

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung

(Direktorin: Prof. Dr. S. Sebens)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

**„EINFLUSS VERSCHIEDENER CD4+ T-ZELLPOPULATIONEN AUF DIE
EPITHELIALE-MESENCHYMALE-TRANSITION (EMT) VON
PANKREASGANGEPITHELZELLEN“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANNA-LISA GOEBEL

aus Bad Soden am Taunus

Kiel 2016

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 6. September 2017

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer

*In Dankbarkeit gewidmet
Meinen Eltern
Und Großeltern*

Teile dieser Arbeit sind bereits an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

Originalarbeiten:

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

"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" *OncolImmunology* 04/2015; 4(4):e1000083-1.

Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, Wicklein D, Wesch D, Freitag-Wolf S, **Goebel L**, Vogel I, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Altevogt P, Schumacher U, Schäfer H, Sebens S
"L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression" *Molecular Oncology* 07/2014; 8(5).

Helm O, Mennrich R, Petrick D, **Goebel L**, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg HH, Wesch D, Sebens S

"Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma" *PLoS ONE* 05/2014; 9(5):e94357.

Zitabler Abstract:

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

"Regulatory T-cells and CD4+T-effector cells both mediate epithelial-mesenchymal-transition in pancreatic ductal epithelial cells" *Oncol Res Treat* 37(suppl1), 127.

Vorgestellt auf dem 31. Deutschen Krebskongress 2014 in Berlin.

Tagungsbeitrag:

Grage-Griebenow E, **Goebel L**, Gorys A, Helm O, Mennrich R, Freitag-Wolf S, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S

"Regulatory T-cells as well as CD4+T effector cells mediate epithelial-mesenchymal-transition in pancreatic ductal epithelial cells"

Vorgestellt auf dem 36. Symposium of the North German Immunologists 2013 in Borstel.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Duktales Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Pathologie	1
1.1.3 Desmoplasie	3
1.1.4 Therapie und Prognose.....	5
1.2 Chronische Pankreatitis	6
1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	6
1.2.2 Pathologie	7
1.2.3 Desmoplasie	7
1.2.4 Therapie und Prognose.....	8
1.3 T-Zellen	8
1.3.1 Teffs.....	9
1.3.2 Tregs.....	10
1.4 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)	11
1.4.1 Definition der EMT	11
1.4.2 EMT in der Karzinogenese.....	12
1.4.3 EMT im PDAC.....	13
1.5 Zielsetzung	14
2. Material	16
2.1 Geräte.....	16
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Chemikalien und Reagenzien	18
2.4 Rezepturen	18
2.5 Antikörper und Reagenzien	19
2.5.1 T-Zell-Isolierung mittels magnetischer Separation	19
2.5.2 Durchflusszytometrische Reinheitsprüfung	19
2.5.3 Immunzytochemische Färbung	19
2.5.4 Durchflusszytometrische Färbung	20
2.6 Inhibitoren	20

2.7	Kits.....	20
2.8	Primer.....	21
2.9	Zelllinien	21
3.	Methoden	22
3.1	Immunhistochemische Anfärbung von PDAC und CP Paraffinschnitten mit nachfolgender mikroskopischer Beurteilung und Scoring	22
3.2	Aussaat und Passagierung der humanen Pankreasgangepithelzelllinie HPDE6c7.....	24
3.3	Isolierung der Teffs und Tregs aus Blut gesunder Spender	25
3.3.1	Isolierung von mononukleären Zellen aus Blut gesunder Spender.....	25
3.3.2	Negative Selektion CD4+ T-Zellen aus MNZ.....	26
3.3.3	Negative Selektion regulatorischer T-Zellen und T-Effektorzellen aus CD4+ T-Zellen.....	28
3.4	Kokultur von frisch isolierten Teffs und Tregs mit HPDE-Zellen.....	30
3.5	Durchflusszytometrie	32
3.5.1	Reinheitsfärbung der isolierten Teffs und Tregs.....	32
3.5.2	Detektion von EMT Markern mittels durchflusszytometrischer Analyse ...	33
3.6	Immunzytochemische Färbung zur Detektion von EMT Markern in HPDE-Zellen.....	35
3.7	RNA-Isolierung, reverse Transkription und RT-PCR.....	36
3.8	Invasionsassays	38
3.8.1	xCELLigence.....	38
3.8.2	Boydenkammer Assay	40
3.9	Bio-Plex Analyse.....	41
3.10	Blockade von TNF- α und IL-6 während der Kokulturen	42
3.11	Statistische Auswertung.....	42
4.	Ergebnisse	44
4.1	Detektion von EMT assoziierten Veränderungen in pankreatischen Gangepithelien und hoher CD4+ T-Zell-Präsenz in CP Geweben kann als Hinweis auf entzündungsinduzierte EMT gewertet werden.....	44
4.2	Durchflusszytometrische Färbung zur Reinheitsbestimmung der mittels negativer Selektion isolierter Teffs und Tregs	47
4.3	HPDE-Zellen erwerben eine spindelförmige Zellform vornehmlich durch Kokultur mit aktivierten Teffs.....	49
4.4	HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs weisen deutliche EMT assoziierte Veränderungen auf	51
4.5	Im xCELLigence System weisen HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs ein vermindertes Invasionsvermögen auf.....	56

4.6	Im Boydenkammer Assay weisen HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs ein erhöhtes Invasionspotential auf	57
4.7	Überstände aus Kokultur von HPDE-Zellen und aktivierten Teffs weisen erhöhte Spiegel von potenziellen EMT induzierenden Faktoren auf	59
4.8	Erhöhte Spiegel von TNF- α und IL-6 unter Kokultur mit aktivierten Teffs sind verantwortlich für den Erwerb eines mesenchymalen Phänotyps der HPDE-Zellen	61
5.	Diskussion	64
6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis	79
Danksagung	88
Lebenslauf	89
Publikationsverzeichnis	90

Abkürzungsverzeichnis

A	Österreich
AEC	3-Amino-9-Ethylkarbazol
APC	Allophycocyanin
BPE	Rinderhypophysenextrakt
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Kalifornien
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	Schweiz
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CP	Chronische Pankreatitis
CT-Wert	<i>cycle of threshold</i> -Wert
D	Deutschland
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
ECIS	Elektronische Zellsubstrat Impedanz Sensorik
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
et al.	Und andere (Latein: <i>et alii</i>)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	<i>forkhead-box-protein P3</i>
FW	<i>forward primer</i> , Vorwärtsprimer
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
HPDE	Humanes Pankreasgangepithel
IFN- γ	Interferon- <i>gamma</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktal Papillär-Muzinöse Neoplasie
IZC	Immunzytochemie
J	Japan
KSFM	Keratinozytenfreies Medium
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i> , L1 Zelladhäsionsmolekül

