immunglobulin-ähnlichen Domänen gebildet. Diesen folgen fünf homologe Typ-III-Fibronektin-Domänen sowie eine einzige Transmembranregion und eine kurze intrazelluläre Domäne (Moos et al. 1988; Maness & Schachner 2007). Von zwei bekannten *Splicevarianten* kodiert die eine für 1257 und die andere für 1253 Aminosäuren. Ursprünglich wurde eine wichtige Rolle von L1CAM im neuronalen System beschrieben, wie bei dem Auswachsen von Axonen, der Organisation von Axonen in Nervenfasern, dem Überleben von Neuronen und deren Migration, der synaptischen Plastizität und der posttraumatischen Regeneration (Maness & Schachner 2007). L1CAM kann sowohl homophile Bindungen (Oleszewski et al. 2000) als auch heterophile Bindungen (Oleszewski et al. 1999) mit einer Reihe von verschiedenen Liganden aufbauen. Dazu zählt die Bindung mit Integrin  $\alpha_v\beta_3$  über die sechste Ig-Domäne (Oleszewski et al. 1999; Montgomery et al. 1996) sowie die Bindung von Neurocan oder Neuropilin1 mit der ersten Ig-Domäne (Castellani et al. 2002; Oleszewski et al. 2000). Außerdem kann L1CAM nahe der Membran abgespalten werden und dann in löslicher Form vorliegen (Beer et al. 1999). Abgesehen von seiner Bedeutung im neuronalen System wurde die Expression von L1CAM in Zellen myelozytären und lymphatischen Ursprungs beobachtet (Pancook et al. 1997). Dabei wurde die Funktion von L1CAM als costimulatorisches Molekül bei der Aktivierung von T-Zellen beschrieben (Balaian et al. 2000).

In den letzten Jahren wurde L1CAM zunehmend mit Tumoren in Verbindung gebracht. So konnte eine erhöhte Expression von L1CAM in verschiedenen Primärtumoren und ihren Metastasen nachgewiesen werden. Dazu zählen das kolorektale Karzinom, das Ovarialkarzinom, das Gliom sowie das PDAC (Gavert et al. 2005; Tsuzuki et al. 1998; Kaifi et al. 2007; Fogel et al. 2003; Sebens Mürköster et al. 2007). Dabei wurden verstärkende Effekte von L1CAM auf die Invasion und das Zellwachstum von Tumorzellen beschrieben (Gavert et al. 2005; Arlt et al. 2006). Die lösliche Form von L1CAM ist bei vielen Tumoren nachweisbar und spielt bei deren Fortschreiten, insbesondere bezüglich Motilität und Invasion eine wichtige Rolle (Mechtersheimer et al. 2001; Raveh et al. 2009). Sie entsteht durch Abspaltung von membrangebundenem L1CAM durch die Metalloproteasen ADAM17 und ADAM10 sowie Plasminogen (Nayeem et al. 1999; Maretzky et al. 2005). Eine konstitutive Sekretion von löslichem L1CAM konnte bei Ovarialkarzinomzellen durch Spaltung von membrangebundenem L1CAM in sekretorischen Vesikeln durch ADAM10 nachgewiesen werden (Gutwein et al. 2005).

Darüber hinaus konnten eine frühe Metastasierung (Kaifi et al. 2007) und eine erhöhte Chemoresistenz von Tumorzellen (Sebens Mürköster et al. 2007; Stoeck et al. 2007) unter dem Einfluss von L1CAM beobachtet werden. Bei Patienten mit einem Kolon- oder Ovarialkarzinom sind vermehrte Expression und erhöhtes Serumlevel von L1CAM mit einer schlechten Prognose verknüpft (Kaifi et al. 2007; Fogel et al. 2003).

Beim PDAC konnte die Expression von L1CAM mit einer perineuralen Invasion und ebenfalls einer schlechten Prognose assoziiert werden (Ben et al. 2010). Dabei wird L1CAM in 92,7 % der primären PDAC exprimiert sowie in 80 % der Lymphknotenmetastasen und 100 % der Lebermetastasen. Interessanterweise wird schon in Vorläuferläsionen eine Expression von L1CAM beobachtet, welche mit dem PanIN-Grad signifikant ansteigt und eine Beteiligung von L1CAM bei der Tumorentstehung vermuten lässt (Bergmann et al. 2010). In Übereinstimmung damit wurde *in vitro* demonstriert, dass L1CAM Adhäsion, Migration und Chemoresistenz von prä-malignen Pankreasgangepithelzellen (Zelllinie H6c7) und der PDAC-Zelllinie Panc1 *in vitro* erhöht (Geismann et al. 2009; Issa et al. 2009; Sebens Mürköster et al. 2009), die Angiogenese fördert (Issa et al. 2009) und zu einer ausgeprägten Apoptoseresistenz führt (Sebens Mürköster et al. 2007). Eine deutlich erhöhte Tumorigenität und Metastasierung von L1CAM-überexprimierenden H6c7-Zellen *in vivo* unterstützt diese Ergebnisse (Schäfer et al. 2012). Des Weiteren können Myofibroblasten, die ein wesentlicher Bestandteil des PDAC-Stromas sind, die Expression von L1CAM in H6c7-Zellen über die Sekretion von TGF- $\beta$ 1 erhöhen (Geismann et al. 2009). Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse unterstreichend, konnte eine Antikörper vermittelte Blockade von L1CAM das Wachstum von Ovarialkarzinomen *in vivo* reduzieren (Arlt et al. 2006) sowie ein besseres Ansprechen gegenüber Chemotherapeutika von

Ovarialkarzinomzellen (Stoeck et al. 2007) und Pankreaskarzinomzellen (Sebens Mürköster et al. 2007; Schäfer et al. 2012) *in vitro* und *in vivo* bewirken.

Diese vielfältigen Wirkungen von L1CAM bei der malignen Progression von Tumoren werden über unterschiedliche Signalwege vermittelt. Dabei scheinen sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Domäne von L1CAM eine Rolle zu spielen (Raveh et al. 2009; Mechtersheimer et al. 2001; Gavert et al. 2005). Die zytoplasmatische Domäne von L1CAM kann über die konstitutive Aktivierung der extrazellulären, signal-regulierten Kinase (ERK) eine Induktion ERK-regulierter Gene verursachen. Dazu gehören unter anderem Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , welches bei der Metastasierung eine Rolle spielt, sowie Cathepsin-L und -B, welche eine Matrixinvasion unterstützen (Silletti et al. 2004). Außerdem ist eine verstärkte Phosphorylierung von ERK und der *focal adhesion kinase* (FAK) sowie eine erhöhte Expression von Bcl-2 in Anwesenheit von L1CAM mit einer erhöhten Apoptoseresistenz verbunden (Stoeck et al. 2006). Des Weiteren kann L1CAM eine Induktion der Transkriptionsfaktoren HOXA9 und AP2 $\alpha$  bewirken sowie eine Herunterregulierung der Gene *STK39* und *IER3*, welche Apoptose induzieren (Gast et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass L1CAM über eine Interleukin-1 $\beta$ -vermittelte Freisetzung von Stickstoffmonoxid und die damit verbundene Hemmung von Caspasen ebenfalls an der Vermittlung von Apoptoseresistenz beteiligt ist (Sebens Mürköster et al. 2007).

L1CAM trägt somit offenbar über eine Vielzahl von Mechanismen zur Initiation und Progression von Tumoren bei.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das PDAC zählt mit einer 5-Jahre Überlebensrate von 8 % zu den tödlichsten Krebsarten unserer Zeit. Charakteristisch für diesen Tumor ist ein ausgeprägtes Tumorstroma, welches aus Matrixproteinen, Fibroblasten und Immunzellen besteht und vielfältige Wechselwirkungen mit den Krebszellen aufweist. Im Tumorstroma herrscht ein immunsuppressives Milieu vor, an dessen Bildung Tregs beteiligt sind. Das Vorkommen von Tregs im Pankreasgewebe steigt mit abnehmender Differenzierung des PDAC, ist aber auch bereits im Blut und Gewebe von Patienten mit CP erhöht. Bei Patienten mit PDAC ist eine erhöhte Zahl von Tregs im Tumorstroma mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Zudem ist in über 80 % von Primärtumoren und Metastasen des PDAC die Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in den Tumorzellen nachweisbar. Auch die Expression von L1CAM ist mit einer schlechten Prognose verbunden. Sowohl das Vorkommen von Tregs als auch die Expression von L1CAM sind bereits in Vorläuferläsionen des PDAC erhöht und steigen mit zunehmendem PanIN-Grad an.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob L1CAM das Vorkommen von Tregs im PDAC möglicherweise beeinflusst und welche Effekte L1CAM in diesem Zusammenhang auf T-Zellen ausübt.

Tregs und Teffs wurden dafür mittels magnetischer Zellseparation aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 72 Stunden in direkter Cokultur mit Pankreasgangepithelzellen kultiviert. Die humane Pankreasgangepithelzelllinie H6c7 wurde dabei als Modell für benigne Epithelzellen verwendet, während die PDAC-Zelllinie Panc1 zur Simulation der Situation im Tumor verwendet wurde. Beide Zelllinien wurden jeweils mit hoher oder geringer Expression von L1CAM eingesetzt. Im Anschluss wurden die T-Zellen bezüglich des Phänotyps, der Proliferation und der Migration untersucht. Die Charakterisierung des Phänotyps umfasste die Färbung und durchflusszytometrische Analyse der Marker CD4, CD25, CD69, CD49d und CD127. Die Proliferation wurde mittels Ki-67-Färbung bestimmt. Die Analyse des Migrationsverhaltens erfolgte in einer modifizierten Boyden-Kammer, wobei bestimmt wurde, wie viele mit CFSE markierte T-Zellen durch eine zellpermeable Membran migrierten.

Außerdem wurden T-Zellen aus Blut und Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC und CP durchflusszytometrisch analysiert und die Ergebnisse mit klinischen Parametern korreliert.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Rolle von L1CAM bei der Anreicherung von T-Zellen im PDAC und dessen maligner Progression bei und können eine Grundlage für die Entwicklung dringend benötigter neuer Therapieansätze dieser Erkrankung bilden.

## 2 Material

### 2.1 Pankreasgangepithelzelllinien

Zelllinie	Herkunft	Transduzierte Varianten	Bezugsquelle transduzierte Zelllinie	Bezugsquelle parentale Zelllinie
<b>H6c76c7 (H6c7)</b>	Humanes Pankreasgang-epithel	<b>H6c7-mock</b> Kontrollvektor pcDNA3.1	Zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. H.-P. Altevogt, DKFZ, Heidelberg	Prof. Dr. M.S. Tsao, Ontario Cancer Center, Toronto, Kanada
		<b>H6c7-L1CAM</b> Vektor für humanes L1CAM		
<b>Panc1</b>	Humanes PDAC	<b>Panc1<sup>L1high</sup></b> pLVX Vektor mit shRNA gegen Feuerfliegen Luziferase	Zur Verfügung gestellt durch Dr. D. Wicklein, Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, UKE Hamburg	ATCC, USA
		<b>Panc1<sup>L1low</sup></b> pLVX Vektor mit shRNA gegen L1CAM		

### 2.2 Patienten

Blut und Pankreasgewebe von 22 PDAC-Patienten (Altersmedian: 63,5) und von 5 CP-Patienten (Altersmedian: 61) wurden von der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Kiel und der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel bezogen. Als Kontrolle wurde das Blut von 22 altersangepassten gesunden Spendern (Altersmedian: 61) bei vorliegendem Einverständnis nach erfolgter Aufklärung analysiert.

Die Versuche wurden von der Ethikkommission des UKSH bewilligt (Referenznummer D429/09).

## 2.3 Antikörper und Reagenzien

### 2.3.1 Primärantikörper für Färbungen

#### Spezifische Antikörper

Alexa Fluor488-konjugiertes anti-CD127 (mIgG1, Klon: HCD127)	Biolegend, Fell
APC-konjugiertes anti-CD25 (Klon: BC96)	eBioscience, Frankfurt
APC-konjugiertes anti-CD25 (mIgG2b, Klon: 4E3)	Biolegend, Fell
APC-konjugiertes anti-CD69 (mIgG1, Klon: FN50)	Biolegend, Fell
FITC- oder APC-konjugiertes mIgG2b (Klon: MPC/11)	Biolegend, Fell
FITC-konjugiertes anti-CD4 (Klon: OKT4)	eBioscience, Frankfurt
FITC-konjugiertes anti-CD4 (mIgG2b, Klon: OKT4)	Biolegend, Fell
FITC-konjugiertes anti-Ki-67 (mIgG1, Klon: 35/Ki-67)	BD Bioscience, Heidelberg
L1-14.10 (mIgG1)	Acris, Herford
L1-9.3 (mIgG1)	*
PE- oder Biotin-konjugiertes mIgG2a (Klon: MOCP-173)	Biolegend, Fell
PE-konjugiertes anti-CD25 (IgG2b, Klon: 4E3)	Milteyi Biotec, Bergisch Gladbach
PE-konjugiertes anti-CD49d (mIgG1, Klon: 9F10)	Biolegend, Fell
PE-konjugiertes anti-FoxP3 (ratIgG2a, Klon: PCH101)	eBioscience, Frankfurt
PerCP/Cy5.5-konjugiertes anti-CD127 (mIgG1, Klon: HCD127)	Biolegend, Fell
PerCP/Cy5.5-konjugiertes anti-CD4 (mIgG2b, Klon: OKT4)	Biolegend, Fell
PerCP/Cy5.5-konjugiertes anti-CD49d (mIgG1, Klon: 9F10)	Biolegend, Fell

\* generiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Gerd Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg

#### Isotypkontrollen

FITC-, PE-, Streptavidin-PerCP/Cy5.5- oder Biotin-konjugiertes mIgG1 (Klon: MOCP-21)	Biolegend, Fell
PE-konjugiertes anti-ratIgG2a	eBioscience, Frankfurt
PE-konjugiertes mIgG1	eBioscience, Frankfurt



### 2.3.2 Sekundärreagenz für Färbungen

EnVision Peroxidase-markierte anti-Maus-Antikörperlösung	Dako, Hamburg
mit EnVision AEC-Plus-Substratchromogen	Dako, Hamburg
Streptavidin-PerCP/Cy5.5	Biolegend, Fell

### 2.3.3 Antikörper und Beads für T-Zell-Isolation

<i>Anti-Biotin MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
<i>Beads-konjugiertes anti-CD25 (mIgG1)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
<i>Biotin-konjugiertes anti-CD49d (mIgG2b, Klon: MZ18/24A9)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
<i>Biotin-konjugiertes anti-CD127 (mIgG2a, Klon: MB15/18C9)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
<i>CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail (aus dem CD4+ T-Cell Enrichment Kit II)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
<i>CD4+CD25+ Regulatory T-Cell Isolation Kit, human</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

### 2.3.4 Weitere Antikörper

Kontroll-IgG1-Fc (Klon: P01857)	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes humanes L1CAM-Fc (IgG1, Klon: CAA42508)	R&D Systems, Wiesbaden

### 2.3.5 Weitere Reagenzien

[ <sup>3</sup> H]-Methyl-Thymidin	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Sigma Aldrich, München
<i>T-cell activation/expansion beads (Aktivierungsbeads)</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

## 2.4 Medien und Medienzusätze

Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin (0,67 µg/ml)	PAA-Laboratories, Cölbe
RPMI-1640-Medium (für Panc1 Zellen)	PAA Laboratories, Cölbe
mit 1 % L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
und 10 % fötalem Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Biochrom, Berlin
und 1 % Na-Pyruvat	PAA-Laboratories, Cölbe
RPMI-1640-Medium und K-SFM (1:1) (für H6c7-Zellen)	PAA Laboratories, Cölbe
mit 0.5 % L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
und 5 ng/mL epidermalem Wachstumsfaktor	Invitrogen, Karlsruhe
und 5 % FCS	Biochrom, Berlin
und 50 µg/mL Rinderhypophysenextrakt	Invitrogen, Karlsruhe
X-Vivo-Medium (für Cokulturen)	Lonza, Köln

## 2.5 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Ethanol 70 %, vergällt	Walter, Kiel
Fixations-/Permeabilisierungslösung (Fix-Perm-Lösung)	eBioscience, Frankfurt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
MACS-Puffer	
mit PBS	PAA Laboratories, Cölbe
und 0,1 % Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
( <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	
und 2 mM EDTA	Merck, Darmstadt
Mayers Häkalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol 100 %	Merck, Darmstadt
Pancoll-Lymphozyten-Separations-Medium	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Permeabilisierungspuffer (Perm-Puffer)	eBioscience, Frankfurt
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Cölbe

## 2.6 Geräte

beta-Szintillationszähler 1450 Mikrobeta	Inotech, Nabburg
Brutschrank CO <sub>2</sub> -Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Schwerte
FACS Calibur (mit Argon Laser)	BD, Heidelberg

Fluorometer Tecan Infinite 2.0	Tecan, Mainz-Kastel
Gasbrenner	Integra Biosciences, Schweiz
Lichtmikroskop AE2000	Motic, Wetzlar
Lichtmikroskop Evos XL Core	AMG, USA
MiniMACS mit MS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Omnilab, Hamburg
QuadroMACS mit LD-und LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Schüttler Vortex Genius 3	Ika, China
Sterilbank HERAsafe KS	Thermo Scientific, Schwerte
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Cellharvester Filter Mate Harvester	Perkin-Elmer, Rodgau
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge Heraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen

## 2.7 Pipetten

Finnpipette 0,2-2 µl	Thermo Scientific, Schwerte
Finnpipette 2-20 µl	Thermo Scientific, Schwerte
Finnpipette 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte
Finnpipette 100-1000 µl	Thermo Scientific, Schwerte
Multipipette	Thermo Scientific, Schwerte
<i>Pipetboy</i>	Integra Biosciences, Schweiz

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

12-Well-Platte	Greiner, Frickenhausen
24-Well-Platte, 3 µm Porengröße	Greiner, Frickenhausen
6-Well-Platte	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Platten Rundboden	Greiner, Frickenhausen
Corning Cellstrainer, 40 µm	Sigma Aldrich, München
Deckglas	Menzel Gläser, Braunschweig
Einmalskalpell	B. Braun, Melsungen
FACS-Röhrchen	Sterilin, Großbritannien
Glasfaserfilter Printet Filtermat A	Perkin-Elmer, Rodgau

Nitril-Untersuchungshandschuhe	Ansell GmbH, München
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
Parafilm „M“	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Pasteurpipette Glas 230 mm	Assistent, Sondheim
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze 10 ml	B. Braun, Melsungen
Transwell-Einsätze, 3 µm Porengröße	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche 75 ml	Sarstedt, Nümbrecht

## 3 Methoden

### 3.1 Isolation von Tregs und CD4+ Teffs aus dem Blut gesunder Spender

#### 3.1.1 Prinzip der T-Zell-Isolation

Um T-Zellen aus menschlichem Spenderblut zu isolieren, müssen zunächst die mononukleären Zellen (MNZ) mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden. Aus diesen werden dann die CD4+ T-Zellen nach dem Prinzip der *magnetic bead separation* isoliert. Dies funktioniert, indem alle unerwünschten Zellen mit an magnetischen Teilchen gekoppelten Antikörpern markiert und in einem magnetischen Feld zurückgehalten werden, während die gewünschten Zellen im Sinne einer negativen Selektion aufgefangen werden. Ebenfalls werden wiederum aus den CD4+ T-Zellen die Teffs und Tregs mittels negativer Selektion gewonnen. Lediglich um einen Vergleich von negativ isolierten Tregs zu positiv isolierten Tregs bezüglich ihrer immunsuppressiven Potenz anstellen zu können, wurden Tregs alternativ positiv, d.h. durch direkte Markierung mit anti-CD25-Antikörpern, isoliert.

#### 3.1.2 Isolation von MNZ aus dem Blut gesunder Spender

Das Spenderblut wurde von der Blutspendebank im CITTI-Park Kiel zur Verfügung gestellt. Dort wurde aus dem Vollblut bereits ein Leukozyten- und Erythrozytenkonzentrat hergestellt, welches sich beim Durchlaufen einer Leukozytenreduktionskammer mit kegelförmiger Form und stufenförmigem Aufbau (Kegel) durch Trennung von Blutplasma und Thrombozyten bildete. Die Spender waren entsprechend den Richtlinien der Blutspendebank gesund und haben der Verwendung des Blutes für medizinische Forschungszwecke zugestimmt.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. In eine Kulturflasche wurden 20 ml PBS vorgelegt. Dann wurde der Kegel von außen mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Der Schlauch am dicken Ende wurde mit einem Skalpell abgetrennt. Daraufhin wurde der Kegel mit dem eröffneten Ende nach unten auf die Öffnung der Kulturflasche gesetzt. Der obere Schlauch wurde nun ebenfalls abgetrennt. Auf die entstandene Öffnung am Kegel wurde eine mit Luft gefüllte Spritze gesetzt und die Luft in den Kegel gepresst. Das Blutzellkonzentrat aus dem Kegel (ca. 5 ml) wurde so in der Kulturflasche aufgefangen. Diese wurde mit PBS auf 140 ml aufgefüllt. In vier 50-ml-Röhrchen wurden je 15 ml Pancoll-Lymphozyten-Separations-Medium vorgelegt. Darauf wurden mit Hilfe des *Pipetboys* langsam je 35 ml der Blut-PBS-Suspension gegeben. Die Röhrchen wurden im Anschluss

bei 1500 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 25 Minuten (min) zentrifugiert, wobei Beschleunigung und Bremse auf die niedrigste Stufe 1 eingestellt waren. Im Anschluss wurden die Überstände bis 0,5 cm über dem entstandenen weißen Ring, der die MNZ enthielt, abgesaugt. Zwei der weißen Ringe wurden nun möglichst vollständig aufgenommen und in je ein neues 50 ml Röhrchen zusammengelegt. Die Röhrchen wurden mit kaltem PBS (4°C) auf je 50 ml aufgefüllt und dann bei 1500 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Pellets mit je 20 ml PBS resuspendiert und dann mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Daraufhin wurden die Röhrchen bei 1200 U/min für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände abgesaugt und die Pellets mit je 15 ml X-Vivo-Medium resuspendiert und zusammengelegt. Die Zellsuspension wurde bis zum Folgetag bei 4°C gelagert.