MA	Massachusetts
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mlg	Monoklonales Immunglobulin
ml	Milliliter
MNZ	Mononukleäre Zellen
mTGF-β1	Membrangebundene <i>Tumor growth factor-beta1</i>
MZN	Muzinös-Zystische Neoplasie
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
PA	Pennsylvania
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDAC	Duktale Pankreasadenokarzinom
PE	Phycoerythrin
PerCP/C5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein <i>complex-cyanine 5.5</i>
pg	Pikogramm
PSC	Pankreatische Sternzellen
rF	Relative Feuchte
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	Medium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>realtime polymerase-chain-reaction</i> , Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RV	<i>reverse primer</i> , Rückwärtsprimer
SIP1	<i>smad interacting protein1</i>
SF/HGF	<i>scatter factor/hepatocyte growth factor</i> , Hepatozyten-Wachstumsfaktor
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TCR	T-Zellrezeptor
TBP	<i>TATA-Box binding-protein</i>
Teffs	T-Effektorzellen
TGF-β	<i>transforming growth factor-beta</i> , Transformierender Wachstumsfaktor- <i>beta</i>
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor- <i>alpha</i>
Tregs	Regulatorische T-Zellen
u.a.	Unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
z.B.	Zum Beispiel

ZEB-1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox-1</i>
α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
α	<i>alpha</i>
β	<i>beta</i>
γ	<i>gamma</i>
κ	<i>kappa</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PanIN-Progressionsmodell.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der EMT in der Karzinogenese	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der MNZ Separation	26
Abbildung 4: Schematische Darstellung der CD4+ T-Zell-Isolierung.....	27
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Teffs- und Tregs-Isolierung.....	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kulturbedingungen der HPDE Zellen	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Boydenkammer	40
Abbildung 8: CD4+ T-Zell-Präsenz und EMT typische Expression in CP Geweben	47
Abbildung 9: Durchflusszytometrie zur Reinheitsprüfung negativ selektierter Teffs und Tregs	48
Abbildung 10: Kokultivierte aktivierte Teffs und Tregs	49
Abbildung 11: Zellmorphologie der HPDE-Zellen nach Mono- bzw. Kokultur	50
Abbildung 12: EMT Marker Expression in HPDE-Zellen nach Mono- bzw. Kokultur.....	52
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse von EMT Markern in HPDE-Zellen	54
Abbildung 14: Immunzytochemische Färbung von EMT Markern in HPDE-Zellen	55
Abbildung 15: Invasionsaktivität der HPDE-Zellen im xCELLigence-System	57
Abbildung 16: Relative Invasionsaktivität der HPDE-Zellen in der Boydenkammer.....	58
Abbildung 17: IL-6, TNF- α und IL-8 Konzentrationen in Überständen von mono- bzw. kokultivierten HPDE-Zellen.....	60
Abbildung 18: Zellmorphologie der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs und unter IL-6 oder TNF- α Blockade	61
Abbildung 19: EMT-Marker Expression in HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs und unter IL-6 oder TNF- α Blockade.....	62
Abbildung 20: Invasionsaktivität der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs unter IL-6 oder TNF- α Blockade	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kulturmedium für HPDE-Zellen.....	24
Tabelle 2: Protokoll der Antikörperkonzentrationen für die CD4+ T-Zell-Isolierung.....	27
Tabelle 3: Protokoll der Antikörperkonzentrationen für die Teffs- und Tregs-Isolierung...	29
Tabelle 4: Antikörperlösungen für die durchflusszytometrische Analyse der Reinheit der T-Zellpopulationen	33
Tabelle 5: Antikörperkonzentrationen für die durchflusszytometrische Färbung	34
Tabelle 6: Verdünnungsschema der Erstantikörper für die immunzytochemische Färbung.....	35
Tabelle 7: Charakteristika von CP und PDAC Patienten	44
Tabelle 8: Scoreverteilung der CD4+ und FoxP3+ T-Zell-Präsenz im CP und PDAC Gewebe.....	45
Tabelle 9: Scoreverteilung der EMT Marker Expressionen im CP Gewebe	45
Tabelle 10: Statistische Korrelationen der T-Zell-Präsenz mit EMT Markern in CP Geweben.....	46

1. Einleitung

1.1 Duktales Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) stellt mit 16700 Neuerkrankten im Jahr 2012 in Deutschland den häufigsten Tumor der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) dar [1]. Die Inzidenz des PDAC, die sich 2010 noch auf 8 Neuerkrankte pro 100000 deutscher Bundesbürger belief, zeigt eine steigende Tendenz, die sich für das Jahr 2016 bereits auf etwas über 9 Neuerkrankte erhöht haben soll. Vor allem aber zeigt die 5-Jahres Überlebensrate von gerade mal 8 % die Malignität dieses Tumorleidens, die sich in einer Sterbensrate widerspiegelt, die nahezu der altersstandardisierten Erkrankungsrate gleicht. Unter allen Krebserkrankungen ist das PDAC somit das Tumorleiden mit der geringsten Überlebensrate und die viert häufigste Krebstodesursache [1]. Gründe dafür sind die späte klinische Präsentation aufgrund unspezifischer Symptomerscheinung sowie die biologische Aggressivität dieser Tumorentität in Form früher Metastasierung und lokaler Infiltration peritumoröser Strukturen [2]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 75 Jahren, für Männer bei 71 Jahren [1]. Nachgewiesene Risikofaktoren stellen hohes Lebensalter, Nikotinkonsum und Adipositas dar, während in diesem Zusammenhang ebenfalls Faktoren wie fleischreiche Nahrung, Diabetes Mellitus Typ 2 und Alkoholkonsum Erwähnung finden [1]. Ein weiterer zentraler Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC ist neben einer genetischen Prädisposition, eine langjährige chronische Pankreatitis (CP) [3,4].

1.1.2 Pathologie

Die Bauchspeicheldrüse erfüllt eine endokrine Funktion als Hormonproduktionsort und eine exokrine Funktion als Organ zur Produktion der Verdauungssäfte und kann daher zwei verschiedene Krebsursprungsformen aufzeigen [5]. Dabei handelt es sich zum einen um die mit nur 5 % auftretenden endokrinen Neoplasien, die sich aus den neuroendokrinen Zelltypen der Langerhans-Inseln entwickeln [6,7]. Die anderen 95 % repräsentieren als Neoplasien des exokrinen Pankreas das muzinöse Zystadenokarzinom und das PDAC. Das PDAC stellt mit 90 % unter allen malignen Pankreastumoren die am häufigsten auftretende Tumorentität im Pankreas dar [6]. Als Ursprung des PDAC gelten Vorläuferläsionen, die von duktales Epithelzellen ausgehen. Etabliert und identifiziert wurden dabei die Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie

(PanIN), die Intraduktal Papillär-Muzinöse Neoplasie (IPMN) sowie die Muzinös-Zystische Neoplasie (MZN). Während die IPMN und MZN eher selten vorkommen, spielt die PanIN die wichtigste Rolle in der Entstehung des PDAC und ist am besten untersucht [8]. PanINs lassen sich nach Hruban et al. in die Stadien PanIN 1-3 einteilen, die sich nach der *Pancreatic Cancer Think Tank* von 1999 hinsichtlich ihrer morphologisch dysplastischen Erscheinungsform der Drüsenzellen unterscheiden lassen [9,10]. **Abbildung 1** skizziert und zeigt histologisch die verschiedenen PanIN Vorläuferläsionen.