### **3.1.3 Isolation von CD4+ T-Zellen aus MNZ**

Um die MNZ zu zählen, wurden in ein Reaktionsgefäß 990 µl MACS-Puffer vorgelegt und 10 µl der Zellsuspension zugegeben und gemischt. Davon wurden 10 µl abgenommen und in die Zählkammer gegeben. Anschließend wurden  $50 \times 10^7$  Zellen in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt und dieses bei 1200 U/min für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und auf das Pellet 2 ml MACS-Puffer und 0,25 ml Biotin-Antikörper-Cocktail (mit Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  und Glykophorin A) gegeben. Damit wurden alle Zellen markiert, die nicht CD4+ waren. Die Suspension wurde 10 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden 1,5 ml MACS-Puffer und 0,5 ml anti-Biotin-*Beads* zugefügt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Währenddessen wurden am QuadroMACS-Magneten zwei LS-Säulen angebracht. Darunter wurden zwei 15-ml-Röhrchen auf Eis bereitgestellt. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 2,5 ml MACS-Puffer aufgespült. Auf die LS-Säulen wurden nun je 3 ml MACS-Puffer gegeben. Sobald diese nicht mehr tropften, wurde die Zellsuspension in 0,5-ml-Schritten auf beide Säulen verteilt. Kurz vor Trockenlaufen der Säulen wurden jeweils 0,5 ml MACS-Puffer nachgegeben. Die letzten 0,5 ml der Zellsuspension wurden gleichmäßig auf beide Säulen verteilt. Im Anschluss wurden mit 2 ml MACS-Puffer pro Säule die Pelletreste aufgespült und in 1-ml-Schritten auf die Säulen gegeben. Schließlich wurde zweimal mit 1 ml MACS-Puffer pro Säule nachgespült. Von den so in Suspension erhaltenen CD4+ T-Zellen wurden 10 µl abgenommen und in einem Reaktionsgefäß mit 90 µl MACS-Puffer suspendiert. Diese wurden dann gezählt.

### **3.1.4 Negative Selektion von Teffs und Tregs aus CD4+ T-Zellen**

Für die Isolation der Teffs wurden  $1 \times 10^7$  CD4+ T-Zellen in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Das Restvolumen wurde für die Isolation der Tregs verwendet. Beide Röhrchen wurden zentrifugiert und abgesaugt. Auf das Pellet für die Isolierung der Teffs wurden unter Aufspülen 90  $\mu$ l MACS-Puffer und 10  $\mu$ l anti-CD25-*Beads* gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde dann mit 1 ml MACS-Puffer aufgespült, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 0,5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Eine LD-Säule wurde an dem QuadroMACS-Magneten angebracht und mit 2 ml MACS-Puffer vorgespült. Sobald diese nicht mehr tropfte, wurden die 0,5 ml der Zellsuspension zugegeben. Die Pelletreste wurden zweimal mit je 0,5 ml MACS-Puffer aufgespült und auf die Säule gegeben. Der nächste Schritt erfolgte immer kurz vor Trockenlaufen der Säule. Schließlich wurde die Säule zweimal mit je 0,5 ml MACS-Puffer nachgespült.

Parallel wurde für die Isolierung der Tregs auf das Pellet 20  $\mu$ l MACS-Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen, 15  $\mu$ l Biotin-konjugiertes anti-CD49d/ $1 \times 10^7$  Zellen und 15  $\mu$ l Biotin-konjugiertes anti-CD127/ $1 \times 10^7$  Zellen gegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden zu der Suspension 240  $\mu$ l MACS-Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen und 60  $\mu$ l anti-Biotin-*Beads*/ $1 \times 10^7$  Zellen gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt, aufgemischt, zentrifugiert und abgesaugt. Das Pellet wurde in 0,5 ml MACS-Puffer/ $10 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Im Folgenden wurde mit der Suspension in gleicher Weise wie bei den Teffs verfahren, um die Tregs mittels QuadroMACS-Magneten zu isolieren. Dann wurde die Suspension mit Tregs zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und das Pellet mit 200  $\mu$ l X-Vivo-Medium resuspendiert. Teffs und Tregs wurden schließlich gezählt.

### **3.1.5 Negative Selektion von Teffs und positive Selektion von Tregs aus CD4+ T-Zellen**

Es wurden  $1 \times 10^8$  CD4+ T-Zellen zentrifugiert und auf das Pellet unter Aufspülen 90  $\mu$ l MACS-Puffer und 10  $\mu$ l anti-CD25-*Beads* pro  $10^7$  anfangs eingesetzter MNZ gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden 20 ml MACS-Puffer hinzugegeben, resuspendiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend gründlich in 0,5 ml MACS-Puffer resuspendiert. Eine MACS-MS-Säule wurde auf einen MiniMACS-Magneten gesetzt und mit 0,5 ml MACS-Puffer vorgespült. Dann wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und der Durchlauf in einem 15-ml-Röhrchen aufgefangen. Nachdem die Zellen vollständig

durchgelaufen waren, wurde die Säule dreimal mit 0,5 ml MACS-Puffer gewaschen. In der durchgelaufenen Suspension befanden sich nun CD4+CD25- Tregs.

Die Säule wurde vom Magneten genommen und auf eine zweite MS-Säule gesetzt, unter die ein weiteres 15-ml-Röhrchen gestellt wurde. Nun wurden 0,5 ml MACS-Puffer auf die obere Säule gegeben und mittels eines Stempels in die untere Säule gedrückt. Nachdem die Zellen durch die untere Säule gelaufen waren, wurde diese dreimal mit 0,5 ml MACS-Puffer gewaschen. Die durchgelaufene Suspension enthielt nun ebenfalls CD4+CD25- Tregs, welche mit den Tregs aus dem ersten Durchgang gepoolt wurden.

Die untere Säule wurde nun vom Magneten genommen und auf ein 15-ml-Röhrchen gesetzt. Dann wurde 1 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und mit einem Stempel zügig durchgedrückt. Die Suspension enthielt nun CD4+CD25+ Tregs. Diese wurden in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen. Dann wurden die Zellen gezählt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und das Pellet in X-Vivo-Medium resuspendiert.

## **3.2 Zellkultur der H6c7- und Panc1-Zelllinie und Cokulturen**

### **3.2.1 Zellkultur der H6c7- und Panc1-Zelllinie**

Die H6c7-Zelllinie und Panc1-Zelllinie wurden im jeweiligen Kulturmedium unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 85 % kultiviert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Bei Erreichen einer 80 % Konfluenz des Zellrasens wurde zum Teilen der Zellen das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 1x Trypsin/EDTA für 15 min abgelöst. Zum Stoppen des Ablösevorgangs wurden 5 ml des jeweiligen Mediums hinzugefügt. Im Anschluss wurde die Suspension in ein 50-ml-Röhrchen überführt und bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und mit je 10 ml Medium in neue Zellkulturflaschen passagiert. Alle transduzierten Zelllinien wurden unter Zusatz von 0,67 µg/ml Puromycin kultiviert, welches jedoch in den Versuchsansätzen ausgelassen wurde.

### **3.2.2 Bestimmung der Expression von L1CAM in den Pankreasgangepithelzelllinien**

Zur Überprüfung der Expression von L1CAM in H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen sowie Panc1<sup>L1low</sup>- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen wurden diese vor Einsatz in Cokulturen auf L1CAM gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Dafür wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen jeder Zelllinie in 1 ml des



jeweiligen Mediums aufgenommen und jeweils auf ein steriles Deckglas in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläser mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung in je 0,5 ml 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur (RT) unter dem Abzug (die Deckgläser blieben dafür in der 12-Well-Platte). Im Anschluss erfolgten drei Waschschrte mit je 1 ml PBS für 5 min. Es folgte der Peroxidaseblock mit je 0,5 ml eiskaltem Methanol mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 min unter dem Abzug. Nach 3 x 5 min Waschen mit PBS wurden die Deckgläser 20 min bei RT in 4 % BSA/PBS inkubiert. Dazu wurden die Deckgläser aus dem Well genommen und mit der Zellseite auf einen Tropfen (100 µl) 4 % BSA/PBS in einer Feuchtkammer (eine Box mit nassen Tüchern ausgelegt) gelegt. Die überschüssige Lösung wurde vorsichtig abgetupft. Anschließend wurden die Deckgläser auf 100 µl anti-L1CAM-Ak-Lösung (L1-9.3 10 µg/ml) in 1 % BSA/PBS gelegt und für 45 min bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Dann erfolgten erneut drei Waschschrte für jeweils 5 min in PBS. Nun wurden die Deckgläser auf je 1 Tropfen EnVision Peroxidase-markierte anti-Maus-Antikörperlösung gegeben und für 30 min bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrte mit PBS in der Platte. Anschließend folgte die Entwicklung mit je 1 Tropfen EnVision AEC-Plus-Substratchromogen in der Feuchtkammer für 5-30 min. Daraufhin erfolgten erneut drei Waschschrte mit PBS. Für die Kernfärbung wurden die Deckgläser für 2-5 min bei RT in Mayers Hämalaunlösung gegeben und anschließend unter fließendem Leitungswasser 15 min gebläut. Die Deckgläser wurden mit 1 Tropfen Kaisers Glycingelatine auf einem Objektträger eingedeckelt.

### **3.2.3 Anlegen der Cokultur von H6c7- und Panc1-Zellen mit T-Zellen**

Folgende Arbeitsschrte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Es wurden je  $5 \times 10^3$  H6c7-L1CAM- oder H6c7-mock-Zellen beziehungsweise Panc1<sup>L1high</sup>- oder Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen in je 100 µl des jeweiligen Mediums pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Platte wurde 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde die Platte bei 1200 U/min für 7 min zentrifugiert und die Überstände wurden abgesaugt. Nun wurden die Wells in gleichen Teilen entweder unbehandelt belassen oder es wurden  $1 \times 10^4$  Teffs oder Tregs pro Well, jeweils mit oder ohne Zusatz von  $5 \times 10^3$  Aktivierungsbeads pro Well hinzugefügt. So resultierten sechs Bedingungen für jede Zelllinie. Alle Wells wurden mit X-Vivo-Medium auf je 125 µl aufgefüllt. Dann wurde die Platte für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### **3.2.4 Kultur von Teffs auf L1CAM-Fc- und Kontroll-Fc-beschichteten Platten**

Auf eine 96-Well-Rundbodenplatte wurden je 100 µl pro Well von rekombinantem humanem L1CAM-Fc oder Kontroll-IgG1-Fc in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS gegeben. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und 100 µl FCS pro Well hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min erfolgten zwei Waschrritte mit 100 µl PBS pro Well, einer Inkubationszeit von 10 min bei 4°C und Zentrifugation für 7 min bei 1200 U/min sowie anschließendem Absaugen der Überstände. Dann wurden je  $1 \times 10^4$  frisch isolierte Teffs und  $5 \times 10^3$  Aktivierungsbeads pro Well in je 200 µl X-Vivo-Medium hinzugefügt und für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Teffs, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, auf CD25, CD69 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

### **3.2.5 Kultur von Teffs in Überständen von H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen**

Um Überstände von H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen zu gewinnen, wurden von beiden Zelllinien je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in 2 ml ihres jeweiligen Mediums ohne Puromycin auf 6-Well-Platten gegeben. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert und die Platten dann für 7 min mit 1200 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch je 2 ml X-Vivo-Medium pro Well ersetzt. Dann erfolgte eine Kultivierung für 72 Stunden. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen. Diese wurden erneut zentrifugiert und dann für die Kultur mit Teffs verwendet.

Dafür wurden  $1 \times 10^4$  frisch isolierte Teffs in je 125 µl H6c7-mock- oder H6c7-L1CAM-konditioniertem Medium zusammen mit je  $5 \times 10^3$  Aktivierungsbeads pro Well auf eine 96-Well-Rundbodenplatte gegeben. Nach 72 Stunden im Brutschrank wurden die Teffs, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, auf CD25, CD69 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

## **3.3 Durchflusszytometrie**

### **3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) dient dem Zählen und der Charakterisierung von Zellen in einer Suspension mittels Streulicht und Fluoreszenz.

Dazu wird ein hydrodynamischer Flüssigkeitsstrahl erzeugt, der einen Laserstrahl passiert, dessen Licht durch die sich in Lösung befindlichen Zellen gestreut wird. Mehrere Detektoren

nehmen sowohl das linear gestreute Licht (*forward scatter*, FSC), als auch das seitwärts gestreute Licht (*side scatter*, SSC) auf. FSC lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße und SSC auf die Granularität der Zelle zu. Zusätzlich können Fluorochrome detektiert werden, falls sie Licht einer anderen Wellenlänge als der des Laserstrahls emittieren. So können Fluorochrom-konjugierte Antikörper zur quantitativen Analyse von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen verwendet werden. Dabei ist das emittierte Licht proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers pro Zelle.

### 3.3.2 Reinheitsfärbung frisch isolierter Teffs und Tregs

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten T-Zellen wurden MNZ, CD4+ T-Zellen, Teffs und Tregs mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen bestimmte Zellmarker gefärbt. Die anschließende FACS-Analyse erlaubte eine phänotypische Charakterisierung und Zählung der Zellen.

Von den MNZ, CD4+ T-Zellen, Teffs und Tregs wurden jeweils mindestens  $2 \times 10^3$  Zellen gleichmäßig auf 3 FACS-Röhrchen verteilt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift. Dazu wurden die Röhrchen mit je 200 µl MACS-Puffer aufgefüllt und dann bei 1200 U/min für 7 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden in Dunkelheit durchgeführt. Auf die Pellets wurden entsprechend Tabelle 1 jeweils 10 µl der mit MACS-Puffer verdünnten Antikörperlösungen A, B oder C gegeben. Nach kurzem Aufrütteln wurden die Zellen für 15 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Waschschrift mit MACS-Puffer. Die Pellets wurden dann mit jeweils 50 µl einer einprozentigen Formalinlösung fixiert und mit einem *FACS Calibur* analysiert.

**Tabelle 1: Färbeschema zur Reinheitsfärbung von Teffs und Tregs**

<b>Ak-Lösung</b>	<b>Antikörper (Verdünnungsverhältnis in MACS-Puffer)</b>
<b>A</b>	mIgG2b-FITC(1:20)/mIgG2b-APC(1:80)/ mIgG1-PerCP5.5(1:20)/mIgG2a-PE(1:600)
<b>B</b>	CD4-FITC(1:20)/CD25-APC(1:20)/CD127-PerCP/C5.5(1:20)/ CD49d-PerCP5.5(1:20)/CD45RO-PE(1:10)
<b>C</b>	CD4-FITC(1:20)/CD25-PE(1:10)

### 3.3.3 Analyse des immunsuppressiven Potenzials von Tregs durch Bestimmung der Teff-Proliferation im Vergleich zu positiv isolierten Tregs

Um das immunsuppressive Potential der negativ isolierten Tregs zu untersuchen, wurde deren Einfluss auf die Proliferation von autologen Teffs mittels Ki-67-Färbung und [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay überprüft. Ferner wurde die Funktionalität der negativ isolierten Tregs mit der von positiv isolierten Tregs verglichen. Dazu wurden pro Well 5 x 10<sup>4</sup> Teffs in einem Verhältnis von 50:1 zusammen mit negativ isolierten Tregs oder positiv isolierten Tregs (siehe 3.1) zusammen mit 25 x 10<sup>3</sup> Aktivierungsbeads in X-Vivo-Medium in 96-Well-Rundbodenplatten eingesetzt. Alle Wells wurden mit X-Vivo-Medium auf ein Volumen von 125 µl aufgefüllt und die Zellen für 3-5 Tage kokultiviert. Die Proliferation wurde an Tag 3 mittels Analyse von Ki-67 bestimmt. Dieses Protein befindet sich in der Interphase im Zellkern, während es in der G0-Phase abwesend ist. Alternativ erfolgte die Messung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Methyl-Thymidin, welches an Tag 5 zugefügt wurde.

Für die Ki-67-Färbung wurde die Rundbodenplatte an Tag 3 für 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert und die Überstände anschließend abgesaugt. Auf jedes Well wurden daraufhin 100 µl kaltes PBS gegeben und die Platte für 15 min auf Eis gestellt. Zum Ablösen der T-Zellen wurde nun nach fünfmaligem Aufspülen ein Volumen von 100 µl pro Well entnommen und mit den darin enthaltenen T-Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Dabei wurden die T-Zellen aus Wells, welche sich in ihrer Belegung glichen, zusammengefasst. Anschließend wurden die gepoolten T-Zellen jeweils gleichmäßig auf FACS-Röhrchen verteilt. Diese wurden zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Auf die Pellets wurden je 50 µl Fix-Perm-Lösung gegeben und die Zellen für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 200 µl Perm-Puffer pro Röhrchen. Für die intrazelluläre Färbung wurden je 10 µl mit Perm-Puffer verdünnte Antikörperlösung mit Ki-67-FITC (Verdünnungsverhältnis 1:125) zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde erneut mit Perm-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit 50 µl einprozentiger Formalinlösung pro Röhrchen fixiert und mit einem *FACS Calibur* durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Analyse der [<sup>3</sup>H]-Methyl-Thymidin-Aufnahme wurde an Tag 5 der Kokultur [<sup>3</sup>H]-Methyl-Thymidin in einer Konzentration von 1 µCi pro Well zugefügt und die Kulturen über Nacht bei 37°C weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem *Cellharvester* auf einen Glasfaserfilter übertragen und mehrmals mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. So wurden die Zellen auf dem Filter fixiert und die nicht eingebauten Nukleotide entfernt. Der Filter wurde 20 min bei 50°C getrocknet, der Filterboden abgeklebt und dann mit 30 µl Szintillationsflüssigkeit pro Well bestückt. Nach Versiegelung des Filters erfolgte die Analyse in *counts per minute* (cpm) mit einem beta-Szintillationszähler 1450 Mikrobeta.

### **3.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der Proliferation und des Phänotyps von Tregs und Teffs aus Cokultur mit H6c7- und Panc1-Zellen**

Um den Einfluss der H6c7- und Panc1-Zellen auf die T-Zellen zu untersuchen, wurden diese zunächst für 72 Stunden in direkter Cokultur kultiviert und im Anschluss die T-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Als Proliferationsmarker diente Ki-67. Die phänotypische Analyse umfasste die Oberflächenmoleküle CD4, CD25, CD69, CD49d, CD127 sowie intrazellulär FoxP3.

Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die 96-Well-Platten mit den, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, cokultivierten H6c7- bzw. Panc1-Zellen und T-Zellen bei 1200 U/min für 7 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Mehrkanalpipette mit 100 µl pro Well abgenommen, auf eine neue 96-Well-Platte übertragen und bei -20°C eingelagert. Auf jedes Well wurden anschließend 100 µl kaltes PBS gegeben und die Platte für 15 min auf Eis gestellt. Zum Ablösen der T-Zellen wurde nun nach fünfmaligem Aufspülen ein Volumen von 100 µl pro Well entnommen und mit den darin enthaltenen T-Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Dabei wurden die T-Zellen aus Wells, welche sich in ihrer Belegung glichen, zusammengefasst. Anschließend wurden die gepoolten T-Zellen jeweils gleichmäßig auf 3 FACS-Röhrchen verteilt. Diese wurden zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Alle folgenden Schritte wurden in Dunkelheit durchgeführt. Zu den Teffs wurden entsprechend Tabelle 2 (siehe nächste Seite) je 10 µl der mit MACS-Puffer verdünnten Antikörperlösung 1, 2 und 3, zu den Tregs Antikörperlösung 1, 3 und 4 gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurden die Zellen mit 200 µl MACS-Puffer pro Röhrchen gewaschen. Auf die Pellets wurden je 50 µl Fix-Perm-Lösung gegeben und die Zellen für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 200 µl Perm-Puffer pro Röhrchen. Für die intrazelluläre Färbung wurden entsprechend Tabelle 2 je 10 µl mit Perm-Puffer verdünnte Antikörperlösung mit IgG1-FITC, Ki-67-FITC oder FoxP3-FITC zugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde erneut mit Perm-Puffer gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit 50 µl einprozentiger Formalinlösung pro Röhrchen fixiert und mit einem *FACS Calibur* durchflusszytometrisch analysiert.

**Tabelle 2: Färbeschema zur Bestimmung von Proliferation und Phänotyp von Teffs und Tregs**

<b>Ak-Lösung</b>	<b>Ak für extrazelluläre Färbung (Verdünnungsverhältnis)</b>	<b>Ak für intrazelluläre Färbung (Verdünnungsverhältnis)</b>
<b>1</b>	mIgG2b-APC(1:20)/ mIgG2a-PE(1:10)/mIgG1-PerCP5.5 (1:20)	IgG1-FITC (1:250)
<b>2</b>	CD69-APC(1:20)/CD25-PE(1:10)/ CD4-PerCP5.5(1:20)	Ki-67-FITC (1:125)
<b>3</b>	CD69-APC(1:20)/CD25-PE(1:10)	FoxP3-FITC (1:20)
<b>4</b>	CD69-APC/CD25-PE(1:10)/ CD49d-PerCP5.5(1:20)/ CD127-PerCP5.5(1:20)	Ki-67-FITC (1:125)

### **3.3.5 Durchflusszytometrische Analyse von Teffs nach Kultur auf L1CAM-Fc-beschichteten Platten und in konditionierten Überständen**

Teffs wurden nach 72 Stunden in Kultur auf L1CAM-Fc- oder Kontroll-IgG1-Fc-beschichteten Platten (siehe 3.2.4) oder nach Kultur in H6c7-mock- oder H6c7-L1CAM-konditioniertem Medium (siehe 3.2.5) auf CD25, CD69 und Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Dazu wurden die Platten im Anschluss an die Kultivierung für 7 min bei 4°C mit 1200 U/min zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Anschließend wurden 100 µl kaltes PBS pro Well hinzugegeben und die Platten für 15 min auf Eis gestellt. Unter mehrfachem Aufspülen wurden die Teffs abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt.

Für die Ki-67-Färbung wurde wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben verfahren. Für die Oberflächenfärbung wurden lediglich 10 µl CD69-APC (1:20 verdünnt) oder CD25-PE (1:10 verdünnt) auf die Pellets gegeben, für 15 min bei RT in Dunkelheit inkubiert und wie beschrieben gewaschen und fixiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit einem *FACS Calibur*.

### **3.4 Analyse des Migrationsverhaltens von Tregs und Teffs nach Cokultur mit H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen**

#### **3.4.1 Prinzip**

Der Versuchsaufbau zur Analyse des Migrationsverhaltens der Tregs und Teffs gleicht dem Prinzip einer modifizierten Boyden-Kammer. Diese besteht aus einem Zellkulturgefäß mit zwei Kammern, welche durch eine gelöcherte Membran getrennt sind. Hier werden dafür Transwelleinsätze mit einer Porengröße von 3 µm verwendet, da durch diese T-Zellen, nicht jedoch Pankreasgangepithelzellen migrieren können. Nach Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE und Aussaat auf H6c7-mock-, H6c7-L1CAM-, Panc1<sup>L1low</sup>- oder Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen kann nach einem definierten Zeitraum mittels Fluoreszenzmessung bestimmt werden, wie viele T-Zellen jeweils durch die Transwells migriert sind.

#### **3.4.2 Durchführung**

Folgende Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Jeweils  $1 \times 10^5$  H6c7-mock-, H6c7-L1CAM-, Panc1<sup>L1low</sup>- oder Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen wurden in 500 µl des jeweiligen Mediums (ohne Puromycin) in einen Transwelleinsatz (Porengröße: 3 µm) in einer 24-Well-Platte gegeben. Die unteren Kompartimente der 24-Well-Platte wurden zusätzlich mit je 500 µl desselben Mediums befüllt. Die Zellen wurden 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

Um die T-Zellen mit CFSE zu markieren, wurde dies 1:1000 mit X-Vivo-Medium verdünnt und die T-Zellen darin für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 500 µl kaltes PBS hinzugefügt und die Zellen 5 min auf Eis gestellt. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C mit 1200 U/min für 7 min, anschließendes Absaugen der Überstände und ein erneuter Waschritt mit 500 µl kaltem PBS. Das Pellet wurde schließlich in Opti-MEM-Medium aufgenommen.

Nun wurde im unteren und oberen Kompartiment der 24-Well-Platte das Medium abgesaugt. Unten wurden 500 µl Opti-MEM-Medium mit 5 % FCS eingefüllt und oben entweder  $2 \times 10^4$  CFSE-markierte Teffs oder Tregs in je 500 µl Opti-MEM-Medium mit 5 % FCS. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Brutschrank wurden die Transwelleinsätze umgesetzt und eine Nullwertmessung der Fluoreszenz in den unteren Kompartimenten mittels des Fluorometers *Tecan Infinite 2.0* durchgeführt. Nach Zurücksetzen der Transwelleinsätze wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde nach Entfernen der Transwelleinsätze erneut die Fluoreszenz in den unteren Kompartimenten gemessen.

### **3.5 Hemmversuch: Analyse der suppressorischen Aktivität von Teffs nach Cokultur mit H6c7- oder Panc1-Zellen**

#### **3.5.1 Prinzip**

Der Versuch dient der Prüfung, ob Teffs nach Cokultur mit H6c7- oder Panc1-Zellen einen veränderten Phänotyp aufweisen und ob eine suppressorische Funktion gegenüber autologen Teffs nachweisbar ist. Dazu werden zunächst Teffs nach der Cokultur mit H6c7-mock-, H6c7-L1CAM-, Panc1<sup>L1low</sup>- oder Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen mit autologen Teffs kokultiviert. Im Anschluss wird die Proliferation der Teffs mittels Fluoreszenzfärbung von Ki-67 und anschließender durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

#### **3.5.2 Durchführung**

Die Versuchsdurchführung ist schematisch in Abbildung 1 auf Seite 31 dargestellt. Auf einer 96-Well-Platte wurde, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, eine Cokultur von H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen und Teffs in Anwesenheit von Aktivierungsbeads angelegt (Platte 1), während in eine zweite 96-Well-Platte nach gleichem Schema Panc1<sup>L1low</sup>- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen eingesetzt wurden (Platte 2). Außerdem wurde eine dritte 96-Well-Platte (Platte 3) mit  $1 \times 10^5$  CD4+ Teffs in 125  $\mu$ l X-Vivo-Medium pro Well in Anwesenheit von je  $5 \times 10^4$  Aktivierungsbeads bestückt. Alle drei 96-Well-Platten wurden für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden sie mit 1200 U/min für 7 min bei 4°C zentrifugiert, auf Eis gestellt und je 100  $\mu$ l Überstand pro Well abgenommen. Auf die Wells von Platte 1 und 2 mit Teffs wurden je 50  $\mu$ l pro Well des jeweiligen Zellmediums gegeben. Die anderen, lediglich H6c7- bzw. Panc1-Zellen enthaltenden Wells wurden mit 100  $\mu$ l Trypsin/EDTA pro Well befüllt. Nach 15-30 min auf Eis wurden die Teffs unter dreimaligem Aufspülen mit 100  $\mu$ l abgenommen und diejenigen aus gleichen Parallelansätzen in Reaktionsgefäßen gepoolt. Um das Ablösen der H6c7- und Panc1-Zellen zu erleichtern, wurden Platte 1 und 2 maximal 30 min im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgte unter fünfmaligem Aufspülen die Ablösung der H6c7- und Panc1-Zellen. Diese wurden in 15-ml-Röhrchen gepoolt und die Trypsinwirkung durch Zugabe des gleichen Volumens des jeweiligen Mediums gestoppt. Alle Zellsuspensionen wurden einmal zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Pellets in 400  $\mu$ l X-Vivo-Medium resuspendiert. Anschließend wurden alle Zellen gezählt. Dabei wurden bei den Teffs auch die teilweise mit abgelösten H6c7- bzw. Panc1-Zellen gezählt und ihr jeweiliges Verhältnis zu Teffs in jedem Ansatz bestimmt. Nachfolgend wurden die Teffs von Platte 1 und 2 im Verhältnis 1:75 zu den Teffs auf Platte 3 zugesetzt. Da die verbleibenden Epithelzellen gegebenenfalls auch einen Effekt auf die Proliferation von Teffs



haben können, wurden zu allen Teffs so viele H6c7- bzw. Panc1-Zellen hinzugefügt, dass in allen Ansätzen das gleiche Verhältnis von Teffs zu Pankreasgangepithelzellen herrschte (in Abb. 1 nicht dargestellt). Dann wurden  $5 \times 10^4$  Aktivierungsbeads pro Well hinzugefügt und alle Wells mit dem jeweiligen Medium auf 125  $\mu$ l aufgefüllt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde Platte 3 erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingelagert. Auf die erste Hälfte der Wells jeweils gleicher Ansätze wurden 20  $\mu$ l MACS-Puffer mit je 1:20 verdünntem m2b-APC und mlgG1-PerCP gegeben. Zu der zweiten Hälfte wurden 20  $\mu$ l MACS-Puffer mit je 1:20 verdünntem CD69-APC und CD4-PerCP hinzugefügt. Nach 15 min Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  wurde mit 100  $\mu$ l MACS-Puffer pro Well gewaschen. Dann wurden 50  $\mu$ l Fix-Perm-Lösung auf alle Wells gegeben. Nach 10 min bei RT folgte ein Waschschrift mit 100  $\mu$ l Perm-Puffer pro Well. Auf die mit m2b-APC vorbehandelten Wells wurden 20  $\mu$ l Perm-Puffer mit 1:100 verdünntem IgG1-FITC gegeben und auf alle anderen entsprechend Ki-67-FITC in einer 1:50-Verdünnung. Nach 10 min bei RT erfolgte ein erneuter Waschschrift mit Perm-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit 50  $\mu$ l einprozentiger Formalinlösung pro Well fixiert und mit einer Mehrkanalpipette in FACS-Röhrchen überführt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit einem *FACS Calibur*.

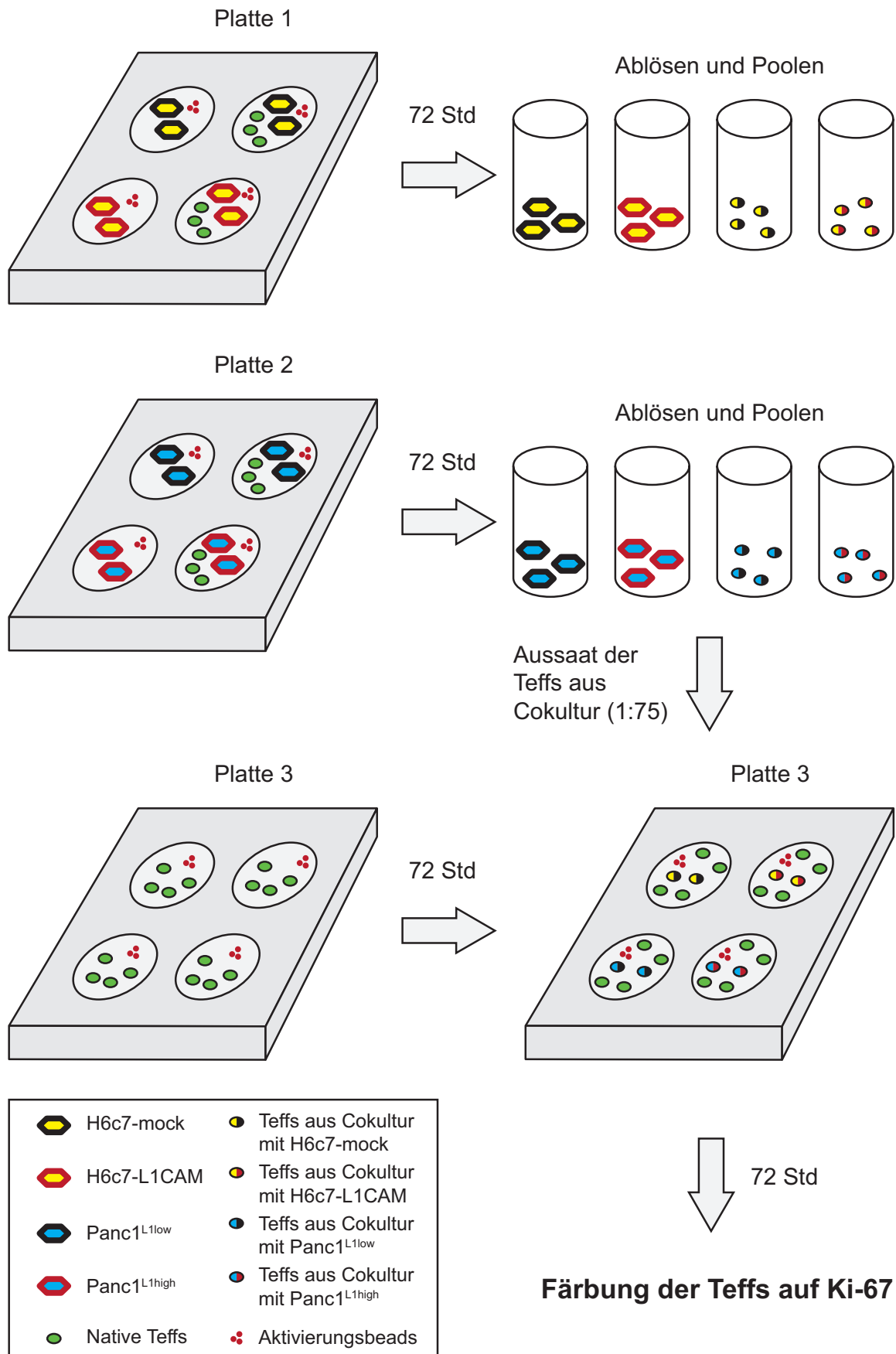


Abbildung 1: Versuchsschema für Hemmversuch von T-Effektorzellen (Teffs)

### 3.6 Charakterisierung von MNZ aus Blut und Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC

MNZ aus Blut und Gewebe von 22 Patienten mit PDAC (Altersmedian: 63,5) und 5 Patienten mit CP (Altersmedian: 61) wurden auf die Marker CD4, CD25, CD49d und CD127 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente die Analyse des Blutes von 22 gesunden, altersadaptierten Spendern (Altersmedian: 61).

Alle Arbeitsschritte wurden steril durchgeführt. Wenn als Probenmaterial Frischblut in EDTA-Röhrchen bereitgestellt wurde (Herkunft: Städtisches Krankenhaus), wurde dies 1:2 mit PBS verdünnt. Dann wurde das verdünnte Blut langsam mittels *Pipetboy* auf jeweils 15 ml Pancoll-Lymphozyten-Separations-Medium in 50-ml-Röhrchen gegeben und für 20 min mit 1700 U/min ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Die MNZ waren danach als weißlicher Leukozytenring im Überstand sichtbar. Dieser wurde vorsichtig und langsam mit kreisförmigen Bewegungen mit dem *Pipetboy* abgenommen und in ein neues 50-ml-Röhrchen überführt, welches mit kaltem PBS aufgefüllt und bei 1500 U/min für 10 min zentrifugiert wurde. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS und Zentrifugation mit 1200 U/min für 7 min wurde das Pellet in PBS aufgenommen und  $1 \times 10^6$  MNZ für die Färbung verwendet. Das UKSH stellte  $1 \times 10^6$  bereits isolierte MNZ bereit.

Ein Teil der Pankreasgewebeprobe wurde zusammen mit 1 ml PDAC-Medium in ein Well einer 12-Well-Platte gegeben. Dann wurde das Gewebe mit einem Skalpell in 5-10 Stücke mit einer Größe von ca. 2 x 2 x 2 mm geteilt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank wurde der gesamte Inhalt des Wells auf einen *Cellstrainer* mit 40 µm Porendurchmesser gegeben, welcher auf ein 50-ml-Röhrchen aufgesetzt war. Daraufhin wurde das Well mit 2 ml PDAC-Medium mehrfach mit dem *Pipetboy* aufgespült. Das Medium wurde dann ebenfalls auf den *Cellstrainer* gegeben. Nachdem der Überstand vollständig durchgelaufen war, wurde das Röhrchen mit 1200 U/min für 7 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 450 µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und gleichmäßig auf 10 FACS-Röhrchen verteilt. Nun erfolgte ein erster Waschschriff. Dazu wurden 200 µl MACS-Puffer je Röhrchen hinzugefügt, die Röhrchen für 7 min bei 1500 U/min zentrifugiert und die Überstände im Anschluss abgesaugt. Dann wurden die Antikörper 1-5 entsprechend Tabelle 3 in 25 µl MACS-Puffer je Röhrchen zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C erfolgte ein weiterer Waschschriff mit MACS-Puffer. Auf die Pellets wurde der Sekundärantikörper entsprechend Tabelle 3 in 25 µl MACS-Puffer je Röhrchen zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C erfolgte ein weiterer Waschschriff mit MACS-Puffer.

Schließlich wurden alle Proben mit je 50 µl einprozentiger Formalinlösung fixiert. Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit einem *FACS Calibur* durchgeführt.

**Tabelle 3: Färbeschema zur Charakterisierung von mononukleären Zellen aus Blut und Pankreasgewebe**

Nr.	AK <sup>1</sup> 1	AK <sup>1</sup> 2	AK <sup>1</sup> 3	AK <sup>1</sup> 4	AK <sup>1</sup> 5	Sek. AK <sup>2</sup>
1	mlgG2b-FITC	mlgG2b-APC		mlgG1-PerCP5.5	mlgG2a-PE	
	1:20	1:50		1:20	1:10	
2	CD4-FITC	CD25-APC		CD127-PerCp5.5	CD49d-PE	
	1:20	1:12,5		1:20	1:10	
3	CD4-FITC	CD25-APC	CD49d-PerCp5.5	CD127-PerCp5.5		
	1:20	1:12,5	1:20	1:20		
4	CD4-FITC	CD69-APC	CD49d-PerCp5.5	CD127-PerCp5.5	CD25-PE	
	1:20	1:20	1:20	1:20	1:10	
5	mlgG1-FITC		mlgG1-Bio		mlgG1-PE	Strept-PerCP5.5
	1:10		1:40		1:10	1:100
6	CD4-FITC	CD69-APC	CD49d-PerCp5.5	CD127-PerCp5.5		
	1:20	1:20	1:20	1:20		
7	CD4-FITC	CD25-APC				
	1:20	1:12,5				
8	CD4-FITC	CD69-APC			CD25-PE	
	1:20	1:20			1:10	
9	CD4-FITC	CD25-APC	CD49d-PerCp5.5	CD127-PerCp5.5		
	1:20	1:12,5	1:20	1:20		
10	CD4-FITC	CD25-APC	CD49d-PerCp5.5	CD127-PerCp5.5		
	1:20	1:12,5	1:20	1:20		

<sup>1</sup> Primärantikörper

<sup>2</sup> Sekundärantikörper

### 3.7 Statistische Analyse

Die Daten der Cokulturen wurden entweder mit dem *Student-t*-Test oder dem *Wilcoxon-Mann-Whitney*-Test analysiert, je nachdem, ob eine Normalverteilung im *Shapiro-Wilk*-Test zugrunde gelegt werden konnte oder nicht. Die Relation zwischen Daten gesunder Spender und Patienten mit CP und PDAC sowie den klinischen Parametern wurden nichtparametrisch mittels *Spearman*s Rangkorrelationskoeffizient oder *Wilcoxon-Mann-Whitney*-Test analysiert. Alle statistischen Tests waren zweiseitig. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert. Für alle Tests wurde die Software SPSS-Version 17.0 verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Anzahl von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs ist im Blut von Patienten mit CP und PDAC leicht erhöht

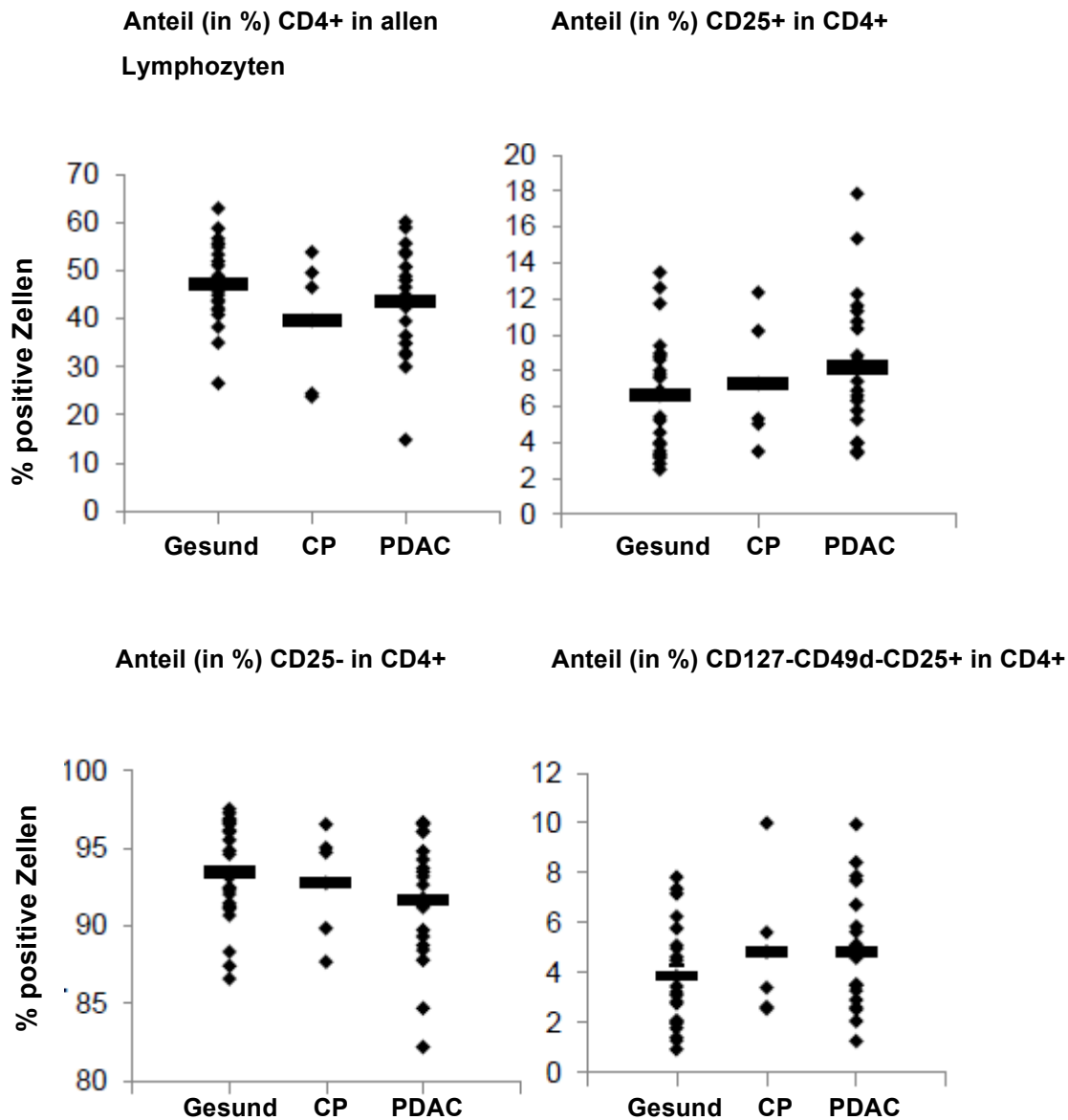
Bei allen bisherigen Studien zum Vorkommen von Tregs in Patienten mit PDAC und seinen Vorläuferläsionen wurden Tregs ausschließlich anhand der Marker CD25 und FoxP3 charakterisiert (Ikemoto et al. 2006; Yamamoto et al. 2012; Liyanage et al. 2002). Dabei sind möglicherweise Tregs inkludiert, die ebenfalls CD25 exprimieren können. Folglich wurde untersucht, ob Unterschiede in der Prävalenz von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs und CD4+CD25+ T-Zellen im Blut von Patienten mit CP und PDAC im Vergleich zu gesunden Spendern nachweisbar sind. Dazu wurden mononukleäre Zellen aus dem Blut von 22 gesunden Spendern, 5 Patienten mit CP und 22 PDAC-Patienten auf CD4, CD25, CD49d und CD127 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 4 erfasst.