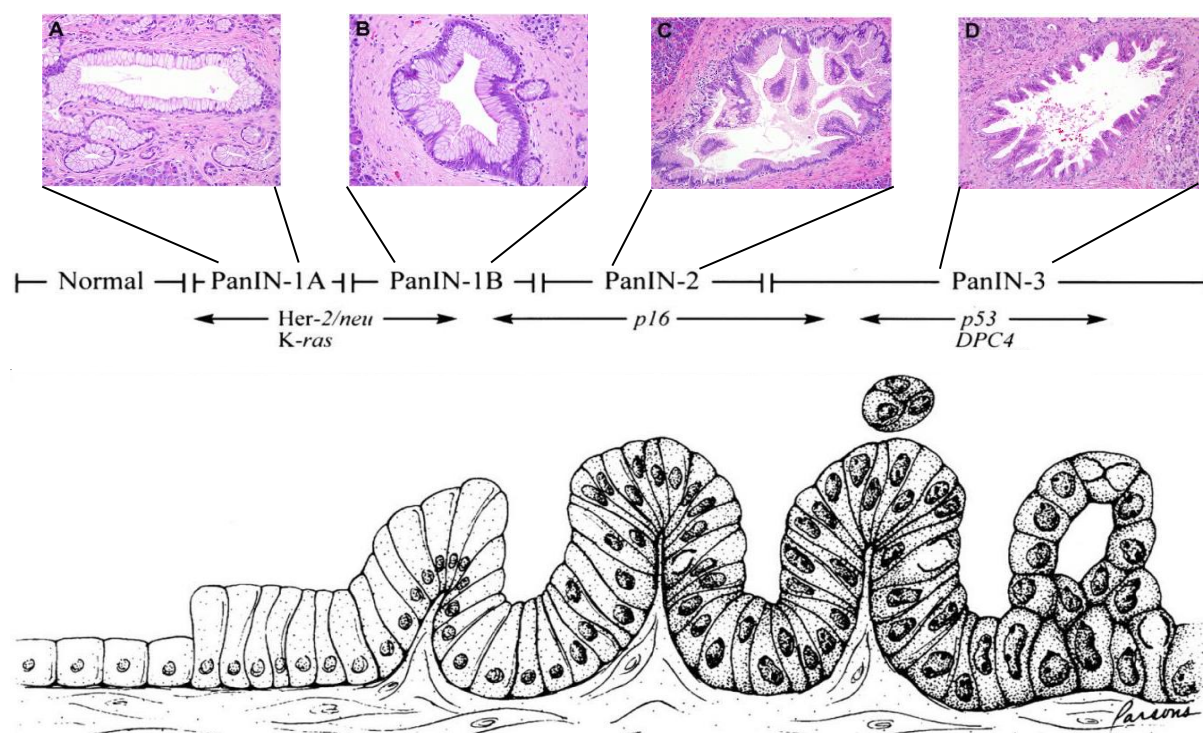


Abbildung 1: PanIN-Progressionsmodell

Die Skizze zeigt die Progression vom normalen pankreatischen Drüsenepithel bis hin zum PanIN-3 (Carcinoma in situ) unter Darstellung der histologischen und genetischen Veränderungen, die auf der Punktmutation im K-ras-Gen, Überexpression von Her-2/neu und der Inaktivierung von p16, p53 und DPC4 beruhen. Die histologischen Fotoserie (entnommen aus Maitra et al. [11]) zeigt die verschiedenen PanIN Stadien in Bezug zum Progressionsmodell (modifiziert nach Hruban et al. [9]). A= PanIN-1A, B=PanIN-1B, C=PanIN-2 und D=PanIN-3.

Das normale Gangepithel weist sich durch kubische Zellen mit amphophilen Zytoplasma und einer Zellpolarität gemäß seiner Funktion als sezernierendes Epithel aus. Die Zellen bilden flache Gangstrukturen und werden in den frühen Stadien PanIN-1A und -1B durch ihre prismatische Zellform und Muzinproduktion mit basal liegenden Zellkernen charakterisiert. Das Stadium PanIN-1B weist darüber hinaus eine papilläre Histologie auf. Diese papilläre Ausprägung nimmt in Stadium PanIN-2 noch weiter zu, auch atypische Hyperplasie genannt, und wird ergänzt durch abnorme Kernmorphologien, basale Mitosen und einem partiellen Verlust der Zellpolarität. Die Mitoserate nimmt

weiterhin in Stadium 3 stark zu und lässt zudem luminäre Zellwucherungen mit nekrotischen Zelluntergängen und Zellkerndysplasien erkennen. Im Vergleich zum Karzinom führt das Stadium PanIN-3, auch als Carcinoma in Situ (CIS) bezeichnet, zu keinem Durchbrechen der Basalmembran. Mit Fortschreiten der Stadien dezimieren sich die definitionsgemäßen Merkmale epithelialer Zellen [12]. Die frühen Stadien lassen sich zu 40 % bei Patienten über 50 Jahren bereits im nicht malignen Pankreasgewebe nachweisen, während sich nur noch 5 % der PanIN-3 Läsionen mit nicht malignen Pankreashistologien assoziieren lassen [12–14]. Dies suggeriert die wichtige Rolle der PanINs in nicht malignen Pankreasgeweben als Vorläufer für das invasive PDAC, das weiterhin gestützt wird durch das mit dem Grad der PanIN Klassifikation zunehmende Auftreten genetischer Alterationen [9]. Dies ermöglichte ein Tumorprogressionsmodell zu erstellen, das die morphologische Histopathologie mit den genetischen Alterationen kombiniert darstellt [15] (siehe **Abbildung 1**). Die genetischen Alterationen der Onkogene K-ras und HER2/neu manifestieren sich hierbei am frühesten [11]. Weitere im Verlauf der intraepithelialen Dysplasie hinzukommende Mutationen betreffen die Gene p53, p16 und DPC4 (SMAD1/2) [9].

Die histopathologische Aufarbeitung des PDAC Gewebes mit der Klassifikation des Tumordifferenzierungsgrades G1-4 (*grading*) und der Tumorausbreitung (*staging*) dient der Therapieplanung und Prognoseeinschätzung [16]. Während sich das *grading* G1-4 auf den Differenzierungsgrad des Tumors hinsichtlich der Drüsenarchitektur, der Muzinproduktion, der Mitosenanzahl und der Kernatypien bezieht [16], beschreibt das *staging* mittels des TNM-Systems und unter Hinzunahme bildgebender Diagnostik die Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), den Tumorbefall regionärer Lymphknoten (N) und den Nachweis von (Fern-) Metastasen (M) [17].