**Tabelle 4: Charakteristika von gesunden Spendern sowie von Patienten mit CP und PDAC**

Parameter	Fallzahl
<b>Gesunde Spender</b>	22
<b>Mittleres Alter (Spannweite)</b>	61 (27-75)
<b>Geschlecht (männl./weibl.)</b>	8/14
<b>CP-Patienten</b>	5
<b>Mittleres Alter (Spannweite)</b>	61 (45-77)
<b>Geschlecht (männl./weibl.)</b>	3/2
<b>PDAC-Patienten</b>	22
<b>Mittleres Alter (Spannweite)</b>	63,5 (35-77)
<b>Geschlecht (männl./weibl.)</b>	13/9
<b>T-Stadium</b>	
T1/T2/T3/T4	0/1/19/2
<b>N-Stadium</b>	
N0/N1	7/15
<b>M-Stadium</b>	
M0/M1	21/1
<b>Lymphgefäßinvasion</b>	
L0/L1+ Lx	13/8 (1 k.A.)
<b>Blutgefäßinvasion</b>	
V0/V1 + Vx	18/3 (1 k.A.)
<b>Perineurale Invasion</b>	
Pn0/Pn1	1/19 (2 k.A.)
<b>Tumorgrading</b>	
G1/G2/G3/G4	1/15/5/1

Abbildung 2 (siehe nächste Seite) zeigt, dass der Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an mononukleären Zellen allgemein mit 39,5 % bei Patienten mit CP und 43,5 % bei PDAC-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern mit 46,6 % leicht erniedrigt war. Dagegen nahmen CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit 8,2 % bei PDAC-Patienten den höchsten Anteil an CD4<sup>+</sup> ein, gefolgt von 7,2 % bei CP-Patienten und lediglich 6,5 % bei Gesunden. Damit in Einklang stehende Ergebnisse sind in der Literatur beschrieben (Liyanage et al. 2002; Ikemoto et al. 2006). Eine ähnliche Konstellation zeigte die Analyse von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs, welche bei CP (4,8 %) und PDAC (4,8 %) im Vergleich zu Gesunden (3,8 %) ebenfalls leicht erhöht waren. Dabei war ihr Anteil jedoch insgesamt geringer und es bestand kein Unterschied zwischen CP und PDAC. Der Anteil von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wies keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen auf und lag bei allen Gruppen zwischen 91,7 und 93,4 %.

Insgesamt zeigen diese Daten ein leicht erhöhtes Vorkommen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs im Blut von Patienten mit CP und PDAC im Vergleich zu gesunden Spendern. Generell war der Anteil von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Tregs etwas geringer als der von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen und zeigte im Gegensatz zu diesen keinen Unterschied zwischen CP und PDAC.



**Abbildung 2: Die Prävalenz von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs im Blut von Patienten mit CP und PDAC im Vergleich zu gesunden Spendern.** Mononukleäre Zellen wurden aus dem Blut gesunder Spender sowie von Patienten mit CP und PDAC isoliert, gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Expression der Marker CD4, CD25, CD49d und CD127 untersucht. Die Daten zeigen den Anteil (in %) CD4+ Zellen in allen Lymphozyten sowie die Anteile (in %) CD25+, CD25- und CD127-CD49d-CD25+ in CD4+ T-Zellen. Die Balken markieren die Mittelwerte.

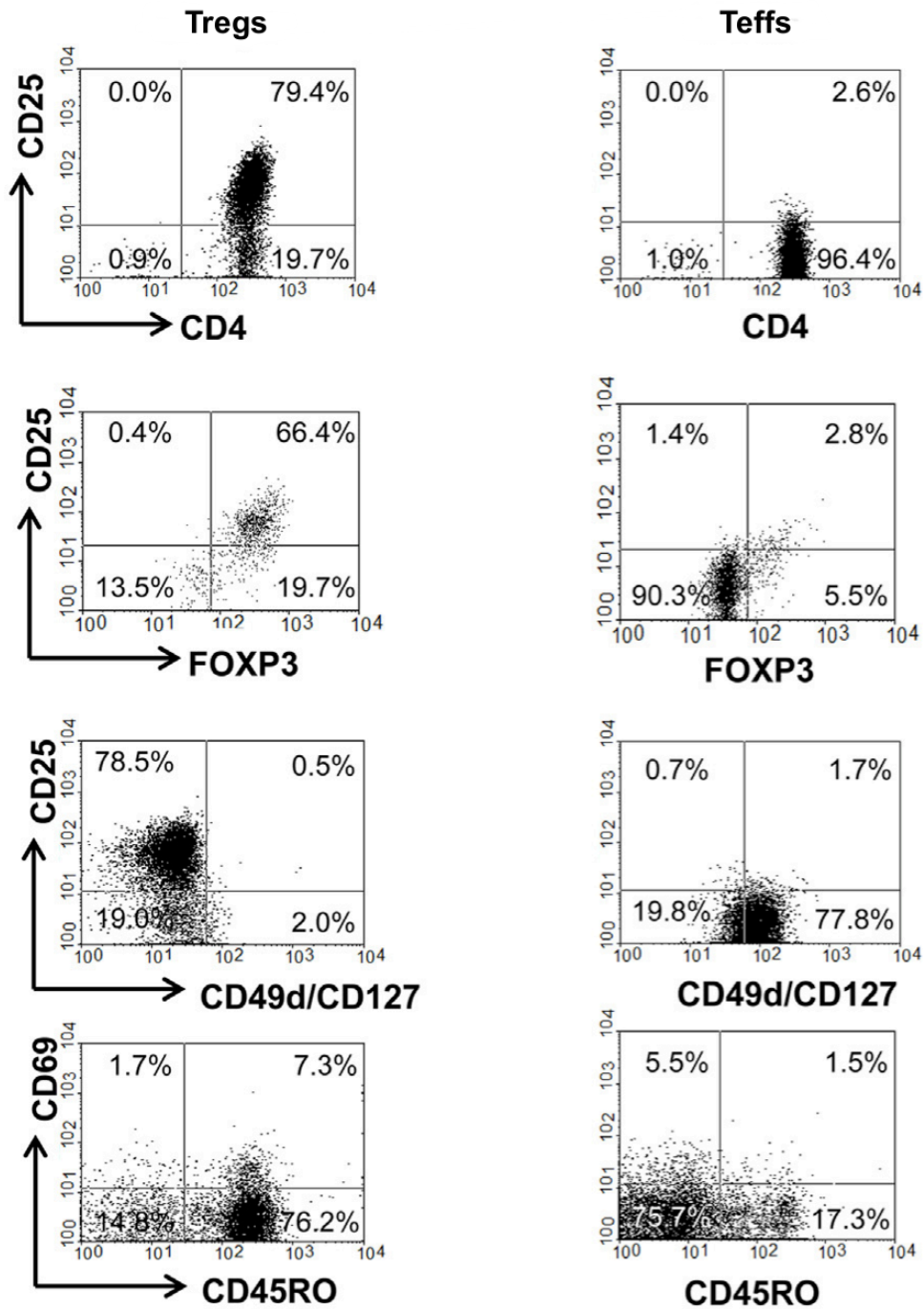


## 4.2 Charakterisierung von Tregs, isoliert aus dem Blut gesunder Spender

Sowohl die Expression von L1CAM als auch die Prävalenz von Tregs sind im PDAC, seinen Vorläuferläsionen sowie im Pankreasgewebe bei chronischer Pankreatitis erhöht (Bergmann et al. 2010; Hiraoka et al. 2006; Schmitz-Winnenthal et al. 2010). Um zu untersuchen, wie es zur Anreicherung von Tregs und Teffs im Pankreasgewebe von CP- und PDAC-Patienten kommt und welche Rolle dabei L1CAM spielt, wurden beide T-Zellpopulationen aus dem Blut gesunder Spender isoliert (siehe 3.1) und entweder mit H6c7-mock- oder H6c7-L1CAM- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>- oder Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen kokultiviert. Dazu wurden Tregs und Teffs aus dem Blut gesunder Spender mit einer modifizierten Methode nach Kleinewietfeld et al. isoliert. Durch Depletion von CD49d+ und CD127+ T-Zellen aus CD4+ T-Zellen konnten dabei in hohem Maße immunsuppressive CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs gewonnen werden. Diese waren „*untouched*“, d.h. sie hatten keine kontaminierenden Antikörper gebunden, die möglicherweise Zell-Zell-Interaktionen bei Cokulturversuchen hätten stören können und so zu verfälschten Versuchsergebnissen hätten führen können. Parallel dazu wurden nach dem gleichen Prinzip Teffs durch Depletion von CD25+ Zellen aus CD4+ T-Zellen gewonnen.

Vor dem Einsatz der isolierten Tregs in Cokulturversuchen erfolgte deren Charakterisierung mittels durchflusszytometrischer Analyse, um den Erfolg der Isolation und die Reinheit der Treg-Population zu kontrollieren. Abbildung 3 zeigt, dass tatsächlich ca. 80 % der Tregs CD25 positiv waren, während weniger als 3 % der Teffs CD25 exprimierten. Außerdem waren über 70 % der Teffs CD49d+CD127+, während diese Marker von den Tregs fast nicht exprimiert wurden. Ferner waren Tregs durch eine hohe Expression des *Memory-Markers* CD45RO sowie FoxP3 charakterisiert, während diese kaum bei Teffs gefunden wurden. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen aus der Studie von Kleinewietfeld überein (Kleinewietfeld et al. 2009).

Tregs waren somit durch die Expression von CD4, CD25 und FoxP3 sowie das Fehlen von CD49d und CD127 charakterisiert. Für die Cokulturversuche wurden nur T-Zell-Isolationen mit einer Reinheit von  $\geq 85$  % verwendet.

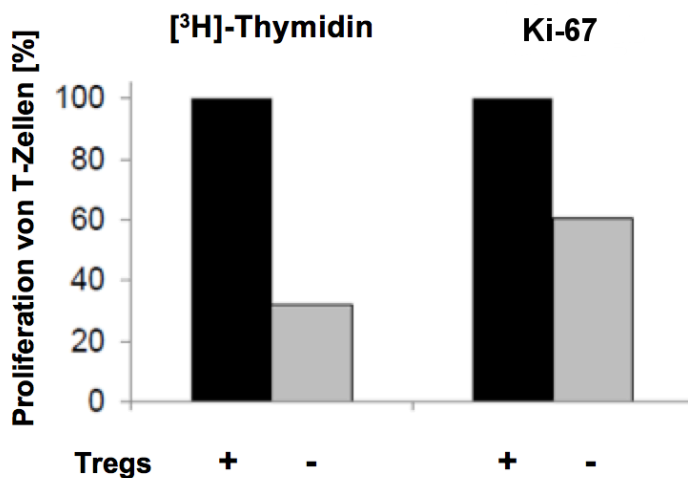


**Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse frisch isolierter T-Zellen bezüglich der Expression von CD4, CD25, CD69, CD49d, CD127, CD45RO und FoxP3.**

Tregs und Teffs wurden mittels Färbung und durchflusszytometrischer Analyse auf die Expression der Marker CD4, CD25, CD69, CD49d, CD127, CD45RO und FoxP3 untersucht. Gezeigt sind hier die Daten einer repräsentativen Isolierung.

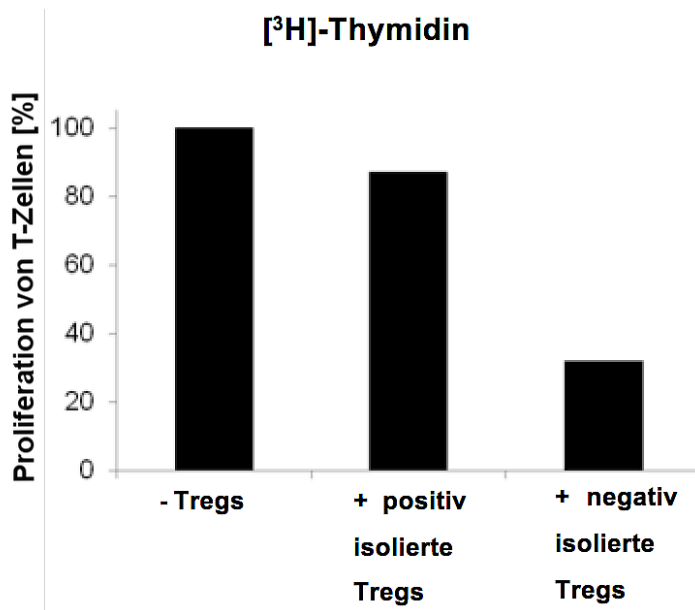
### 4.3 Negativ isolierte Tregs besitzen einen stark immunsuppressiven Phänotyp

Um die immunsuppressive Potenz der isolierten Tregs zu prüfen, wurde deren Einfluss auf die Proliferation von autologen Teffs untersucht. Dazu wurde die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen sowie der Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund des geringen Anteils von Tregs (1:50) kann deren Einfluss bei der Messung der Proliferation dabei vernachlässigt werden. Wie in Abbildung 4 gezeigt, war die Proliferation der Teffs in Anwesenheit von Tregs um 70 % bzw. 40 % im [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay bzw. der Ki-67-Analyse vermindert.



**Abbildung 4: „Untouched“ Tregs hemmen die Proliferation von Teffs.** Teffs und Tregs wurden in einem Verhältnis von 50:1 für 3-5 Tage kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde entweder mit einem [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay oder Ki-67-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Gezeigt sind die Daten aus einem repräsentativen Experiment als % proliferierender T-Zellen.

Ein Vergleich mit CD25+ positiv isolierten Tregs durch einen [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay offenbarte, dass deren immunsuppressive Potenz deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei negativ isolierten Tregs (Abb. 5). Dies lässt die Verunreinigung der positiv isolierten Tregs durch Teffs vermuten sowie eine Funktionsbeeinträchtigung durch gebundene Antikörper.



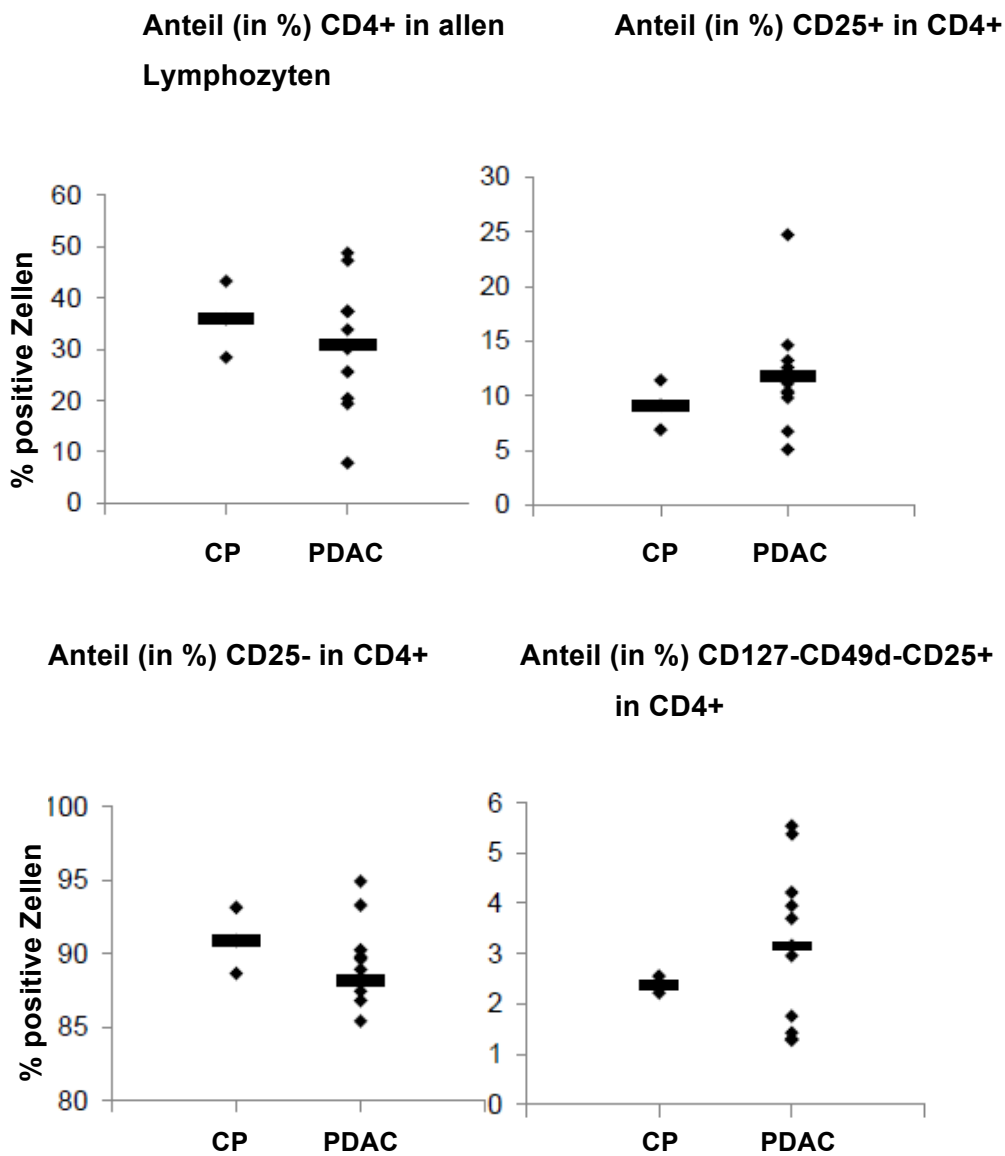
**Abbildung 5: Hemmung der Proliferation von Teffs durch positiv isolierte Tregs im Vergleich zu negativ isolierten Tregs.** Teffs wurden entweder allein oder mit positiv oder negativ isolierten Tregs für 5 Tage kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde anschließend mit einem  $[^3\text{H}]$ -Thymidin-Assay bestimmt. Hier sind die Daten eines repräsentativen Experiments als % proliferierender T-Zellen dargestellt.

#### **4.4 CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs kommen im Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC und CP vor**

Nun sollte der Frage nachgegangen werden, ob hoch immunsuppressive CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs bei Patienten mit PDAC und CP auch direkt am Ort der Erkrankung vorkommen. Dazu wurden Pankreasgewebestücke beider Patientengruppen in Kultur genommen und nach 24 Stunden ausgewanderte Zellen hinsichtlich der zuvor genannten Marker gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, lag der Anteil von CD4+ T-Zellen in allen Lymphozyten mit 35,8 % bei CP etwas höher als bei PDAC mit 30,8 %. Dagegen war der Anteil von CD25+ in CD4+ T-Zellen mit 11,8 % im PDAC-Gewebe etwas höher als im CP-Gewebe mit 9,1 %. CD4+CD25- T-Zellen waren in Pankreasgewebe von PDAC-Patienten mit 88,1 % und CP-Patienten mit 90,9 % in hoher Anzahl nachweisbar. CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs waren mit 3,1 % bei PDAC und 2,3 % bei CP vertreten.

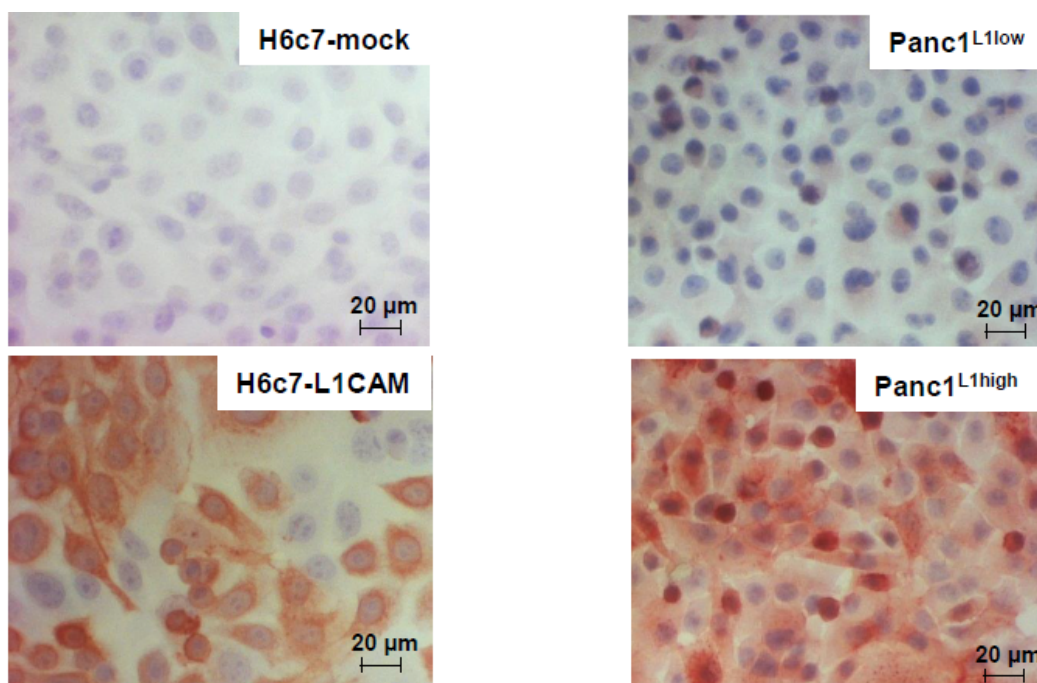
Somit konnte das Vorkommen von hoch immunsuppressiven CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs im Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC und CP bestätigt werden, wobei zwischen den beiden Patientengruppen keine nennenswerten Unterschiede zu verzeichnen waren. Bemerkenswerterweise stellten jedoch CD25- T-Zellen die größte Population von CD4+ T-Zellen sowohl bei PDAC- als auch bei CP-Patienten dar.



**Abbildung 6: Die Prävalenz von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs im Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC.** Zellen, welche aus Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC ausmigriert waren, wurden wie beschrieben gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten zeigen den Anteil (in %) CD4+ Zellen in allen Lymphozyten sowie die Anteile (in %) CD25+, CD25- und CD127-CD49d-CD25+ in CD4+ T-Zellen. Die Balken markieren die Mittelwerte.

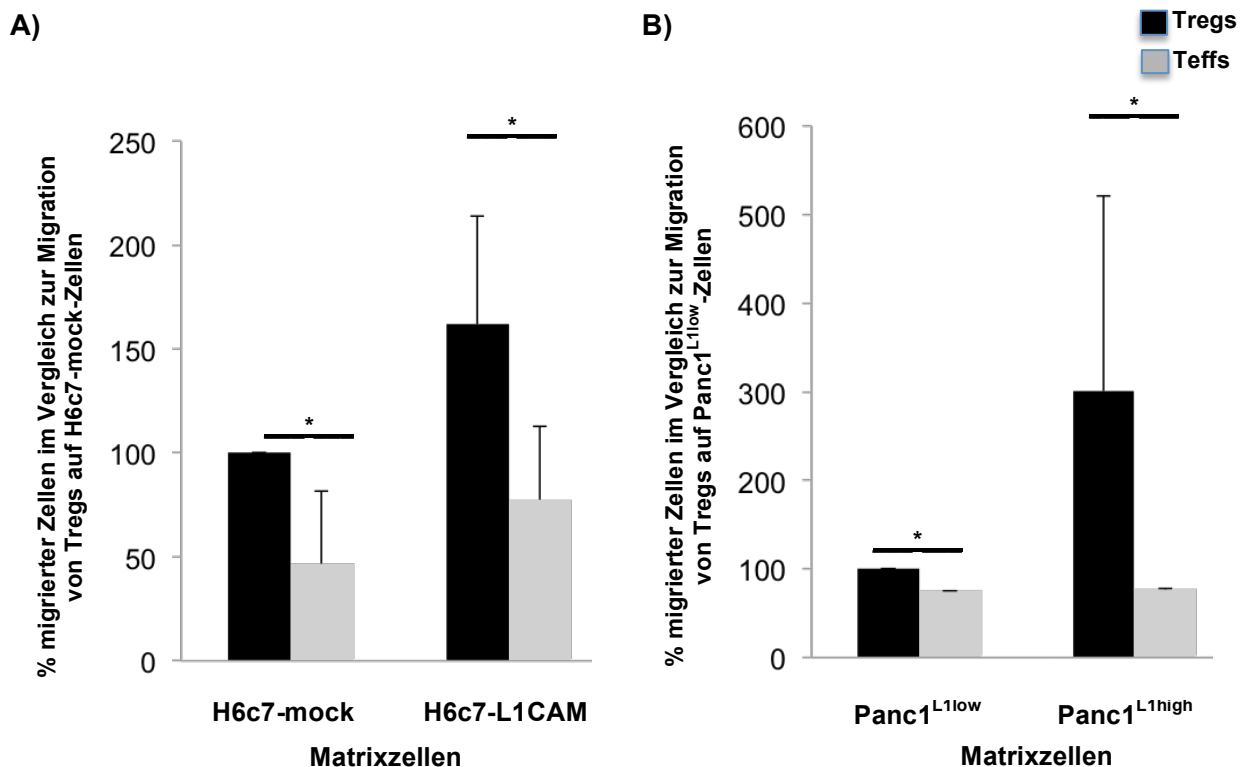
#### 4.5 Tregs besitzen ein hohes migratorisches Potential, welches durch L1CAM weiter verstärkt wird

Um zu untersuchen, ob L1CAM die Migration von Tregs und somit deren Anreicherung im Pankreasgewebe von CP- bzw. PDAC-Patienten beeinflussen kann, wurde das Migrationsverhalten fluoreszenzmarkierter Tregs durch einen *Monolayer* aus Epithelzellen bzw. Tumorzellen mit unterschiedlicher L1CAM-Expression in einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht. Die Transwellporengröße von 3  $\mu\text{m}$  erlaubte dabei nur die Transmigration der T-Zellen, nicht aber der Epithel- bzw. Tumorzellen. Zur Simulation der Situation einer chronischen Pankreatitis wurde die gutartige, humane Pankreasgangepithelzelllinie H6c7 verwendet, welche entweder mit einem L1CAM kodierenden Vektor (H6c7-L1CAM) oder einem leeren Kontrollvektor (H6c7-mock) transduziert worden war. Um die Situation im PDAC zu simulieren, wurde die Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 eingesetzt, die mit einer Kontroll-shRNA transduziert worden war und eine hohe L1CAM-Expression aufwies (Panc1<sup>L1high</sup>) oder Panc1-Zellen, in denen die L1CAM-Expression mittels einer L1CAM-spezifischen shRNA stabil unterdrückt worden war (Panc1<sup>L1low</sup>). Der Expressionsstatus von L1CAM wurde in den Epithel- bzw. Tumorzellen regelmäßig mittels immunzytochemischer Färbung geprüft. Abbildung 7 demonstriert die Expression von L1CAM in den jeweiligen Zelllinien.



**Abbildung 7: Expression von L1CAM in H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen.** H6c7-mock-, H6c7-L1CAM-, Panc1<sup>L1low</sup>- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen wurden immunzytochemisch auf L1CAM gefärbt (rötlich dargestellt) und unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Gezeigt ist eine repräsentative Färbung.

Das Migrationsverhalten der Tregs wurde durch Fluoreszenzmessung im unteren Kompartiment der Transwells nach 24 Stunden bestimmt. Abbildung 8 zeigt, dass Tregs auch in der Abwesenheit von L1CAM in Cokultur mit H6c7-mock-Zellen (A) und Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen (B) generell mehr migrieren als Teffs. Darüber hinaus war das migratorische Potential der Tregs in Anwesenheit von L1CAM mit H6c7-L1CAM-Zellen (Abb. 8 A) und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen (Abb. 8 B) deutlich erhöht. Demgegenüber war kein Anstieg der migratorischen Aktivität von Teffs in Cokultur mit Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen (Abb. 8 B) sowie ein geringerer Anstieg in Cokultur mit H6c7-L1CAM- im Vergleich zu H6c7-mock-Zellen (Abb. 8 A) zu verzeichnen. Zusammenfassend lassen diese Daten darauf schließen, dass CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs ein höheres migratorisches Potential als Teffs aufweisen, welches durch die Anwesenheit von L1CAM weiter verstärkt wird.



**Abbildung 8: Migration von T-Zellen durch einen *Monolayer* aus H6c7-mock- bzw. H6c7-L1CAM-Zellen und Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen.** Tregs und Teffs wurden mit CFSE markiert und auf Transwelleinsätze ausgesät, welche mit H6c7-mock- bzw. H6c7-L1CAM-Zellen (A) oder Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen (B) bewachsen waren. Nach 24 Stunden wurden die migrierten T-Zellen durch Messung der Fluoreszenz im unteren Kompartiment bestimmt. Die Daten werden dargestellt als % migrierter Zellen in Relation zu migrierten Tregs auf H6c7-mock- (A) bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen (B), welche jeweils als 100 % gesetzt wurden. Die Mittelwerte +/- SA von 3-5 unabhängigen Experimenten sind gezeigt. \* p<0,05

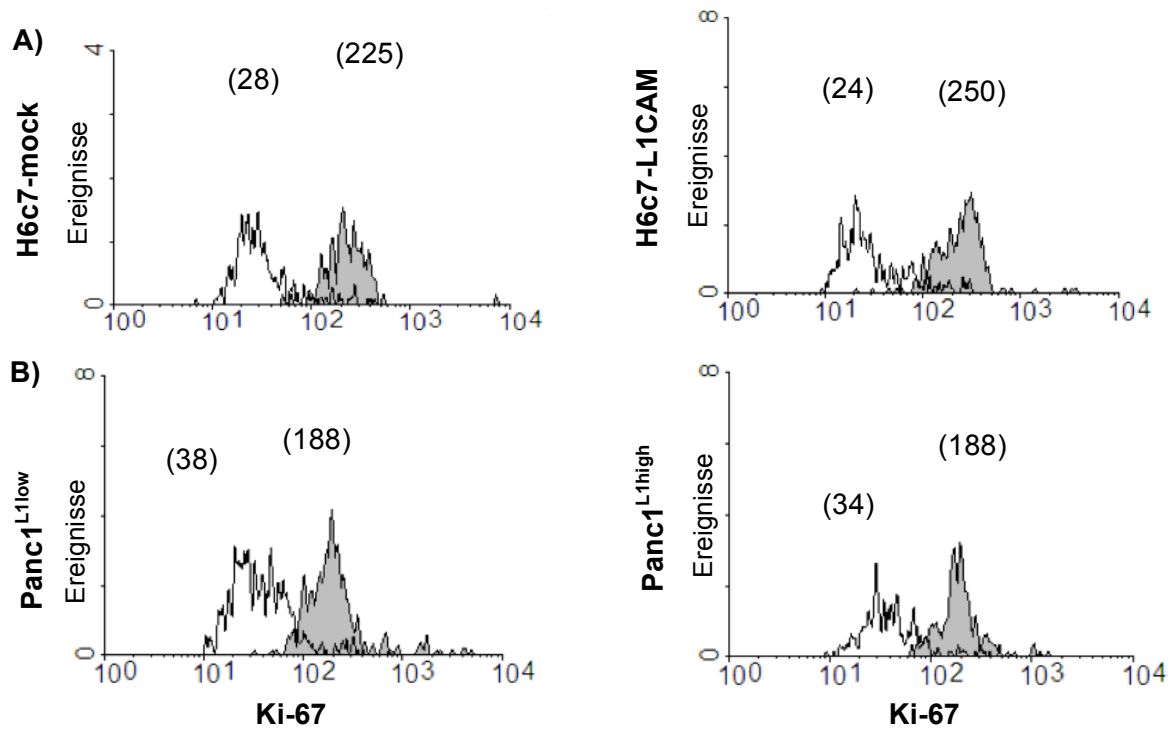
#### **4.6 Die Proliferation von Teffs, nicht aber von Tregs, ist in Anwesenheit von L1CAM vermindert**

Es konnte gezeigt werden, dass L1CAM zu einer erhöhten Migration von Tregs beizutragen scheint (siehe 4.5). Als nächstes sollte untersucht werden, ob L1CAM nicht nur einen Einfluss auf die Migration, sondern auch auf die Proliferation von T-Zellen hat. Dazu wurde die Proliferation von Tregs und Teffs nach Cokultur mit H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen bzw. Panc1<sup>L1low</sup>- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen in Anwesenheit von Aktivierungsbeads mittels Ki-67-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die Aktivierungsbeads dienen der Simulation von Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen.

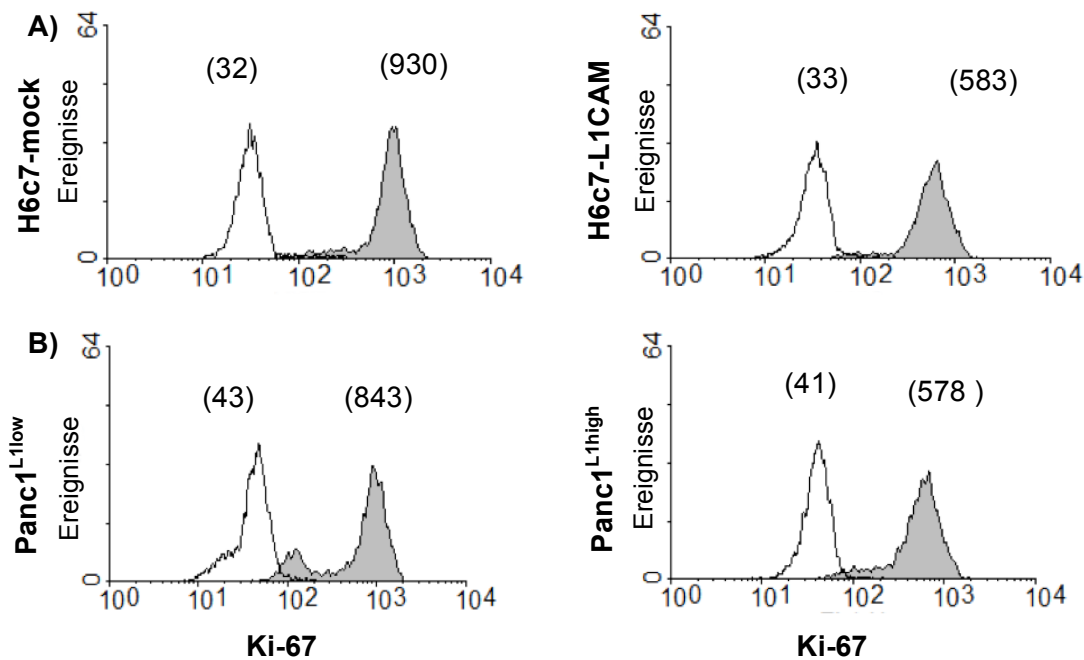
Die Proliferation von Tregs war unter allen Bedingungen ähnlich gering, wie aus den geringen Unterschieden der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Abbildung 9 ersichtlich ist (MFI: 225 in H6c7-mock vs. 250 in H6c7-L1CAM, MFI: 188 in Panc1<sup>L1low</sup> vs. 188 in Panc1<sup>L1high</sup>). Abbildung 10 zeigt, dass Teffs im Vergleich zu Tregs allgemein eine höhere Proliferation aufweisen. Außerdem zeigen Teffs im Unterschied zu Tregs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM-Zellen eine deutlich geringere Proliferation als nach Cokultur mit H6c7-mock-Zellen (Abb. 10 A), was an der verminderten MFI zu erkennen ist (MFI: 930 in H6c7-mock vs. 583 in H6c7-L1CAM). Die gleiche Tendenz zeigte sich nach Cokultur mit Panc1<sup>L1high</sup>- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen (Abb. 10 B), wobei hier die Unterschiede etwas geringer ausgeprägt waren (MFI: 843 in Panc1<sup>L1low</sup> vs. 578 in Panc1<sup>L1high</sup>). Die Befunde ohne Aktivierungsbeads (Daten nicht gezeigt) lassen ähnliche Tendenzen erkennen, sind jedoch aufgrund der allgemein niedrigen Proliferation von geringer Aussagekraft.

Somit scheint L1CAM eine verminderte Proliferation von Teffs zu bewirken, während dieser Effekt bei Tregs nicht zu beobachten ist.





**Abbildung 9: Proliferation von Tregs nach Kokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen.** Tregs wurden für 72 Stunden in Anwesenheit von Aktivierungsbeads mit H6c7-mock- bzw. H6c7- L1CAM-Zellen (A) oder Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen (B) kokultiviert. Dann wurden die Tregs auf Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Färbungen mit Isotypenkontrollen dar, während die gefüllten Kurven die Färbungen mit den spezifischen Antikörpern zeigen. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 4 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 10: Proliferation von Teffs nach Kokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen.** Teffs wurden für 72 Stunden in Anwesenheit von Aktivierungsbeads mit H6c7-mock- bzw. H6c7-L1CAM-Zellen (A) oder Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen (B) kokultiviert. Dann wurden die Teffs auf Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Färbungen mit Isotypenkontrollen dar, während die gefüllten Kurven die Färbungen mit den spezifischen Antikörpern zeigen. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 11 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.

## **4.7 L1CAM beeinflusst den Phänotyp von Teffs, wohingegen der Phänotyp von Tregs stabil bleibt**

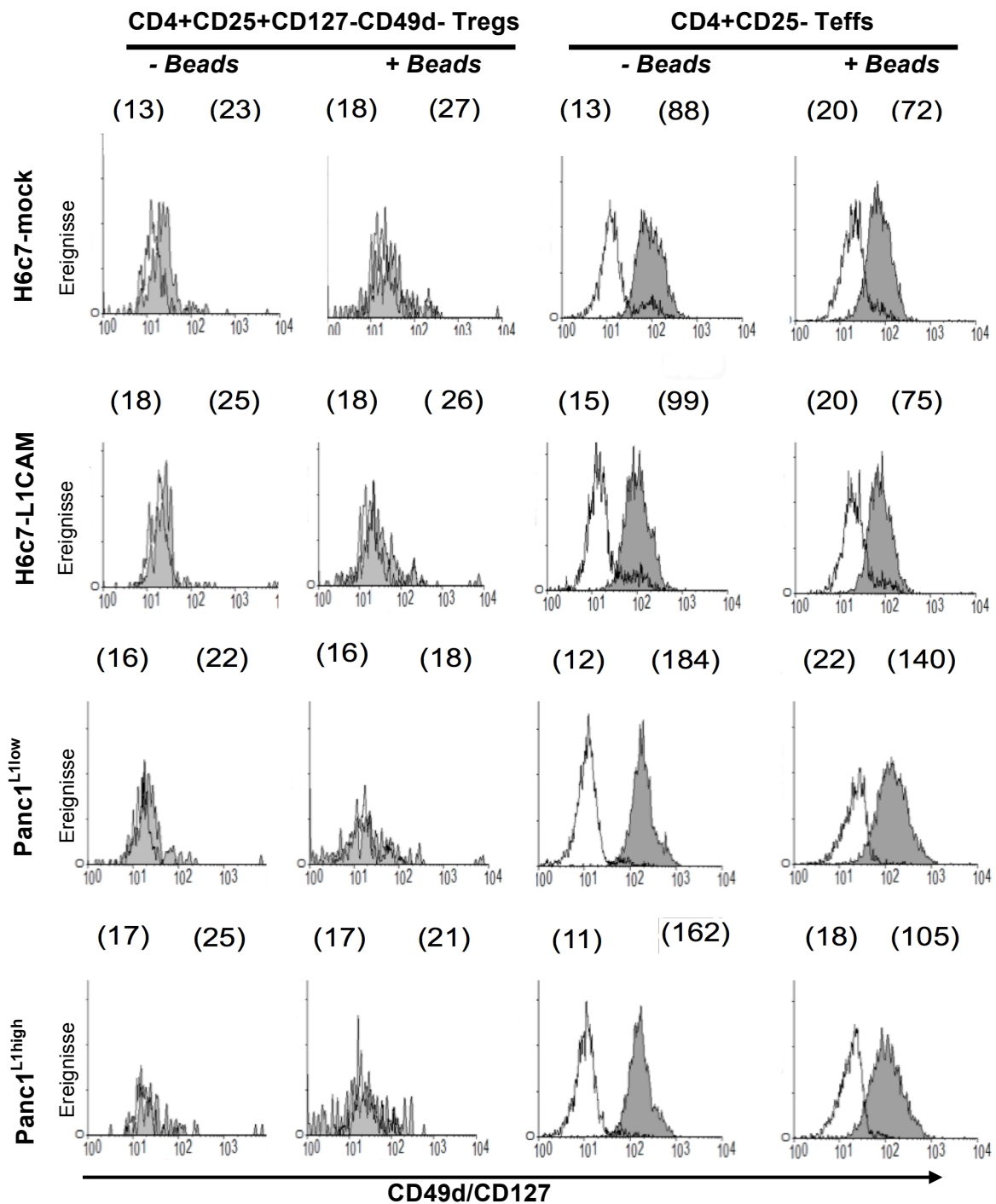
### **4.7.1 L1CAM vermindert die Expression von CD25 in Teffs**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass L1CAM einen pro-migratorischen Effekt auf Tregs und einen proliferations-inhibitorischen Effekt auf Teffs auszuüben scheint. Beides könnten Mechanismen sein, über die L1CAM zur Anreicherung von Tregs im Pankreasgewebe führt. Um zu untersuchen, ob L1CAM auch zu einem immunsuppressiven Phänotyp beiträgt, wurden Tregs und Teffs in Cokultur mit H6c7-mock-, H6c7-L1CAM- sowie Panc1<sup>L1low</sup>- oder Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen für 72 Stunden kultiviert, jeweils in An- und Abwesenheit von Aktivierungsbeads. Nach einer Dauer von 72 Stunden wurde der Phänotyp der Teffs und Tregs bezüglich der Expression von CD49d, CD127, CD25 und CD69 mittels Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

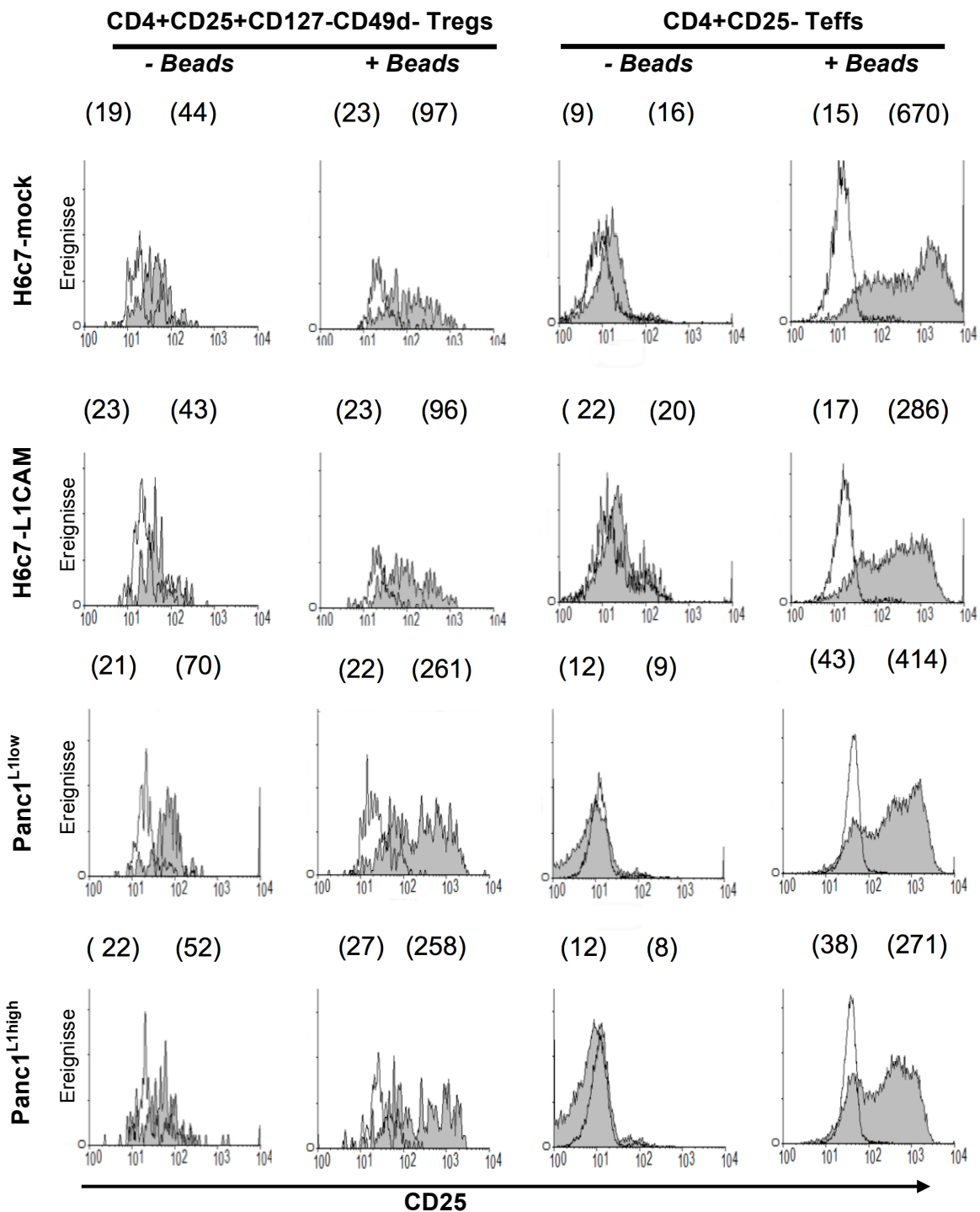
Wie aus Abbildung 11 (siehe nächste Seite) ersichtlich, blieb die Expression von CD49d und CD127 sowohl bei Tregs als auch bei Teffs unter allen Bedingungen weitgehend unverändert.