1.1.3 Desmoplasie

Für das PDAC charakteristisch ist eine sehr starke stromale Reaktion, auch desmoplastische Reaktion genannt, die vor allem von aktivierten pankreatischen Sternzellen (aktivierte PSC = Myofibroblasten) durch Produktion extrazellulärer Matrix (EZM) unterhalten wird [18]. Die Desmoplasie setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, die komplexe Auswirkungen auf Tumorwachstum, Migration und Invasion, Apoptoseresistenz sowie Immunevasion haben [18]. Immunevasion bezeichnet das Vermögen von Krebszellen sich vor Immunabwehrmechanismen schützen zu können [19]. Zu den Komponenten zählen die EZM, Myofibroblasten, Immunzellen der erworbenen und angeborenen Immunität, verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren

und ein Gerüst aus Blutgefäßen und Nerven [20,21]. Charakteristisch für die Desmoplasie des PDAC ist dabei, dass die Stromakomponenten die Zahl der eigentlichen Tumorzellen im Vergleich zu anderen Tumoren bei weitem überwiegen [22]. Entscheidend für den Zeitpunkt der Tumorentstehung ist in diesem Zusammenhang, dass es bereits in nicht malignen Pankreata mit frühen PanIN Stadien zur desmoplastischen Stromabildung mit Auswirkungen auf die duktaalen Pankreasepithelien kommt. Dieses Stroma verändert sich während der Tumorgenese und variiert in der Zellzusammensetzung mit dem Grad der präneoplastischen PanINs sowie dem *staging* und *grading* des PDAC [9,23,24]. Die Forschung ist daran interessiert, die unterschiedlichen Einflüsse der Komponenten dieser komplexen Tumormikroumgebung auf die maligne Progression duktaaler Pankreasepithelien zu untersuchen und ferner auch die Tumor-Stroma-Interaktion einschließlich der Wechselwirkungen der sezernierten Zytokine in einen Zusammenhang bringen zu können. So ist bis dato bekannt, dass Myofibroblasten den größten Teil des zellulären Stromas darstellen und verantwortlich sind für die Fibrosierung des Gewebes u.a. durch Produktion von Kollagen 1 und 3, sowie Fibronektin [25]. Diese fibrilläre EZM fördert Tumorwachstum, in dem sie Krebszellen in pankreatischen und anderen Tumorgeweben vor Apoptose schützt und sie resistent gegenüber systemischer Chemotherapie macht [26,27]. Die Myofibroblasten selbst haben einen protumorigenen Einfluss auf das PDAC, wie Lunardi et al. die Ergebnisse vieler Forschungsgruppen zusammenfassen und beschreiben, wie Myofibroblasten das Tumorwachstum, die Migration und Invasion sowie die Chemo- und Radiotherapieresistenz fördern können [28].

Das Immunsystem präsentiert sich durch Zellgruppen der angeborenen und erworbenen Immunität. Das desmoplastische Stroma generiert über die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen mit Produktion überwiegend immuninhibierender Zytokine ein vornehmlich immunsuppressives Mikromileu, das zur Tumorprogression beiträgt [29,30]. Inwiefern die einzelnen Immunzellen direkt protumorigen wirken und ob diese über immunsystemaktivierende oder –inhibierende Faktoren die protumorigenen Effekte ausüben ist hingegen noch überwiegend unklar. Neben Dendritischen Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, CD8+ T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, stehen Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems im Fokus vieler Forschungsgruppen. Neuere Studien sprechen Tumor assoziierten Makrophagen eine wesentliche Rolle in der frühen Tumorgenese zu [31]. Es werden PDAC assoziierte M1- und M2-Makrophagen unterschieden, die sowohl pro- und

antiinflammatorische Eigenschaften besitzen können und dessen ungeachtet beide einen protumorigenen Einfluss auf Pankreasgangepithelzellen ausüben [24].

Aktivierete T-Effektorzellen (Teffs) und regulatorische T-Zellen (Tregs) als Vertreter der CD4+ T-Zellen sind besonders hervorzuheben, da sie durch ihre starke Präsenz im Stroma und ihrem entgegengesetzten Verhalten bezogen auf die Aktivierung des Immunsystems einen Schwerpunkt in der Frage um stroma- und immunzellinduzierter Tumorprogression darstellen. Da ihr Einfluss auf pankreatische Epithelzellen in dieser Arbeit untersucht werden soll, werden sie im **Kapitel 1.3** gesondert beschrieben. In Hinblick auf die komplexe Zusammensetzung der desmoplastischen Stromareaktion im PDAC besteht großes Interesse, den Einfluss dieser Tumorumgebung auf die Tumorprogression besser zu erforschen, um die limitierten therapeutischen Möglichkeiten mit Elementen der Stromaumgebung als therapeutisches Ziel zu erweitern.

1.1.4 Therapie und Prognose

Obwohl sich unser Wissen auf dem Gebiet der PDAC Forschung während der letzten Jahrzehnte ständig erweitert hat, hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate kaum verändert [1]. Dafür verantwortlich sind die späte Diagnosestellung durch ein Fehlen spezifischer Frühsymptome und geeigneter Screening Maßnahmen [32], die Chemo- und Radiotherapie-Resistenz, die vielen Studien zufolge auf der ausgeprägten desmoplastischen Stromabildung beruht [33], die frühe Metastasierung sowie das lokal aggressive Infiltrationsverhalten in perineurale sowie vaskuläre Strukturen [2].

Vereinfacht dargestellt wird aus therapeutischer Sicht bei einem PDAC zwischen einem primär resektablen Tumor, einem primär inoperablen und lokal fortgeschrittenen Tumor, und einem metastasierten Tumor mit palliativer Therapiesituation unterschieden [16]. Die chirurgische Resektion stellt die einzige kurative Option dar. Eine komplett mikro- und makroskopische Schnittrand-negative Resektabilität des Tumors, die in der Klinik mit R0 definiert ist, kommt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch bei nur 20 % der Patienten in Frage [32]. Und selbst nach R0 Resektion wird die Überlebensrate nach 5 Jahren mit gerade mal 10 % - 20 % angegeben [34,35]. Um die Anzahl kurativer Resektionen zu erhöhen und die Rezidivraten zu verringern, bedarf es einem multimodalen Behandlungskonzept. Laut den deutschen Leitlinien stehen zurzeit die adjuvante Chemotherapie als Rezidivprophylaxe für alle R0 resezierten Tumore und die neoadjuvante Chemo- und Strahlentherapie für ein *downstaging* vor chirurgischer Intervention primär inoperabler Tumore als Additivverfahren zur chirurgischen Therapie

zur Verfügung, können diese aber nicht ersetzen [16]. Als Chemotherapieprotokolle werden die Pyrimidinanaloga Gemcitabin oder 5-FU/Folinsäure (Mayo-Protokoll) als adjuvante Chemotherapeutika eingesetzt, um das hohe Rezidivrisiko bei alleiniger chirurgischer Therapie zu verringern [36]. Neoadjuvant wird ein sequentielles Behandlungskonzept bestehend aus einer Chemotherapie mit dem Erstlinientherapeutikum Gemcitabin und einer Strahlenchemotherapie bei lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen Tumoren durchgeführt. In den deutschen Leitlinien wird derzeit keine Radiochemotherapie als adjuvantes Setting empfohlen [16]. Eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib kann bei einem metastasierten PDAC eingesetzt werden, alternativ dazu kommt bei Patienten mit einem günstigen Risikoprofil die Chemotherapiekombination von 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem sogenannten FOLFIRINOX-Protokoll zum Einsatz. Insgesamt kann der Einsatz von Chemotherapeutika die 5-Jahres Überlebensrate jedoch um gerade mal 10 % gegenüber der alleinigen chirurgischen Intervention verbessern [12].

Auf der Annahme basierend, dass das Stroma mitverantwortlich ist für die chemotherapeutische Resistenz, wird sich ein besseres Ansprechen des Tumors auf konventionelle Chemotherapien erhofft, indem die desmoplastische Reaktion in ihrer Vermehrung eingedämmt werden kann. Ferner jedoch ist das Ziel, die molekularen und zellulären Schlüsselmechanismen der Stroma- und Immunzell induzierten Tumorprogression zu erforschen und zu verstehen, damit durch ein direktes Eingreifen in die Stroma-Tumor-Interaktion die Karzinogenese so früh wie möglich verhindert werden kann. Zwar werden jenseits von Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie in jüngster Zeit vermehrt Ansätze verfolgt, die versuchen in die Immunantwort bei PDAC Patienten einzugreifen, jedoch konnte bisher kein immunologischer Ansatz als Standardtherapie etabliert werden [37].

1.2 Chronische Pankreatitis

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die CP ist durch eine rezidivierende Entzündung mit Fibrosierung der Bauchspeicheldrüse gekennzeichnet. Die Inzidenz wird mit 23 pro 100000 Neuerkrankten pro Jahr angegeben und Zahlen aus dem Jahre 2008 ergaben eine jährliche Krankenhausaufnahme in Deutschland von 10267 erkrankten Patienten. Die Letalität infolge einer CP wird bei einer Beobachtungszeit von etwa 8 Jahren mit 12,8 –

19,8 % angegeben. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Als wichtigster Risikofaktor ist der Konsum von Alkohol bekannt. Weitere Ursachen sind autoimmuner, infektiöser oder idiopathischer Genese sowie das Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, familiäre Assoziation, *Helicobacter pylori* und Adipositas [38,39].

1.2.2 Pathologie

Es bestehen verschiedene Hypothesen zur Pathogenese der CP. Whitcomb et al. vereinten diese Konzepte und skizzierten mittels aktueller molekularer und zellulärer Grundlagen der Immunologie ein Modell, bei dem es zunächst durch einen akuten Entzündungsreiz zur Zytokinfreisetzung (vornehmlich *transforming growth factor-beta1* (TGF- β 1)) kommt. Bleibt dieser Reiz bestehen, führt das Zytokinmilieu von einem einst aktiv entzündlich geprägten Zellinfiltrat zu einer chronisch-entzündlichen Zellinfiltration und Aktivierung von PSCs, die ihrerseits Zytokine freisetzen, die die Entzündung unterhalten, Kollagene produzieren und eine Parenchymzerstörung über eine irreversible Fibrose bewirken [40,41]. Additiv beschreibt die Hypothese der Nekrose-Fibrose-Sequenz, die 1993 von Klöppel und Maillet beschrieben und von Ammann et al. 1996 erneut belegt wurde, die Fibrosierung der CP als Folge rezidivierender akuter Pankreatitiden. Hiernach führt jeder Schub fokal zu einer Nekrose, die eine inflammatorische Reaktion nach Whitcomb et al. induziert und somit zur Fibrose des Organs führt.

Darüber hinaus lassen sich in der CP bereits PanINs 1-3 nachweisen. Verschiedene Studien stellten auch hetero- und homozygote Mutationen der Gene *Kras*, *p53* und *p16* im prämaligen, chronisch entzündeten Geweben fest [21,23,42,43].

Klinisch manifestiert sich die CP im fortgeschrittenen Zustand in einer exokrinen und endokrinen (Diabetes mellitus) Insuffizienz [44].

1.2.3 Desmoplasie

Die CP stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC dar, indem sich ebenso wie im PDAC eine ausgeprägte Desmoplasie entwickelt [18]. Die chronisch fibrosierende Entzündung mit Parenchymverlust und Immunzellinfiltraten bei der CP ähnelt morphologisch auf den ersten Blick dem histologischen Bild der Desmoplasie im PDAC, doch lassen sich bei der stromalen Zellzusammensetzung und der Lokalisation der Zellinfiltrationen Unterschiede verzeichnen. Für die CP ist ein periduktales lymphozytenreiches Infiltrat typisch [45]. Helm et al. beschreiben die unterschiedlichen zellulären Zusammensetzungen des stromalen Gewebes wie folgt: Die Anzahl an Myofibroblasten (definiert über *α -smooth muscle actin* (α -SMA) Expression), die den

Hauptteil des Stromalen Gewebes im PDAC ausmachen, ist bereits in der CP stark erhöht. CD4+ und CD8+ T-Zellsubpopulationen sowie Makrophagen sind hingegen häufiger im desmoplastischen Stroma der CP vertreten, während der Anteil spezieller Subgruppen an CD4+ T-Zellen (über CD25+ und FoxP3+ Expression definierte Tregs) wiederum größer im PDAC Gewebe ist [24].

1.2.4 Therapie und Prognose

Die initiale Therapie eines entzündlichen Prozesses ist zunächst immer die Ursachenbekämpfung bzw. Ausschaltung der Risikofaktoren, im Falle der CP die häufig nötige Alkoholkarenz. Neben Schmerztherapie nach dem WHO-Stufenplan und initialer Nahrungskarenz wird auf die Supplementation der exokrinen Verdauungsenzyme und endokrinen Hormone unter Blutzuckerkontrollen geachtet. Das langfristige Ziel der konservativen Therapie besteht in der Prophylaxe des akuten Schubes einer CP. Jeder zweite Patient mit einer CP muss sich im Verlauf seiner Erkrankung einer endoskopischen oder chirurgischen Intervention unterziehen, hierfür sind Komplikationen wie u.a. Pankreasgangstenosen oder Pankreaspseudozysten verantwortlich [39,46,47]. Eine Heilung der CP ist trotz vieler Therapieansätze bisher nicht möglich, jedoch führt die frühe Behandlung von Symptomen und Komplikationen zu einer verbesserten Lebensqualität der Patienten [48]. Patienten mit einer CP haben ein 16-fach erhöhtes Risiko, ein PDAC zu entwickeln, so dass die CP als ein wesentlicher Risikofaktor für das PDAC gilt [38].