Abbildung 12 (siehe Seite 50) zeigt, dass die CD25-Expression in Tregs in Anwesenheit von Aktivierungsbeads ungefähr um den Faktor 2 (H6c7) bzw. maximal um den Faktor 4 (Panc1) erhöht war, wobei sich jedoch kein deutlicher Unterschied zwischen Zellen mit hoher oder niedriger L1CAM-Expression zeigte. Nach Cokultur mit H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen war die Expression von CD25 in Teffs in Anwesenheit von Aktivierungsbeads massiv erhöht (H6c7-mock: Faktor 25, Panc1<sup>L1low</sup>: Faktor 13) Dieser Anstieg fiel nach Cokultur mit L1CAM exprimierenden Zellen deutlich geringer aus (H6c7-L1CAM: Faktor 19, Panc1<sup>L1high</sup>: Faktor 11).

Daraus lässt sich schließen, dass L1CAM die Expression von CD25 in Teffs vermindert, wohingegen der Phänotyp von Tregs weitgehend stabil bleibt.



**Abbildung 11: Expression von CD49d und CD127 in Teffs und Tregs nach Kokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen.** Tregs und Teffs wurden für 72 Stunden mit H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen oder Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen ohne (- Beads) oder mit (+ Beads) Aktivierungsbeads kokultiviert. Danach wurden beide T-Zell-Populationen auf die Marker CD49d und CD127 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Färbungen mit Isotypenkontrollantikörpern dar und die gefüllten Kurven zeigen die Färbungen mit den spezifischen Antikörpern. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 11 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für mittlere Fluoreszenzintensität.

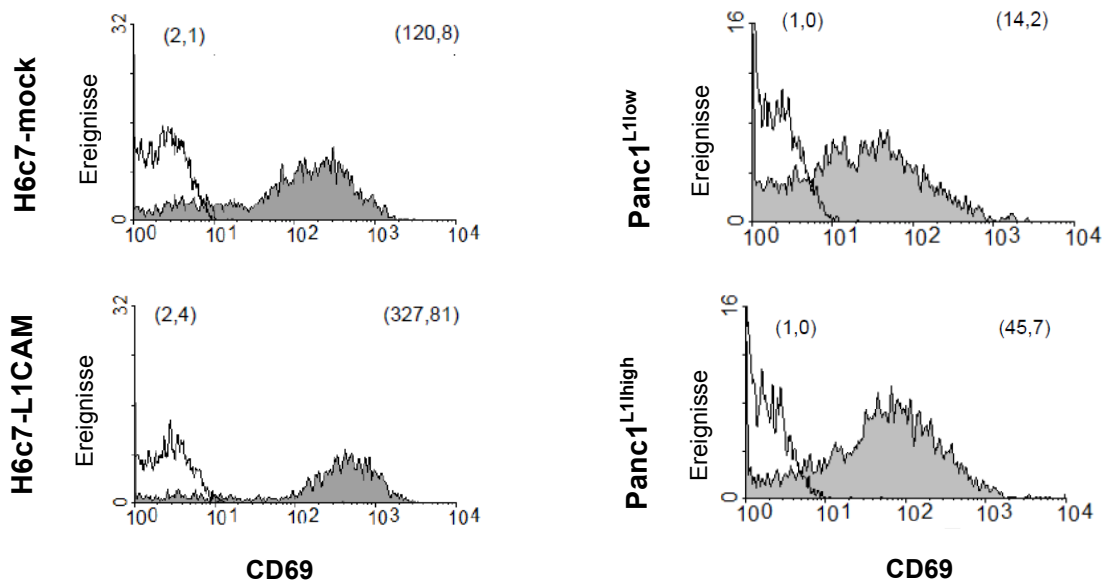


**Abbildung 12: Expression von CD25 in Tregs und Teffs nach Kokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen.** Tregs und Teffs wurden für 72 Stunden mit H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen oder Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen ohne (- *Beads*) oder mit (+ *Beads*) Aktivierungsbeads kokultiviert. Danach wurden beide T-Zell-Populationen auf den Marker CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Färbungen mit Isotypenkontrollantikörpern dar, während die gefüllten Kurven die Färbungen mit spezifischen Antikörpern zeigen. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 11 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.

#### 4.7.2 L1CAM erhöht die Expression von CD69 in Teffs

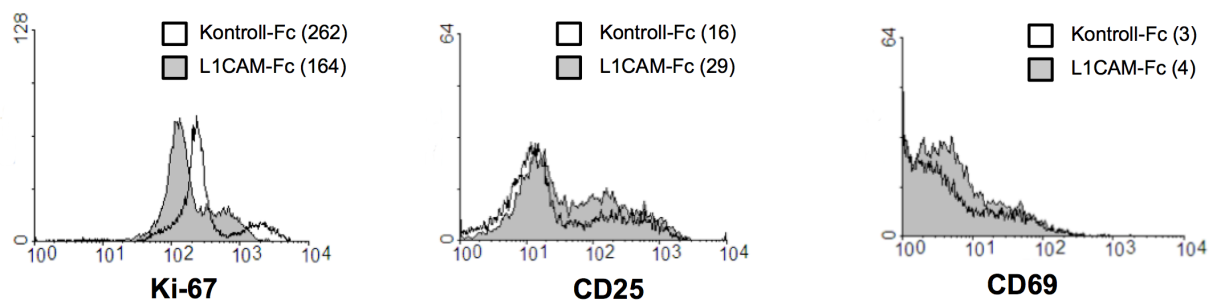
CD69 ist, ähnlich CD25, als früher Aktivierungsmarker in Leukozyten bekannt. Zudem wird CD69 mittlerweile aber auch eine immunregulatorische Funktion im Zusammenhang mit einer neuen Population von CD4+CD25-CD69+ Tregs bei Mäusen zugeschrieben (Sancho et al. 2005; Han et al. 2009). Dieses Wissen, gepaart mit der Beobachtung, dass die CD25 Expression in Teffs durch L1CAM vermindert wird, gaben Anlass, die Expression von CD69 in CD25- Teffs ebenfalls unter den beschriebenen Cokulturbedingungen in Anwesenheit von Aktivierungsbeads zu untersuchen.

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, war die Expression von CD69 in Teffs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM-Zellen deutlich erhöht (MFI: 328) im Gegensatz zu der Cokultur mit H6c7-mock-Zellen (MFI: 121). Nach Cokultur mit Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen fiel die CD69 Expression ebenfalls deutlich höher aus (MFI: 46) im Vergleich zur Cokultur mit Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen (MFI: 14).



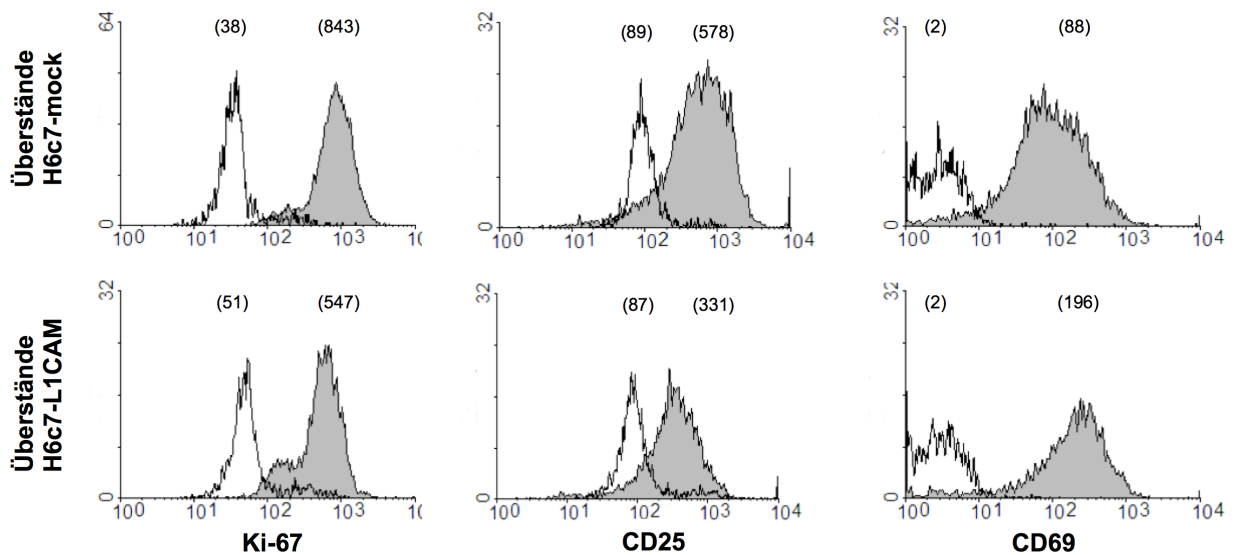
**Abbildung 13: Expression von CD69 in Teffs nach Cokultur mit H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen im Vergleich zu H6c7-mock- bzw. Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen.** Teffs wurden für 72 Stunden mit H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen oder Panc1<sup>L1low</sup>- bzw. Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen in Anwesenheit von Aktivierungsbeads kokultiviert. Danach wurden die Teffs auf den Marker CD69 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Färbungen mit Isotypenkontrollantikörpern dar, während die gefüllten Kurven die Färbungen mit spezifischen Antikörpern zeigen. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 11 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.

Um zu überprüfen, ob die in den Cokulturversuchen beobachteten Veränderungen bezüglich der Proliferation und der Expression von CD25 und CD69 durch direkte Bindung von L1CAM ausgelöst werden, wurde eine Kultur von Teffs in Anwesenheit von Aktivierungsbeads auf L1CAM-Fc-beschichteten Platten und Kontroll-Fc-beschichteten Platten verglichen. Die Kultur von Teffs auf L1CAM-Fc-beschichteten Platten zeigte dabei im Vergleich zur Kultur auf Kontroll-Fc-beschichteten Platten eine nur gering veränderte Proliferation, gemessen an der Expression von Ki-67 (MFI: 164 versus 262, Abb. 14) und keine Änderung des Phänotyps bezüglich der Expression von CD25 und CD69 (Abb. 14).



**Abbildung 14: Expression von Ki-67, CD25 und CD69 nach Kultur von Teffs auf L1CAM-Fc-beschichteten Platten.** Teffs wurden für 72 Stunden in Anwesenheit von Aktivierungsbeads auf L1CAM-Fc- oder Kontroll-Fc-beschichteten Platten kultiviert. Anschließend wurden die Teffs auf die Marker Ki-67, CD25 und CD69 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Kultivierung auf Kontroll-Fc dar, während die gefüllten Kurven die Kultivierung auf L1CAM-Fc zeigen. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 11 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.

Um zu überprüfen, ob lösliche Faktoren für die beschriebenen Veränderungen der Expression von CD25 und CD69 in Teffs ursächlich sind, wurde die Kultivierung von Teffs zusammen mit Aktivierungsbeads in konditionierten Überständen von H6c7-L1CAM-Zellen und H6c7-mock-Zellen verglichen. Dabei zeigten die Teffs nach Kultur in Überständen von H6c7-mock-Zellen eine geringere Proliferation, gemessen an der Expression von Ki-67 (MFI: 547 versus 843, Abb. 15) sowie eine erniedrigte Expression von CD25 (MFI: 331 versus 578, Abb. 15) und eine erhöhte Expression von CD69 (MFI: 196 versus 88, Abb. 15).



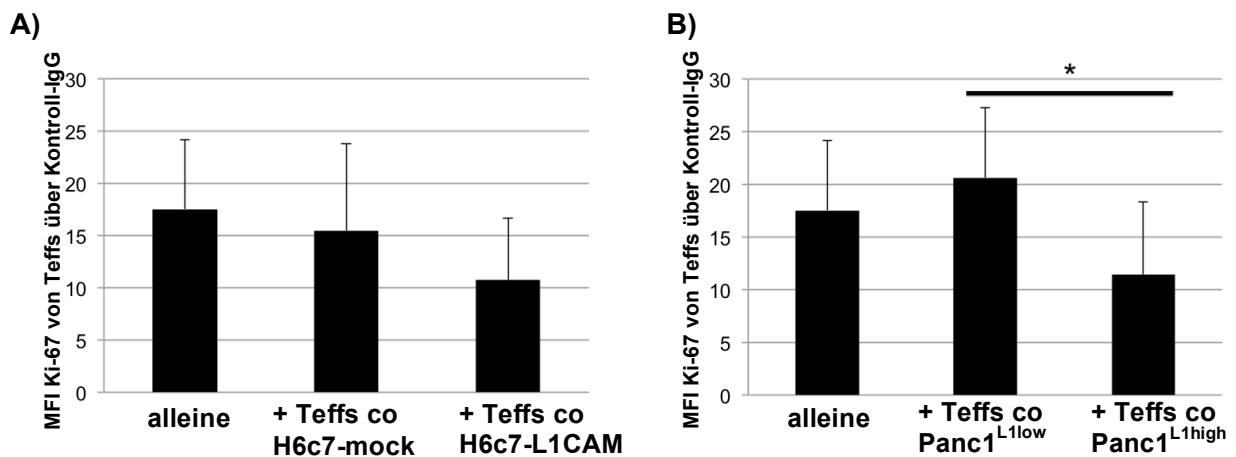
**Abbildung 15: Expression von Ki-67, CD25 und CD69 nach Kultur von Teffs in H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-konditionierten Medien.** Teffs wurden für 72 Stunden in Überständen von H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen zusammen mit Aktivierungsbeads kultiviert. Anschließend wurden die Teffs auf die Marker Ki-67, CD25 und CD69 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die leeren Kurven stellen die Färbungen mit Isotypenkontrollantikörpern dar, während die gefüllten Kurven die Färbungen mit spezifischen Antikörpern zeigen. Gezeigt sind die Daten eines repräsentativen Experimentes von 11 unabhängig durchgeführten Experimenten als Histogramme. Die Zahlenwerte in Klammern stehen für die mittlere Fluoreszenzintensität.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass L1CAM die Entstehung eines CD25-CD69+ Phänotyps von Teffs fördert. Die Vermittlung scheint dabei nicht über direkten Zellkontakt bzw. Bindung von L1CAM zu funktionieren, sondern über lösliche Faktoren, die durch L1CAM vermittelte Signalwege von den Epithel- bzw. Tumorzellen freigesetzt werden.



#### 4.8 In Anwesenheit von L1CAM kokultivierte Teffs bilden einen immunsuppressiven Phänotyp aus

CD25-CD69+ Teffs wurden als eine neue Population von Tregs identifiziert (Han et al. 2009). Diese Arbeit zeigt, dass L1CAM die Bildung dieses Phänotyps fördert. Um zu untersuchen, ob CD25-CD69+ Teffs tatsächlich eine immunsuppressive Funktion ausüben, wurden Teffs nach Kokultur mit H6c7-mock-, H6c7-L1CAM-, Panc1<sup>L1low</sup>- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen in einem Verhältnis von 1:75 mit autologen Teffs kokultiviert, die parallel zu den oben genannten Kokulturen in der Gegenwart von Aktivierungsbeads kultiviert worden waren. Der Phänotyp der kokultivierten Teffs konnte hinsichtlich der Expression von CD25 und CD69 bestätigt werden (siehe 4.7.2). Nach 72 Stunden wurde die Proliferation der Teffs mittels Ki-67-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Wie Abbildung 16 zeigt, war die Proliferation der autologen Teffs nach Kokultur vermindert, wenn diese in Gegenwart von Teffs aus Kokulturen mit L1CAM-exprimierenden Zellen kultiviert worden waren. So war die Proliferation in Anwesenheit von Teffs aus Kokultur mit H6c7-L1CAM-Zellen um 31 % vermindert im Vergleich zu Teffs aus Kokultur mit H6c7-mock-Zellen (Abb. 16 A). Ähnliche Effekte zeigte die Kokultur mit Teffs aus der Panc1<sup>L1high</sup>-Kokultur mit einer im Vergleich zu Teffs-Kokultur mit Panc1<sup>L1low</sup>-Zellen um 45 % reduzierten Proliferation (Abb. 16 B).



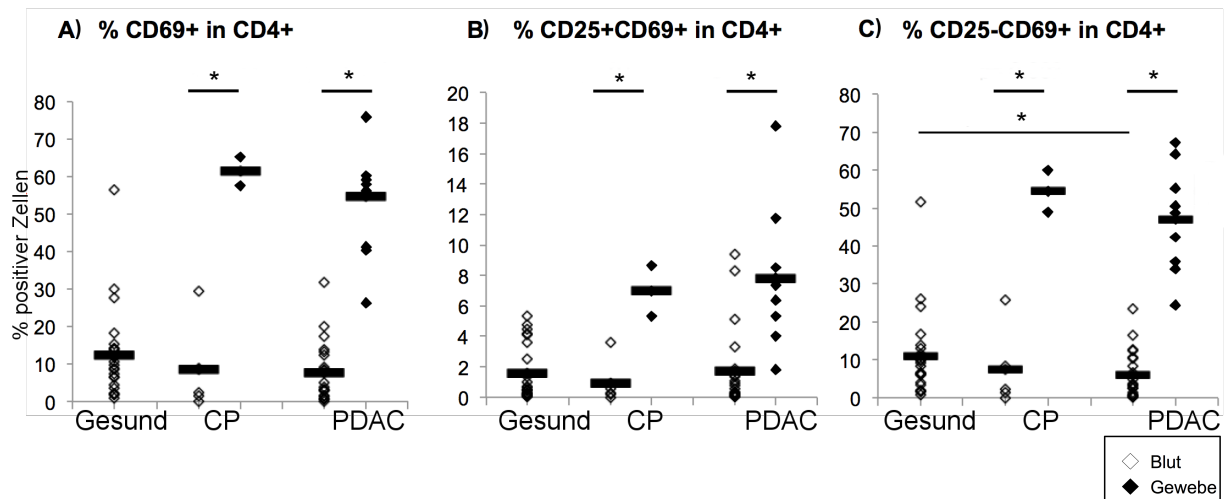
**Abbildung 16: Hemmung der Proliferation von autologen Teffs durch kokultivierte Teffs.** Teffs wurden für 72 Stunden mit Aktivierungsbeads und entweder H6c7-mock- und H6c7-L1CAM-Zellen (A) oder Panc1<sup>L1low</sup>- und Panc1<sup>L1high</sup>-Zellen (B) kokultiviert. Danach wurden die Teffs aus den Kokulturen für weitere 72 Stunden in einem Verhältnis von 1:75 mit autologen Teffs kokultiviert, welche zuvor parallel nur mit Aktivierungsbeads kultiviert worden waren. Anschließend wurden die T-Zellen auf den Marker Ki-67 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) über der Färbung mit den Kontrollantikörpern gezeigt. Es wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5-6 Experimenten gebildet. \* = p < 0,05

Diese Ergebnisse lassen zusammenfassend darauf schließen, dass Tregs unter dem Einfluss von L1CAM-exprimierenden Pankreasgangepithelzellen einen immunsuppressiven Phänotyp ausbilden.

#### **4.9 Eine erhöhte Anzahl von CD4+CD25-CD69+ T-Zellen im Pankreasgewebe ist mit einer malignen Progression des PDAC verbunden**

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass L1CAM-exprimierende Pankreasgangepithelzellen die Generierung von CD4+CD25-CD69+ T-Zellen fördern, welche eine immunsuppressive Potenz aufweisen. Folglich sollte untersucht werden, ob diese Zellen auch in Patienten mit CP und PDAC vorkommen und ob möglicherweise ein Zusammenhang zur Malignität des PDAC besteht. Dazu wurden zuerst der Anteil von CD69+ T-Zellen in CD4+T-Zellen sowie die Anteile von CD25-CD69+ und CD25+CD69+ T-Zellen in CD4+ T-Zellen im Blut von Patienten mit CP und PDAC und im Blut gesunder Spender verglichen. Daraufhin wurde das Vorkommen dieser Zellen im Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Färbung und durchflusszytometrischer Analyse von MNZ aus dem Blut sowie ausgewanderten Zellen aus dem Pankreasgewebe (siehe Methoden unter 3.6). Zudem wurden die Daten aus Blut und Gewebe der PDAC-Patienten in Bezug zu *Grading* (G1-4), Befall von Lymphknoten (N0/1) und Invasion von Lymphgefäßen (L0/1) und Venen (V0/1) gesetzt. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 4 (S. 35) aufgeführt.

Während im Blut gesunder Spender 12,5 % der CD4+ T-Zellen CD69 exprimierten, war deren Zahl im Blut von Patienten mit chronischer Pankreatitis mit 8,5 % sowie PDAC mit 7,7 % deutlich reduziert (Abb. 17 A). Der Anteil von CD69+CD25- T-Zellen an CD4+ T-Zellen im Blut lag mit 10,8 % bei Gesunden ebenfalls höher als bei Patienten mit CP (7,5 %) und PDAC (6 %, Abb. 17 C). Dagegen waren CD25+CD69+ mit unter 2 % der CD4+ T-Zellen in allen Gruppen ähnlich vertreten (Abb. 17 B).



**Abbildung 17 A-C: Verteilung von CD69+ T-Zellen im Blut und Pankreasgewebe von gesunden Spendern und Patienten mit CP und PDAC.** Mononukleäre Zellen aus dem Blut gesunder Spender und von Patienten mit CP und PDAC sowie Zellen, die aus dem Pankreasgewebe von Patienten mit CP und PDAC migrierten, wurden gefärbt und durchflusszytometrisch auf die Expression der Marker CD69, CD4 und CD25 untersucht. Die Daten sind präsentiert als % CD69+ (A), % CD25+CD69+ (B) und % CD25-CD69+ (C) in CD4+ T-Zellen. Die Balken markieren die Mittelwerte. \*  $p < 0,05$

Auffällig war eine starke Anreicherung von CD69+ T-Zellen im Pankreasgewebe von Patienten mit CP (61,4 %) und PDAC (54,8 %) im Vergleich zu den Zahlen im Blut (Abb. 17 A). Ähnliche Verhältnisse waren bei CD25-CD69+ T-Zellen zu beobachten, welche einen Anteil von 54,4 % der CD4+ bei Patienten mit CP und 47 % bei Patienten mit PDAC ausmachten (Abb. 17 C). Dagegen fielen die Anteile von CD25+CD69+ T-Zellen mit 7 % bei CP und 7,8 % bei PDAC bei beiden Patientengruppen, ähnlich den Tendenzen im Blut, deutlich niedriger aus (Abb. 17 B).

Im Folgenden wurde die Verteilung von CD69+ T-Zellen im Tumorgewebe von PDAC-Patienten mit klinischen Parametern wie dem Befall von Lymph- und Blutgefäßen sowie Lymphknoten und dem *Grading* des Tumors korreliert.

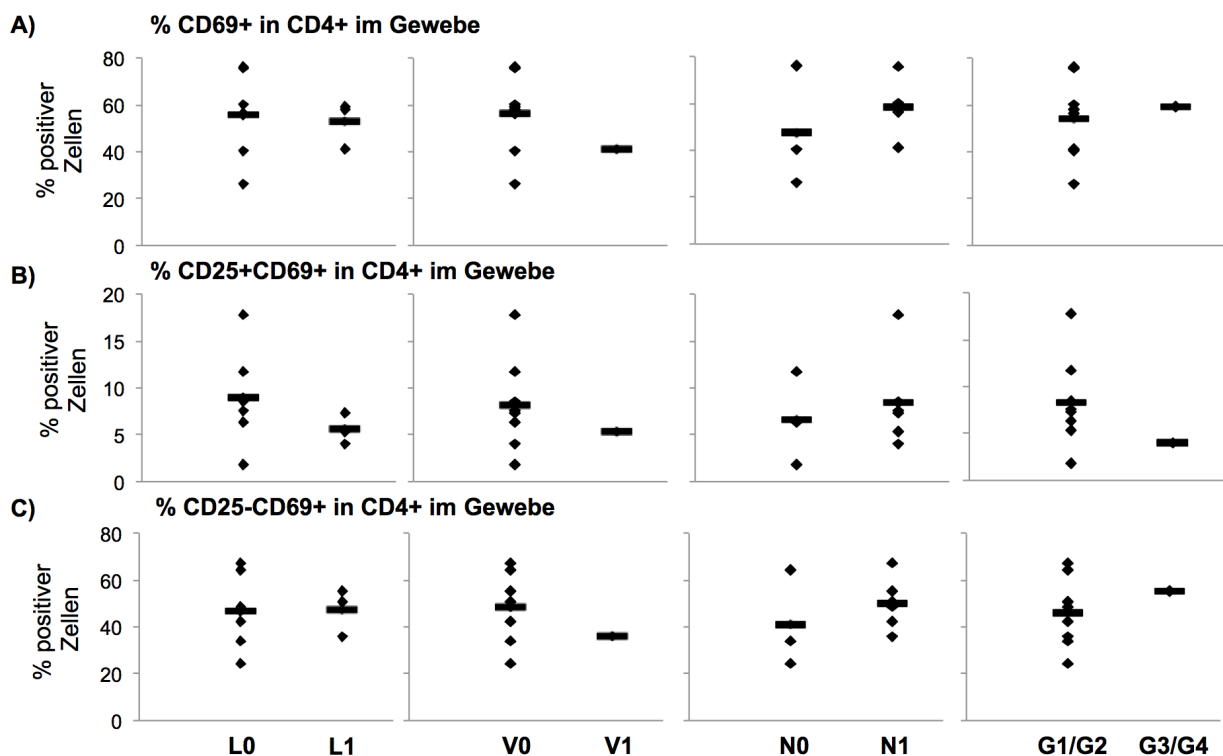
Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, dass eine höhere Zahl von CD69+ mit einem V0 Status (V0: 56,5 % versus V1: 41,2 %) und einem N1 Status (N0: 47,6 % versus N1: 58,5 %) einherging, während sich bezüglich Lymphgefäßstatus (L0: 55,8 % versus 52,8 %) und *Grading* (G1/2: 54,2 % versus 59,3 %) lediglich geringe Unterschiede zeigten (Abb. 18 A).

Des Weiteren zeigte sich, dass eine höhere Zahl von CD4+CD25+CD69+ T-Zellen im Gewebe von PDAC-Patienten mit einem L0-Status (L0: 9,0 % versus L1: 5,6 %) und V0-Status (V0: 8,3 % versus V1: 5,1 %) sowie einem geringeren *Grading* (G1/2: 8,3 % versus

G3/4: 4,0 %) verbunden waren. Allerdings lag gleichzeitig etwas häufiger ein N1 Status vor (N0: 6,6 % versus N1: 8,4 %, Abb. 18 B).

Dagegen war ein hoher Anteil von CD4+CD25-CD69+ Zellen mit einem höheren *Grading* (G1/2: 46,0 % versus G3/4: 55,3 %) sowie ebenfalls mit einem N1 Status (N0: 40,9 % versus N1: 50,0 %) und einem V0 Status (V0: 48,4 % versus V1: 35,9 %) assoziiert (Abb. 18 C).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass CD25-CD69+ T-Zellen die größte Population an CD4+ T-Zellen im Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC und CP darstellen und sich dort im Vergleich zu den Zahlen im Blut stark anreichern. Zudem weist ihr Vorkommen in Assoziation mit Lymphknotenbefall und höherem *Grading* bei PDAC Patienten auf eine Rolle bei der malignen Progression dieser Erkrankung hin.



**Abbildung 18: Korrelation der Prävalenz CD69+ T-Zellen im Tumorgewebe mit klinischen Parametern bei Patienten mit PDAC.** Zellen, welche aus Tumorgewebe von PDAC-Patienten ausmigriert waren, wurden auf die Expression der Marker CD4, CD25 und CD69 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Daten sind präsentiert als % CD69+ (A), % CD69+CD25+ (B) und % CD69+CD25- (C) in CD4+ T-Zellen im Tumor, jeweils in Korrelation mit dem Lymphgefäßstatus (L0/1), dem Blutgefäßstatus (V0/1), dem Lymphknotenstatus (N0/1) und dem *Grading* (G1/2 oder G3/4) des Tumors. Die Balken markieren die Mittelwerte.

## 5 Diskussion

Das PDAC weist bis heute eine infauste Prognose auf. Dazu tragen eine frühe Metastasierung, eine späte Diagnosestellung aufgrund fehlender spezifischer Symptome und eine ausgeprägte Radio- und Chemotherapieresistenz des Tumors bei.

Aufgrund mangelnder Therapiemöglichkeiten hat sich die Forschung immer mehr auf das Tumorstroma konzentriert, welches beim PDAC besonders ausgeprägt ist und die Tumorprogression beeinflusst (Kleeff et al. 2007; Zou 2005). Dabei spielen sowohl die mechanische Barrierewirkung des Stromas, als auch Zytokin-vermittelte Effekte eine Rolle. Allerdings sind auch direkte protumorigene Effekte von Stromazellen auf Epithel- und Krebszellen denkbar. So konnte bereits gezeigt werden, dass Fibroblasten die Chemoresistenz von PDAC-Zellen erhöhen können (Sebens Mürkoster et al. 2008; Mürkoster et al. 2004). Ein wichtiger Mediator von Chemoresistenz in PDAC-Zellen ist das Adhäsionsmolekül L1CAM, welches unter anderem durch den Einfluss von Stromamyofibroblasten in Tumorzellen erhöht wird. Dabei wird L1CAM vorwiegend von Tumorzellen an der invasiven Front exprimiert (Tsutsumi et al. 2011) und ist mit dem Befall von Lymphknoten und der Invasion in Nerven und Gefäße assoziiert, welche mit einer schlechten Prognose einhergehen (Ben et al. 2010).

Zudem scheinen auch T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung des PDAC zu spielen. Neueste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass insbesondere aktivierte Teffs die EMT in Pankreasgangepithelzellen *in vitro* fördern und *in situ* typische Veränderungen für EMT insbesondere in Pankreasgängen von CP-Gewebe, welche reich an CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind, zu detektieren sind (Goebel et al. 2015). Frühere Publikationen konzentrierten sich hingegen vermehrt auf die Rolle der Tregs und demonstrierten, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs im PDAC und seinen Vorläuferläsionen angereichert sind und ihre Zahl mit abnehmendem Differenzierungsgrad des Tumors zunimmt (Liyanage et al. 2002). Eine hohe Inzidenz von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist mit einer schlechten Prognose verknüpft (Hiraoka et al. 2006). Auch im Blut von Patienten mit PDAC und CP konnte eine erhöhte Zahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs nachgewiesen werden, welche ebenfalls mit einer schlechten Prognose korreliert (Liyanage et al. 2002; Ikemoto et al. 2006; Schmitz-Winnenthal et al. 2010). Bisherigen Analysen war gemein, dass Tregs über die Detektion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen bestimmt wurden. Dabei werden jedoch Teffs, welche nach Aktivierung ebenfalls CD25 und FoxP3 exprimieren können, unwillentlich mit eingeschlossen. Um dies zu vermeiden, wurden Tregs für diese Arbeit nach der von Kleinewietfeld beschriebenen Methode als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup>C127<sup>-</sup> Tregs isoliert und nachgewiesen. Dies erlaubte eine genauere Differenzierung von hoch

immunsuppressiven Tregs und aktivierten Teffs in Patienten sowie die Isolation dergleichen aus dem Blut gesunder Spender ohne verunreinigende Antikörper für Cokulturversuche (Kleinewietfeld et al. 2009).

Diese Arbeit widmet sich der Frage, ob das Adhäsionsmolekül L1CAM eine Anreicherung von immunsuppressiven T-Zellen im Pankreasgewebe fördert und ob eine Korrelation zwischen dem Vorkommen dieser T-Zellen im Pankreasgewebe und der malignen Progression sowie potentiell schon der Entstehung des PDAC besteht.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs sowohl im Blut von Patienten mit PDAC als auch mit CP im Vergleich zu gesunden Spendern leicht erhöht ist. Ein Unterschied zwischen den ersten beiden Gruppen bestand nicht. Dass Tregs im Blut bei chronischer Entzündung ebenso erhöht waren wie bei Tumorpatienten, steht möglicherweise im Zusammenhang mit der Rolle der CP als Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC. Die Analyse von CD4+CD25+ Tregs zeigte ähnliche Tendenzen, allerdings lagen hier die Zahlen insgesamt auf einem deutlich höheren Niveau. Dies steht im Einklang mit bisherigen Analysen von CD4+CD25+ Tregs im Blut von Patienten mit PDAC (Liyanage et al. 2002; Ikemoto et al. 2006; Yamamoto et al. 2012) und CP (Schmitz-Winnenthal et al. 2010). Die Differenz zu CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs verstärkt die Vermutung, dass CD25+ Teffs bei den genannten Studien unwillentlich in die Analyse eingeschlossen wurden.

Im Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC und CP waren ebenfalls CD4+CD25+ Tregs und CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs nachweisbar, wobei die Zahlen bei PDAC-Patienten geringfügig höher lagen. Ihre Anteile an CD4+ T-Zellen lagen jedoch insgesamt etwas niedriger als im Blut. Interessant wäre der Vergleich von CP- und PDAC-Gewebe mit gesundem Pankreasgewebe, um zu ergründen, ob bei den genannten Erkrankungen eine Anreicherung von Tregs im Pankreasgewebe zu beobachten ist. Gesundes Pankreasgewebe wird jedoch meist nicht reseziert und steht deshalb kaum zur Verfügung.

Wichtig anzumerken ist, dass der weitaus größte Anteil an CD4+ T-Zellen bei Patienten mit PDAC und CP im Blut und Tumorgewebe kein CD25 exprimiert.

Um zu klären, welche Wirkung L1CAM auf T-Zellen im PDAC entfaltet und ob es eine Anreicherung von immunsuppressiven T-Zellen in diesem Tumor bewirken kann, wurden Cokulturen von T-Zellen mit benignen (H6c7) und malignen Pankreasgangepithelzellen (Panc1) angelegt, die jeweils eine hohe oder schwache L1CAM-Expression aufwiesen. Mit den benignen Epithelzellen mit hoher L1CAM-Expression (H6c7-L1CAM) wurde die Situation einer CP simuliert, in welcher L1CAM bereits in über 60 % der Gangstrukturen erhöht ist (Geismann et al. 2009). Die PDAC-Zelllinie mit hoher L1CAM-Expression (Panc1<sup>L1high</sup>) simulierte die Situation im PDAC, in dem L1CAM in über 90 % der Tumorzellen von

Primärtumoren nachgewiesen werden konnte (Bergmann et al. 2010). Um die L1CAM-Abhängigkeit zu überprüfen, wurden die Zelllinien parallel mit schwacher L1CAM-Expression eingesetzt (H6c7-mock und Panc1<sup>L1low</sup>). Anschließend wurde mittels Färbung und Durchflusszytometrie der Phänotyp der T-Zellen charakterisiert sowie ihr Proliferations- und Migrationsverhalten untersucht.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass L1CAM über verschiedene Mechanismen eine effektive Reaktion des Immunsystems auf die Tumorzellen erschwert.

So konnte gezeigt werden, dass L1CAM besonders die Migration von CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs fördert. Dies könnte erklären, wie es schon im Pankreasgewebe von Patienten mit CP zur Anreicherung von Tregs kommt, welche in der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse der Gewebeproben etwas höher war als die Anreicherung im PDAC. Bisher sind als Mechanismen zur Anreicherung von Tregs im PDAC chemotaktische Signale und ein verändertes Zytokinprofil der Tumorendothelzellen sowie die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Induktion von peripheren Tregs beschrieben worden (Tan et al. 2009; Nummer et al. 2007; Moo-Young et al. 2009). Ob hierbei tatsächlich eine Anreicherung von Tregs im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe vorliegt, bleibt allerdings angesichts dessen fehlender Verfügbarkeit offen. Mit dendritischen Zellen wurde für eine weitere Untergruppe von Immunzellen eine durch L1CAM vermittelte Migration beschrieben. Dabei scheinen heterophile Bindungen von auf dendritischen Zellen exprimiertem L1CAM und Oberflächenmolekülen von Effektorzellen von Bedeutung zu sein. Ebenso wird die homophile Bindung von L1CAM auf dendritischen Zellen und Effektorzellen diskutiert (Maddaluno et al. 2009). L1CAM, welches in hohem Maße von den Gefäßendothelzellen von Tumoren exprimiert wird, könnte daher zur Migration von dendritischen Zellen ins Tumorgewebe führen. Anschließend könnten dendritische Zellen zu Lymphknoten wandern, dort tumorspezifische Antigene präsentieren und somit zur Vermittlung von Toleranz beitragen. Dies könnte einen weiteren Mechanismus der *immune evasion* des Tumors darstellen (Maddaluno et al. 2009). Die Induktion von Toleranz-vermittelnden dendritischen Zellen geschieht allerdings nur in Abwesenheit von Reifungsfaktoren. Dazu zählen *in vivo* vor allem Liganden von *toll-like*-Rezeptoren und TNF- $\alpha$ -Rezeptoren (Steinman et al. 2003). Neben der erhöhten Migration von Tregs führte die Cokultivierung mit L1CAM exprimierenden Pankreasgangepithelzellen H6c7-L1CAM und Tumorzellen Panc1<sup>L1high</sup> zu einer verminderten Proliferation von Tregs, welche zudem weniger CD25 und mehr CD69 exprimierten im Vergleich zu der Cokultur mit den Kontrollzelllinien. Dagegen blieb der Phänotyp von Tregs unter gleichen Bedingungen stabil und die Proliferation auf einem niedrigen Niveau unverändert.

Ein Vergleich mit T-Zellen, die anstatt in direkter Cokultur nur mit Überständen der jeweiligen Zelllinie kultiviert wurden, zeigte ähnliche Ergebnisse. Damit wird deutlich, dass die Wirkung von L1CAM exprimierenden H6c7-L1CAM- und Panc1<sup>L1high</sup>- Zellen auf Proliferation und Phänotyp von Tregs offenbar weniger durch direkten Zellkontakt vermittelt wird, als vielmehr durch eine L1CAM-vermittelte Freisetzung von löslichen Faktoren. In Einklang damit beschreiben Fogar et al. eine verminderte Proliferation und Migration von CD4+ T-Zellen sowie die Generierung von CD4+CD69+ T-Zellen durch kultivierte Medien von PDAC-Zelllinien (Fogar et al. 2011). Ein möglicher Mechanismus, der zu einer L1CAM-vermittelten Produktion von löslichen Faktoren, insbesondere Entzündungsmediatoren wie Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-8, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  führt, ist die konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Kiefel et al. 2010). Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten in Übereinstimmung damit zeigen, dass Überstände von H6c7-L1CAM-Zellen im Vergleich zu Überständen von H6c7-mock-Zellen höhere Konzentrationen der immunsuppressiven Faktoren VEGF und TGF- $\beta$ 1 enthielten (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus können Tumorzellen zellkontaktunabhängige Effekte auf T-Zellen durch die Freisetzung von Mikrovesikeln bewirken. Dazu zählt die Induktion peripherer Tregs mit dem Phänotyp CD4+CD25+FoxP3+ sowie die Steigerung ihrer Proliferation und ihres immunsuppressiven Potentials (Szajnik et al. 2010). Zudem hydrolysieren Exosomen extrazelluläres ATP in Adenosin. Letzteres ist beteiligt an der Hemmung der Aktivierung von T-Zellen (Clayton et al. 2011).

CD69 wird neben seiner Rolle als früher Aktivierungsmarker auf Leukozyten auch eine immunmodulatorische Funktion zugeschrieben, die über membrangebundenes TGF- $\beta$ 1 vermittelt wird (Sancho et al. 2005). CD25-CD69+ T-Zellen wurden als neue Untergruppe von Tregs im Mausmodell beschrieben (Han et al. 2009). Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die in Anwesenheit von L1CAM generierten CD4+CD25-CD69+ T-Zellen einen immunsuppressiven Effekt auf Tregs ausüben, indem sie deren Proliferation hemmen. Allerdings scheint dies angesichts der negativen Nachweisbarkeit von membrangebundenem TGF- $\beta$ 1 auf Tregs durch einen anderen Mechanismus zu geschehen, der ohne Beteiligung dieses Wachstumsfaktors abläuft (Daten nicht gezeigt). Welche Faktoren stattdessen hierbei eine Rolle spielen, soll durch weitere Experimente untersucht werden.

Nachdem in dieser Arbeit demonstriert wurde, dass L1CAM die Generierung von CD4+CD25-CD69+ T-Zellen mit immunsuppressivem Potential fördert, wurde deren Vorkommen im Blut und Gewebe von Patienten mit PDAC und CP untersucht.

CD4+CD69+ sowie CD4+CD69+CD25- T-Zellen waren im Blut von Patienten mit PDAC und CP im Vergleich zu Proben gesunder Spender erniedrigt. Dagegen fiel eine starke Anreicherung dieser Zellen im Pankreasgewebe von beiden Patientenkollektiven im



Vergleich zum Blut auf. Interessanterweise lag die Prävalenz dieser T-Zellen bei Patienten mit CP sogar noch über denen mit PDAC. Offenbar kommt es also schon bei chronischer Entzündung zu einer Anreicherung dieser immunsuppressiven T-Zellen im Gewebe. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die Frage, ob CD69+CD4+ T-Zellen tatsächlich auch im Gewebe einen immunsuppressiven Phänotyp haben, wie es die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit nahe legen oder aber CD69 hier möglicherweise doch ein Zeichen für Aktivierung ist. Für eine Antwort wäre eine weitere Analyse und Charakterisierung dieser Zellen aus dem Gewebe sinnvoll.

Ähnlich wurde bei Patientinnen mit Mammakarzinom bereits in Frühstadien eine erhöhte Expression von CD69 vor allem durch CD4+ T-Zellen, aber auch CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zum Blut nachgewiesen (Poschke et al. 2012). Im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit war die Zahl CD69 exprimierender T-Zellen dabei jedoch im Blut von Tumorpatienten höher als im Blut gesunder Spender. Eine Differenzierung anhand der Expression von CD25 fand dabei allerdings nicht statt.