1.3 T-Zellen

T-Zell-Lymphozyten gehören als Untergruppe der Leukozyten dem erworbenen Immunsystem an und haben ihren Ursprungsort im Knochenmark und ihren Reifungsort im Thymus. Sie unterscheiden sich durch ihren T-Zellrezeptor (TCR) von anderen Leukozyten und den B-Zell-Lymphozyten [49] und lassen sich je nach TCR-Aufbau aus 4 verschiedenen $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ -Proteinketten in zwei Typen unterteilen: die selteneren $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einem $\gamma\delta$ -Heterodimer, deren Funktion bis heute nicht eindeutig geklärt ist, und die $\alpha\beta$ -T-Zellen mit einem $\alpha\beta$ -Heterodimer [50]. Letztere treten durch Bindung ihres TCR an *major histocompatibility complex*-I- (MHC-I-) oder MHC-II-Moleküle, die spezifische Antigene präsentieren, in eine aktivierte Form über und erfüllen je nach Zellart unterschiedliche Funktionen. So können sie, vereinfacht dargestellt, potentielle Feindzellen durch sezernierende Enzyme direkt abtöten (CD8+ zytotoxische T-Zellen),

mittels Zytokinen andere Immunzellen und sich selbst aktivieren (CD4+ T-Helferzellen = CD4+ T_H-Zellen) oder aber das eigene Immunsystem supprimieren und somit eine Selbsttoleranz gewährleisten (CD4+CD25+FoxP3+ Tregs) [49]. Da CD4+ T-Zellen im desmoplastischen Stroma des PDAC und der CP einen großen Anteil einnehmen, soll neben ihren eigentlich immunologischen Funktionen in dieser Arbeit deren Einfluss auf Pankreasgangepithelien untersucht werden.

1.3.1 Teffs

T-Effektorzellen (Teffs), wie sie in der Literatur beschrieben werden, bezeichnen zunächst alle aktivierten Formen von T-Zellen, darunter auch CD8+ T-Zellen und Tregs, die eine Effektorfunktion in der Immunabwehr einnehmen [49]. In dieser Arbeit werden hingegen nur diejenigen T-Zellen als Teffs bezeichnet, die den Phänotyp CD4+CD25- aufweisen, Zytokin vermittelte T_H-Zell Funktionen ausüben und sich dadurch von zytotoxischen CD8+ T-Zellen und den immunsuppressiven CD4+CD25+ Tregs unterscheiden. Seit der Erstbeschreibung eines einst dichotomen Subgruppensystems der CD4+ T-Zellen (T_H1-/T_H2-Zellen) von Mosmann und Coffman 1986, komplementieren heutzutage weitere Subgruppen die CD4+ Teffs. Naive CD4+ T-Zellen reifen über Antigenkontakt und einem Differenzierungssignal ihrer Umgebung in Form eines Zytokins oder Moleküls zu verschiedenen Effektorzellen [51]. Beschriebene T_H-Subtypen inkludieren unter anderem T_H1-, T_H2-, T_H9-, T_H17-, T_H22-Zellen, die sich über ihre unterschiedlichen Zytokinprofile sowie ferner deren aktivierten Transkriptionsfaktoren unterscheiden [51–55]. Zu der Vielzahl sezernierter Zytokine gehören u.a. IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), Interferon-*gamma* (IFN- γ) und Tumor Nekrose Faktor-*alpha* (TNF- α) [51,52,56,57], die verschiedene Immunzellen adressieren können und somit entsprechende Immunantworten hervorrufen. Den Teffs kommt die Aufgabe zugleich, als Aktivatoren für ihre Zielzellen zu fungieren (Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen) und somit die zelluläre oder humorale Immunantwort zu unterstützen [49]. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Zellen nach einstiger Zuordnung zu einer Untergruppe über Signale ihrer Umgebung induziert zu anderen T_H-Subtypen transformieren können und sich durch diese Plastizität an ihre Umgebung adaptieren können [56]. In Hinblick auf onkologische Krankheitsmodelle konnten verschiedenen T_H-Subtypen durch ihre Präsenz in Tumorgewebe anti- oder protumorigene Effekte zugesprochen werden [56,57]. Es ist jedoch bisher noch wenig über die Faktoren bekannt, durch die diese Effekte ausgelöst werden.

1.3.2 Tregs

Überschießende Immunreaktionen stellen eine Gefahr für den menschlichen Körper dar. Um eine Selbsttoleranz zu gewährleisten und Autoimmunerkrankungen zu vermeiden, gibt es regulatorische Zellen in unserem Immunsystem, die die Immunantwort über Inhibition aktivierter Tefs supprimieren können. Inhibierende Wirkmechanismen der Tregs sind neben der zytokinvermittelten Inaktivierung der Tefs über IL-10 und TGF- β auch die direkte Zelleliminierung mittels Granzymen und Perforinen sowie der Induktion einer über den Fas-Liganden vermittelten Apoptose [49].

Sakaguchi et al. konnten bereits 1995 die Existenz dieser Immunsysteminhibierenden Zellen nachweisen und ihre Wichtigkeit als Schutz vor Autoimmunerkrankungen in einem Mausmodell darlegen. Des Weiteren half diese Studie dabei, die Tregs über die Expression von CD4 und CD25 zu charakterisieren [58]. Der Transkriptionsfaktor *forkhead-box-protein P3* (FoxP3) ist derweil der spezifischste Marker für Tregs, lässt aber wegen seiner Lokalisation im Nukleus keine Isolierung der Zellen über diesen Faktor für *in vitro* Versuche zu. Entgegen früherer Annahmen können jedoch auch andere aktivierte CD4+ T-Zellen FoxP3 und CD25 exprimieren, weshalb CD25 als alleiniger Marker zur Isolierung von Tregs aus einer CD4+ T-Zell-Population nicht genügt [59]. Kleinewietfeld und al. konnten daraufhin belegen, dass Tregs im Gegensatz zu Tefs weder CD49d noch CD127 exprimieren. Daraus ergab sich die Methode der negativen Antikörpermagnet-Separation (engl.: *magnetic bead separation*), die auch in dieser experimentellen Arbeit zur Isolierung CD4+CD25+CD49d-CD127- Tregs genutzt wurde [60].

Tregs machen nur etwa 5 % der peripheren CD4+ T-Zellen aus [61]. Trotz des geringen Anteils an CD4+ T-Zellen haben Tregs durch ihre gesonderte Stellung als immunsysteminhibierende Kraft einen gewissen Stellenwert in der Erforschung Malignität fördernder Faktoren der Tumorumgebung erlangen können. So gibt es Befunde, die belegen, dass sich im Tumorgewebe des PDAC der Anteil CD4+CD25+FoxP3+ Tregs erhöht und dass diese Erhöhung mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht [62–64]. Ferner wird der Erwerb Malignität assoziierter Eigenschaften von PDAC-Zellen mit der Präsenz von Tregs im Tumorgewebe korreliert [65,66].

1.4 Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)

1.4.1 Definition der EMT

Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) beschreibt einen in der embryonalen Entwicklung physiologisch vorkommenden Prozess. Im Zuge der Embryogenese müssen sich epitheliale Zellen aus ihren stabilen Zellverbänden lösen und an neue Orte migrieren, um sich dort wiederum in Zellverbänden zu neuen Organen zu formieren. Dafür müssen Epithelzellen über epigenetische Veränderungen ihre epithelialen Charaktereigenschaften aufgeben und mesenchymale Eigenschaften annehmen [67].

Epithelien sind Zellen mit einer Polarität, die sich über eine apikal-luminale und eine baso-laterale Seite definieren lassen. Der basale Pol einer Epithelzelle heftet an einer Basalmembran, über die die Zelle an der EZM verankert ist, während sie mit den anderen Zellen über laterale Kontakte verbunden ist. Sie bilden über Adhäsionsmoleküle der Cadherin- und Immunglobulin-Superfamilie Zell-Zell- und über die Gruppe der Integrine Zell-Matrix-Kontakte (*tight junctions*, *adherens junctions*, *desmosome* und *gap junctions*) und bilden somit einen Verband, aus dem sich einzelne Epithelzellen nicht einfach lösen können [67]. Vor allem eines dieser Adhäsionsmoleküle wird in der Literatur zur spezifischen Charakterisierung von Epithelzellen herangezogen: E-Cadherin ist ein transmembranöses Protein, welches durch die intrazelluläre Domäne an Cateninen und darüber mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist und extrazellulär über Immunglobuline interzelluläre Kontakte (*adherens junctions* und *desmosome*) eingeht [67]. Weitere beschriebene Epithelmarker sind Occludin, Claudin, Desmoplakin und die aus der Gruppe der Intermediärfilamente stammenden Zytokeratine [68–70].

Mesenchymale Zellen bilden hingegen keine geordneten Zellverbände, sondern liegen einzelnstehend vor, haben über ein wechselhaftes Aktin-Zytoskelett mit Pseudopodienausbildung einen invasiv motilen Phänotyp und besitzen ferner keinen Kontakt zu einer Basalmembran. Morphologisch zeichnen sie sich durch eine spindelförmige Zellform aus. Für das mesenchymale Expressionsprofil lassen sich Proteine wie Vimentin, N-Cadherin, α -SMA, Fibronectin und Desmin nachweisen [71], von denen Vimentin als unabdingbarer Induktor einer EMT hervorgehoben werden muss [72]. Vimentin ist ein mesenchymales Intermediärfilament, das der Zelle eine spindelförmige Zellform verleiht und sie zur Motilität befähigt [73].

Die EMT wird induziert durch ein Zusammenspiel extrazellulärer Signale der EZM wie Kollagene, Hyaluronsäure und lösliche Wachstumsfaktoren wie TGF- β , *fibroblast growth factor* (FGF), *epidermal growth factor* (EGF) und *scatter factor/hepatocyte growth factor*

(SF/HGF). Diese Faktoren aktivieren über Signalwege der GTPasen der Rho- Ras- und Rac-Familien Transkriptionsfaktoren wie Slug, Snail, Twist, *smad interacting protein1* (SIP1) und *Zinc finger E-box-binding homeobox-1* (ZEB-1) [71,74,75]. Die Transkriptionsfaktoren Slug und Snail sind Zinkfinger-Proteine und bewirken gemeinsam mit oben genannten Transkriptionsfaktoren eine Herunterregulierung epithelialer Marker wie E-Cadherin, Claudin und Occludin sowie eine Heraufregulierung mesenchymaler Marker wie Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin [74,76–78].

In den letzten Jahren hat die EMT verstärkte Aufmerksamkeit in der onkologischen Forschung erlangt, weil beobachtet wurde, dass Krebszellen ebenso EMT Prozesse durchlaufen, indem sie einem Verlust epithelialer Charakteristika unterliegen und sich für die Fähigkeit der Invasivität und Metastasenbildung mesenchymale Eigenschaften aneignen müssen.

1.4.2 EMT in der Karzinogenese

Die meisten Tumore sind Karzinome, die von Epithelzellen ausgehen [79]. Zunächst werden diese Zellen noch durch eine Basalmembran in einem Zellverbund gehalten. Mit der Dissolution von Haftkontakten durch Fehlen epithelialer Adhäsionsmoleküle und dem Zugewinn mesenchymaler Motilitätsproteine kann das Karzinom in das umliegende Gewebe invadieren und ferner durch Intravasation der Blut- und Lymphgefäße Metastasen bilden [80]. Dieser Prozess erfordert die Veränderungen einer EMT, wie sie in **Kapitel 1.4.1** beschrieben wurden und in **Abbildung 2** skizziert zu sehen sind.

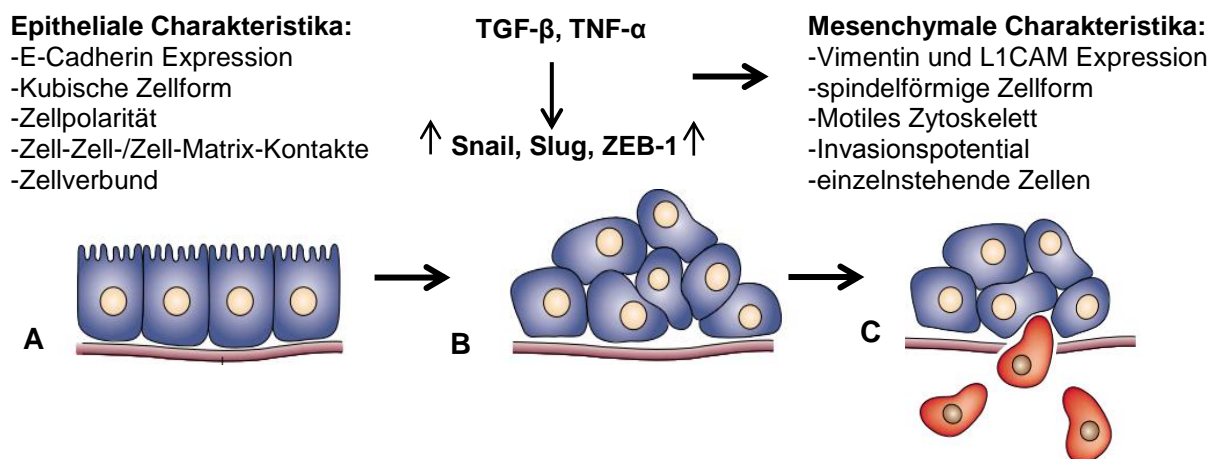


Abbildung 2: Schematische Darstellung der EMT in der Karzinogenese

Aus dem normalen kubischen Epithel (A), das durch Adhäsionsmoleküle an einer Basalmembran verankert ist, kann sich durch unkontrollierte Proliferation ein dysplastisch formiertes Epithel entwickeln (B), das schließlich zytokingesteuert einem durch aktivierte Transkriptionsfaktoren vermittelten Verlust epithelialer Adhäsionsmoleküle unterliegt und über Zugewinn mesenchymaler Eigenschaften einen invasiven Phänotyp annimmt (C). Es kommt zu einem Auflösen der Zell-Zell-Kontakte bzw. der Zell-Matrix-Kontakte und einem Polaritätsverlust der Zelle. Modifiziert nach Thiery et al. [67] und Dang-Garimella et al. [81].