Diese Arbeit zeigte anhand der Korrelation der T-Zell-Prävalenzen mit den Tumorcharakteristika, dass eine hohe Zahl von CD4+CD69+CD25- T-Zellen im Tumorgewebe mit einem N1-Status und einem höheren *Grading* einhergingen. Hingegen war ein vermehrtes Vorkommen von CD4+CD69+CD25+ T-Zellen im Blut und Tumorgewebe von PDAC Patienten mit einem niedrigen *Grading* sowie einem L0- und V0-Status assoziiert. Insgesamt verstärken diese Ergebnisse die Vermutung, dass CD4+CD69+CD25- T-Zellen eine wichtige Rolle bei der *immune evasion* des PDAC spielen und die maligne Progression dieses Tumors fördern. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beschrieben Zhu et al. bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom eine Korrelation der Zahl von CD4+CD69+CD25- T-Zellen im peripheren Blut und Tumorgewebe mit fortgeschrittenem *Staging* und zunehmender TumorgroÙe (Zhu et al. 2011).

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Befunden bei CP waren diese T-Zellen bei Patienten mit chronischer Hepatitis im Blut allerdings kaum erhöht im Vergleich zu gesunden Spendern (Zhu et al. 2011). Somit ist eine Anreicherung von CD4+CD69+CD25- T-Zellen im Blut nicht bei allen chronischen Entzündungen zu beobachten und könnte eine Besonderheit der CP darstellen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass L1CAM über verschiedene Mechanismen zu einer Entziehung des PDAC vor einer Tumor-gerichteten Immunantwort beitragen kann. Dies geschieht über eine verminderte Proliferation von Effektorzellen, eine erhöhte Migration und Invasion von CD4+CD25+CD49d-CD127 Tregs und die Bildung von immunsuppressiven T-Zellen mit dem Phänotyp CD4+CD69+CD25-. Letztere spielen möglicherweise bereits bei der Tumorentstehung eine Rolle, da sie schon bei CP stark erhöht vorkommen. Die Wirkung

von L1CAM auf T-Zellen im PDAC resultiert in einem aggressiveren Fortschreiten dieser Tumorerkrankung.

Zudem ist bekannt, dass L1CAM die Chemoresistenz des PDAC erhöht und seine Metastasierung fördert (Sebens Mürköster et al. 2007; Geismann et al. 2009; Schäfer, Geismann, et al. 2012). Es wurde bereits *in vivo* demonstriert, dass der kombinierte Einsatz von L1CAM-Antikörpern und Chemotherapie ein verbessertes therapeutisches Ansprechen des PDAC zur Folge hat (Schäfer, Dieckmann, et al. 2012).

Die wichtige Rolle von L1CAM bei der *immune evasion* des PDAC ist ein weiterer Grund, L1CAM als therapeutisches Ziel genauer zu evaluieren. Für ein besseres Verständnis der Mechanismen, über die L1CAM seine Wirkung im Tumor entfaltet, ist die Identifizierung der löslichen Faktoren, welche L1CAM-vermittelt sezerniert werden und die Proliferation von Teffs beeinflussen, von besonderem Interesse. Außerdem sollten die Rolle von CD69+CD25- T-Zellen bei der Tumorprogression und die dabei zugrunde liegenden Mechanismen weiter untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom weist bis heute eine infauste Prognose auf. Eine späte Diagnosestellung, frühe Metastasierung und ausgeprägte Therapieresistenz machen neue Ansätze für die Früherkennung und Behandlung dieser Erkrankung dringend erforderlich. Untersuchungen der letzten Jahre ergaben, dass das Tumorstroma, welches beim duktalem Pankreasadenokarzinom besonders ausgeprägt ist, die Progression dieser Erkrankung fördern kann.

Folgende Beobachtungen waren dabei für die Fragestellung dieser Arbeit grundlegend. Zum einen konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen im Blut und Pankreasgewebe von Patienten mit duktalem Pankreasadenokarzinom erhöht sind und ihr Vorkommen mit einer schlechten Prognose korreliert. Zum anderen wird das Adhäsionsmolekül L1CAM vermehrt in Zellen dieses Tumors exprimiert und sein Nachweis ist ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Die chronische Pankreatitis, bei der L1CAM im Vergleich zu Normalgewebe ebenfalls erhöht ist, gilt als Risikofaktor für die Entwicklung eines duktalem Pankreasadenokarzinoms. Daraus ergab sich die Frage, ob L1CAM eine Rolle bei der Anreicherung von regulatorischen T-Zellen im duktalem Pankreasadenokarzinom spielt.

Der Einfluss von L1CAM-exprimierenden Pankreasgangepithelzellen auf T-Zellen wurde *in vitro* in Cokulturversuchen untersucht. Zur Simulation der chronischen Pankreatitis und benignen Pankreasgangepithelzellen wurde die Zelllinie H6c7 verwendet, die entweder mit einem L1CAM kodierenden (H6c7-L1CAM) oder einem leeren Kontrollvektor (H6c7-mock) transduziert war. Die Situation im duktalem Pankreasadenokarzinom repräsentierte die maligne Zelllinie Panc1 mit hoher (Panc1<sup>L1high</sup>) oder niedriger (Panc1<sup>L1low</sup>) Expression von L1CAM. CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen mit dem hoch immunsuppressiven Phänotyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD49d<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup> wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Dies geschah mittels negativer magnetischer Separation, d.h. die isolierten T-Zellen waren frei von kontaminierenden Antikörpern. Die T-Zellen wurden mit den Pankreasgangepithelzelllinien für 72 Stunden kokultiviert, entweder in Abwesenheit oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads. Dann wurde der Phänotyp der T-Zellen bezüglich der Expression von CD4, CD25, CD49d, CD127 und CD69 sowie die Proliferation anhand des Markers Ki-67 mittels Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Das Migrationsverhalten der T-Zellen wurde nach Fluoreszenzmarkierung in einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht. Darüber hinaus wurden Prävalenzen unterschiedlicher T-Zell-Populationen im Blut und Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis und duktalem

Pankreasadenokarzinom sowie im Blut gesunder Spender bestimmt und mit klinischen Parametern korreliert.

Die Ergebnisse zeigen, dass L1CAM über verschiedene Mechanismen die Bildung eines immunsuppressiven Milieus durch T-Zellen im duktalem Pankreasadenokarzinom fördern kann. L1CAM förderte die Bildung von T-Effektorzellen mit einem CD4+CD69+CD25-Phänotyp und immunsuppressiver Potenz. Der Phänotyp von CD4+CD25+CD49d-CD127-regulatorischen T-Zellen blieb unter gleichen Bedingungen stabil, wobei deren Migration in Anwesenheit von L1CAM im Vergleich zu T-Effektorzellen deutlich erhöht war. Zudem war die Proliferation von T-Effektorzellen nach Kokultur mit den L1CAM-exprimierenden Zelllinien erniedrigt, während die Proliferation von regulatorischen T-Zellen kaum beeinflusst wurde.

Neben seiner bekannten Bedeutung in der Vermittlung von Chemoresistenz und Migration beziehungsweise Invasion von Tumorzellen konnte in dieser Arbeit eine neue Rolle von L1CAM in der Tumorgenese des duktalem Pankreasadenokarzinoms aufgezeigt werden.

Diese Rolle bei der Bildung eines immunsuppressiven Milieus im duktalem Pankreasadenokarzinom unterstreicht das Potential von L1CAM als therapeutisches Ziel. Weitere Versuche müssen klären, über welche Mechanismen L1CAM seine Wirkung auf T-Zellen entfaltet und ob eine Blockade durch anti-L1CAM-Antikörper die *immune evasion* des duktalem Pankreasadenokarzinoms beeinträchtigen kann und so zu einer Verbesserung der bisher weitgehend aussichtslosen Prognose dieser Erkrankung beitragen kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- Antoniou G, Kountourakis P, Papadimitriou K, Vassiliou V & Papamichael D (2014). Adjuvant therapy for resectable pancreatic adenocarcinoma: review of the current treatment approaches and future directions. *Cancer Treat. Rev.*, 40, 78–85.
- Arlt MJE, 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, 936–943.
- Askenasy N, Kaminitz A & Yarkoni S (2008). Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun. Rev.*, 7, 370–375.
- Balaian LB, Moehler T & Montgomery AMP (2000). The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur. J. Immunol.*, 30, 938–943.
- Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C & Altevogt P (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.*, 112, 2667–2675.
- Ben Q-W, Wang J-C, Liu J, Zhu Y, Yuan F, Yao W-Y & Yuan Y-Z (2010). Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 17, 2213–2221.
- Bergmann F, Wandschneider 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.
- Castellani V, De Angelis E, Kenwrick S & Rougon G (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.*, 21, 6348–6357.
- Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD & Tabi Z (2011). Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J. Immunol.*, 187, 676–683.

- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C & Ducreux M (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 364, 1817-1825.
- Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, Brune K, de Andrade M, Goggins M, Rothenmund H, Gallinger S, Klein A, Petersen GM & Hruban RH (2007). The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 16, 342–346.
- Eckel F, Schneider G & Schmid RM (2006). Pancreatic cancer: a review of recent advances. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 15, 1395–1410.
- Fendrich V, Langer P & Bartsch DK (2014). Familial pancreatic cancer-status quo. *Int. J. Colorectal Dis.*, 29, 139–145.
- Fogar P, Basso D, Fadi E, Greco E, Pantano G, Padoan A, Bozzato D, Facco M, Sanzari MC, Teolato S, Zambon C-F, Navaglia F, Semenzato G, Pedrazzoli S & Plebani M (2011). Pancreatic cancer alters human CD4+ T lymphocyte function: a piece in the immune evasion puzzle. *Pancreas*, 40, 1131–1137.
- Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer 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, 869–875.
- Gast D, Riedle S, Issa Y, Pfeifer M, Beckhove P, Sanderson MP, Arlt M, Moldenhauer G, Fogel M, Krüger A & Altevogt P (2008). The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene*, 27, 1281–1289.
- 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, 633–642.
- Geismann C, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, Arlt A, Tsao M-S, Bachem MG, Altevogt P, Sipos B, Fölsch UR, Schäfer H & Sebens Muerkoster S (2009). Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 69, 4517–4526.

- 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*, 4, e1000083.
- Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP, Phong M, Linderkamp O, Skorokhod A & Marme A (2005). Cleavage of L1 in Exosomes and Apoptotic Membrane Vesicles Released from Ovarian Carcinoma Cells. *Clin. Cancer Res.*, 11, 2492–2501.
- Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA, Campra D, Grützmann R, Rehder H, Rothmund M, Schmiegel W, Neoptolemos JP & Bartsch DK (2003). BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95, 214–221.
- 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.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- Hansel DE, Kern SE & Hruban RH (2003). Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 4, 237–256.
- Herold, G und Mitarbeiter (2015), Innere Medizin 2014, Auflage 2014, Gerd Herold, Köln, S. 504.
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N & Depinho R a (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.*, 20, 1218–1249.
- 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.
- Ikemoto T, Yamaguchi T, Morine Y, Imura S, Soejima Y, Masahiko F, 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.
- Issa Y, Nummer D, Seibel T, Sebens Mürköster S, Koch M, Schmitz-Winnenthal F-H, Galindo L, Weitz J, Beckhove P & Altevogt P (2009). Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J. Mol. Med.*, 87, 99–112.

- Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J & Kranzhöfer K (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. *Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der Epidemiol. Krebsregister Deutschl. e.V. (Hrsg), Berlin.*
- Kaifi JT, Reichelt U, Quaas A, Schurr PG, Wachowiak R, Yekebas EF, Strate T, Schneider C, Pantel K, Schachner M, Sauter G & Izbicki JR (2007). L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer. *Mod. Pathol.*, 20, 1183–1190.
- Kiefel H, Bondong S, Erbe-Hoffmann N, Hazin J, Riedle S, Wolf J, Pfeifer M, Arlt A, Schäfer H, Sebens Mürköster S & Altevogt P (2010). L1CAM-integrin interaction induces constitutive NF- $\kappa$ B activation in pancreatic adenocarcinoma cells by enhancing IL-1 $\beta$  expression. *Oncogene*, 29, 4766–4778.
- Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Löhr JM & Friess H (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *Int. J. cancer*, 121, 699–705.
- Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, Borsellino G, Battistini L, Röttschke O & Falk K (2009). CD49d provides access to ‘untouched’ human Foxp3<sup>+</sup> Treg free of contaminating effector cells. *Blood*, 113, 827–836.
- Korc M (2007). Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am. J. Surg.*, 194, 84–6.
- Liyanage UK, Moore TT, Joo H, 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, 2756–2761.
- Lüttges J & Klöppel G (2005). Das duktales Pankreaskarzinom und seine Vorläufer. *Pathologe*, 26, 12–17.
- Maddaluno L, Verbrugge SE, Martinoli C, Matteoli G, Chiavelli A, Zeng Y, Williams ED, Rescigno M & Cavallaro U (2009). The adhesion molecule L1 regulates transendothelial migration and trafficking of dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 206, 623–635.
- Maness PF & Schachner M (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.*, 10, 19–26.



- Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P & Reiss K (2005). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/ $\gamma$ -secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 9040–9053.
- Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck a, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V & Altevogt P (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.*, 155, 661–673.
- Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch D a, Pancook JD, Zhao X & Reisfeld RA (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J. Cell Biol.*, 132, 475–485.
- Moo-Young T, Larson J, Belt B, Tan M, Hawkins W, Eberlein T, Goedegebuure P & Linehan D (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.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff R a, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M & Parulekar W (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, 25, 1960–1966.
- Moos M, Tacke R, Schachner M, Scherer H, Teplow D, Früh K & Schachner M (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature*, 334, 701–703.
- Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR & Schäfer H (2004). Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.*, 1331–1337.
- Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH & Kern SE (2002). Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: Deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res.*, 62, 3789–3793.
- Nayeem N, Silletti S, Yang X, Lemmon VP, Reisfeld RA, Stallcup WB & Montgomery AMP (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Cell Sci.*, 112, 4739–4749.

- Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, Bonertz A, Galindo L, Antolovich D, Koch M, Büchler M, Weitz J, Schirmmacher V & Beckhove P (2007). Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 99, 1188–1199.
- Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B & Riess H (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 297, 267–77.
- Oleszewski M, Beer S, Katich S, Geiger C, Zeller Y, Rauch U & Altevogt P (1999). Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J. Biol. Chem.*, 274, 24602–24610.
- Oleszewski M, Gutwein P, von der Lieth W, Rauch U & Altevogt P (2000). Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J. Biol. Chem.*, 275, 34478–34485.
- Pancook JD, Reisfeld RA, Varki N, Vitiello A, Fox RI & Montgomery AMP (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J. Immunol.*, 158, 4413–4421.
- Poschke I, De Boniface J, Mao Y & Kiessling R (2012). Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, 131, 1611–1620.
- Raveh S, Gavert N & Ben-Ze'ev A (2009). L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett.*, 282, 137–145.
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD & Stanger BZ (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148, 349–361.
- 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 & Stanger BZ (2014). Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology*, 146, 647–651.
- Sakaguchi S (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531–562.

- Sakaguchi S & Sakaguchi N (2005). Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int. Rev. Immunol.*, 24, 211–226.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M & Masaaki T (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing Il-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). *J. Immunol.*, 155, 1151–1164.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T & Ono M (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775–787.
- Sancho D, Gómez M & Sánchez-Madrid F (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.*, 26, 136–140.
- 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.
- 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.
- Schmitz-Winnenthal H, Pietsch D-HK, Schimmack S, Bonertz A, Udonta F, Ge Y, Galindo L, Specht S, Volk C, Zraggen K, Koch M, Büchler MW, Weitz J & Beckhove P (2010). Chronic pancreatitis is associated with disease-specific regulatory T-cell responses. *Gastroenterology*, 138, 1178–1188.
- Schneider G, Siveke JT, Eckel F & Schmid RM (2005). Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, 128, 1606–1625.
- 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, 243–253.
- Sebens Mürköster S, Werbing V, Koch D, Sipos B, Ammerpohl O, Kalthoff H, Tsao M-S, Fölsch UR & Schäfer H (2008). Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma-epigenetic downregulation of caspases. *Int. J. Cancer*, 123, 1751–1760.

- Sebens M, Muerkoster S, Werbing V, Sipos B, Debus M, 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.
- Seufferlein T, Porzner M, Becker T, Budach V, Ceyhan G, Esposito I, Fietkau R, Follmann M, Friess H, Galle P, Geißler M, Glanemann M, Gress T, Heinemann V, Hohenberger W, Hopt U, Izbicki J, Klar E, Kleeff J, Kopp I, Kullmann F, Langer T, Langrehr J, Lerch M, Lühr M, Lüttges J, Lutz M, Mayerle J, Michl P, Möller P, Molls M, Münter M, Nothacker M, Oettle H, Post S, Reinacher-Schick A, Röcken C, Roeb E, Saeger H, Schmid R, Schmiegel W, Schoenberg M, Siveke J, Stuschke M, Tannapfel A, Uhl W, Unverzagt S, van Oorschot B, Vashist Y, Werner J, Yekebas E (2013). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Z. Gastroenterol.*, 51, 1395–1440.
- Shevach EM (2009). Mechanisms of FoxP3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30, 636–645.
- Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M & Montgomery AMP (2004). Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J. Biol. Chem.*, 279, 28880–28888.
- Steinman RM, Hawiger D & Nussenzweig MC (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 685–711.
- 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, 461–469.
- Stoeck A, Schlich S, Issa Y, Gschwend V, Wenger T, Herr I, Marmé A, Bourbie S, Altevogt P & Gutwein P (2006). L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett.*, 239, 212–226.
- Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M & Whiteside TL (2010). Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One*, 5, e11469.
- Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, Eberlein TJ, Hsieh C & Linehan DC (2009). Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunol.*, 182, 1746–1755.

- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 442–454.
- Tsutsumi S, Morohashi S, Kudo Y, Akasaka H, Ogasawara H, Ono M, Takasugi K, Ishido K, Hakamada K & Kijima H (2011). L1 Cell adhesion molecule (L1CAM) expression at the cancer invasive front is a novel prognostic marker of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 103, 669–673.
- Tsuzuki T, Izumoto S, Ohnishi T, Hiraga S, Arita N & Hayakawa T (1998). Neural cell adhesion molecule L1 in gliomas: correlation with TGF-beta and p53. *J. Clin. Pathol.*, 51, 13–17.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH & Goggins M (2004). Pancreatic cancer. *Lancet*, 363, 1049–1057.
- Workman C, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR & Vignali DAA (2009). The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2603–2622.
- Yadav M, Stephan S & Bluestone JA (2013). Peripherally induced tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front. Immunol.*, 4, 232.
- Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, Yui R, Yamao J, Kim S & Kwon A-H (2012). Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*, 41, 409–415.
- Zhu J, Feng A, Sun J, Jiang Z, Zhang G, Wang K, Hu S & Qu X (2011). Increased CD4+CD69+CD25- T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 26, 1519–1526.
- Zou W (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 263–274.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Formulierung des Dissertationsthemas. Ihr großes Engagement, ihre hervorragende Betreuung und ihre durchweg positive Art haben mir das Arbeiten sehr erleichtert.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Evelin Grage-Griebenow für ihre höchst kompetente Betreuung und große Hilfsbereitschaft bei allen technischen und inhaltlichen Fragen.

Mein großer Dank gilt außerdem Frau Maike Witt-Ramdohr und Frau Dagmar Leisner für die exzellente Einarbeitung in Labormethoden und die großartige Unterstützung bei der technischen Durchführung der Experimente.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für eine hoch motivierende und inspirierende Arbeitsatmosphäre im Labor.

Meinen Eltern Gabriele Gorys und Thomas Gorys gilt meine tiefe Dankbarkeit für ihre uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums, bei der Dissertation und zu jeder anderen Zeit.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Artur Gorys  
Geburtsdatum: 29.05.1988  
Geburtsort: Düsseldorf  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung

1994 – 1998 St. Michael Grundschule, Krefeld  
1998 – 2007 Gymnasium Marienschule, Krefeld

### Zivildienst

08/2007 – 04/2008 Montessori Schule, Krefeld (Unterstützung von Schülern mit körperlicher Behinderung)

### Studium

2008 – 2010 Vorklinisches Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
2010 – 2015 Klinisches Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Examen mit Note: sehr gut (1,5)

### Praktisches Jahr

05/2014 – 09/2014 Chirurgie im Klinikum Schwabing, München  
09/2014 – 12/2014 Innere Medizin im DRK Klinikum Berlin Mitte  
12/2014 – 04/2015 Radiologie an der Charité Berlin, Campus Mitte

### Dissertation

02/2012 – 12/2015 Wissenschaftliche Arbeiten zu dem Thema „Die Rolle von L1CAM bei der Anreicherung und Funktion von immunsuppressiven T-Zellen im dukalen Pankreasadenokarzinom.“ am Institut für Experimentelle Tumorforschung, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

## Publikationsverzeichnis

### Publikationen

Grage-Griebenow E, Jerg E<sup>1</sup>, **Gorys A**<sup>1</sup>, 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, 982-997.

<sup>1</sup>zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen

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<sup>+</sup> T cells potently induce epithelial-mesenchymal-transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells - novel implications of CD4<sup>+</sup> T cells in pancreatic cancer development. *OncolImmunology*, 4, e1000083.

### Zitable Abstracts

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

Vorgelegt auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie 2012 in Hamburg.

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

Vorgelegt auf dem 31. Deutschen Krebskongress 2014 in Berlin.

### Tagungsbeiträge

Grage-Griebenow E, Jerg E, **Gorys A**, Mennrich R, Freitag-Wolf S, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Wesch D, Kabelitz D, Sebens T, Schäfer H & Sebens S (2012). The adhesion molecule L1CAM has an impact on the prevalence of regulatory T-cells in pancreatic ductal adenocarcinoma.

Vorgelegt auf dem 35. Symposium Norddeutscher Immunologen 2012 in Borstel.