Die EMT in der Karzinogenese ist folglich ebenso über den Verlust des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin sowie den Erwerb des mesenchymalen Markers Vimentin charakterisiert [82]. Bei einem weiteren Tumor assoziierten EMT Marker handelt es sich um das Adhäsionsmolekül *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM), das ebenfalls verstärkt in Tumorzellen detektiert werden konnte, die den Prozess einer EMT durchliefen. Eine erhöhte Expression von L1CAM führt zu einem verstärkten Invasionspotential und ist mit einer erhöhten Apoptose- und Chemoresistenz sowie einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert [83–85].

Ferner konnten die oben genannten EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug und ZEB-1 in vielen Tumorentitäten detektiert werden. Die Überexpression von Snail korreliert mit dem Verlust der E-Cadherin Expression. Es konnte gezeigt werden, dass das Zinkfingerprotein ZEB-1 die E-Cadherin Expression durch Bindung an einer ähnlichen DNA-Promotorregion reprimiert, mit der auch Snail die E-Cadherin Expression inhibiert [84,86].

Die EMT in der Karzinogenese wird durch äußere Signale induziert. Neben Molekülen der EZM ist auch das Tumor assoziierte Stroma, als Produzent dieser EMT induzierenden Proteine, an der EMT beteiligt [87]. Als bekanntester und am besten erforschter EMT Induktor in der Karzinogenese gilt hierbei der Wachstumsfaktor TGF- β [67,74]. Huber et al. beschreiben zusätzlich eine EMT Induktion über Aktivierung von *nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) durch TNF- α [88]. Diese EMT assoziierten Prozesse, wie bereits in verschiedenen Tumorentitäten wie u.a. dem Kolorektalkarzinom und Ösophagusadenokarzinom nachgewiesen, führen zu einem verstärkten Invasions- und Migrationspotential, einer Chemotherapie- und Apoptoseresistenz sowie zu einer verlängerten Lebensdauer der Krebszellen [68,87,89,90].

1.4.3 EMT im PDAC

Auch beim PDAC leistet die EMT einen wesentlichen Beitrag an der Entstehung und Progression dieses Tumors. Typisch ist die Herunterregulierung von E-Cadherin im humanen PDAC [91] sowie die Heraufregulierung von Vimentin [92]. In humanen malignen Gangepithelien sowie bereits in frühen PanIN Vorläuferläsionen konnte auch L1CAM für das PDAC nachgewiesen werden [85]. Geismann et al. konnten zusätzlich zeigen, dass TGF- β 1 und Snail zu einer wesentlichen Hochregulation der L1CAM Expression in Tumorzellen führen [83]. Hotz et al. konnten die Hochregulierung der Transkriptionsfaktoren Snail und Slug im humanen PDAC nachweisen [90]. In einer

weiteren Studie konnte mittels *tissue microarray analysis* von PDAC Geweben eine inverse Korrelation zwischen der Expression von ZEB-1 und einer E-Cadherin Expression hergestellt werden [93]. Es gelang folglich für das PDAC und auch für PanIN Vorläuferläsionen der Nachweis EMT typischer Veränderungen von L1CAM, Vimentin und E-Cadherin sowie EMT induzierender Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug und ZEB-1. Zudem konnten Korrelationen zwischen einer schlechten Prognose der Patienten und dem Erwerb mesenchymaler Marker wie Vimentin, L1CAM, Slug und Snail bzw. dem Verlust epithelialer Marker wie E-Cadherin hergestellt werden [83,91,92]. Für einige Stroma- und Immunzellen der desmoplastischen Reaktion des PDAC Gewebes lässt sich deren Präsenz mit dem Erwerb dieser EMT assoziierten Charakteristika in Verbindung bringen [30,66,94]. In chronisch entzündeten Pankreata wurden bisher EMT assoziierte Veränderungen jedoch nur in murinen Vorläuferläsionen in Gegenwart von Immunzellen nachgewiesen [23]. Ob humane Pankreasgangepithelien bereits im Rahmen einer chronischen Entzündung eine EMT durchlaufen und welche Faktoren als EMT Induktoren daran beteiligt sind, soll in dieser Arbeit experimentell untersucht werden.

1.5 Zielsetzung

PDAC Patienten haben aufgrund des aggressiv invasiven Wachstums und der frühen Metastasierung des Tumors eine sehr ungünstige Prognose. Der Nachweis EMT assoziierter Veränderungen in PDAC Geweben geht mit einer schlechten Prognose für die Patienten einher und begründet somit dessen Wichtigkeit in der Erforschung Malignität induzierender Prozesse innerhalb des Pankreasgewebes. Hierbei steht das Tumor dominierende Stroma als Hauptinduktor der EMT im Mittelpunkt der PDAC Forschung mit der Frage, über welche Faktoren und zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung die einzelnen Stromakomponenten die Karzinogenese beeinflussen. Die CP gilt als Risikofaktor für die Entstehung eines PDAC, da sich in der CP bereits Vorläuferläsionen des PDAC sowie eine aktive Desmoplasie mit Immunzellen, die im PDAC mit dem Erwerb maligner Eigenschaften assoziiert werden, detektieren lassen. Basierend auf diesen Fakten und ausgehend von der Erkenntnis, dass eine erhöhte Präsenz von Tregs im Stroma der PDAC mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht [64], war Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob CD4⁺ Tregs und CD4⁺ Teffs bereits während einer CP in humanen Pankreasgangepithelien EMT typische Veränderungen induzieren. Dafür wurden Gewebeschnitte von CP Patienten

auf den EMT Marker Vimentin untersucht und diese Daten mit zuvor erhobenen Befunden zur Präsenz von CD4+ T-Zellpopulationen im Stroma sowie L1CAM und E-Cadherin Expressionen in Pankreasgangepithelien derselben Gewebeschnitte verglichen. In *in vitro* Kokulturversuchen soll eine direkte Interaktion von CD4+ Teffs und Tregs mit nicht malignen humanen Pankreasgangepithelien (HPDE-Zellen) simuliert werden, um isoliert den Einfluss von T-Zellsubgruppen auf HPDE-Zellen hinsichtlich EMT assoziierter Veränderungen zu untersuchen. Die Teffs und Tregs werden über die Methode der negativen magnetischen Separation nach Kleinewietfeld et al. aus zuvor gewonnen mononukleären Zellen (MNZ) aus Blut gesunder Spender isoliert [60]. Die Charakterisierung der HPDE-Zellen nach 72 stündiger Mono- bzw. Kokultur in Hinblick auf EMT assoziierte Veränderungen wird mittels mikroskopischer Begutachtung der Zellmorphologie, Echtzeit-Polymerasekettenreaktion-Analysen (*realtime polymerase-chain-reaction*, RT-PCR), immunozytochemischer (IZC) und durchflusszytometrischer Färbungen sowie Invasionsassays untersucht. Ferner sollen mittels Bio-Plex Analyse die Überstände der Mono- und Kokulturen auf EMT induzierende Zytokine untersucht werden. Durch Blockade dieser Faktoren während der Kokultur und anschließender Expressions- und Funktionsanalysen der HPDE-Zellen soll überprüft werden, ob diese Zytokine kausal für EMT Veränderungen der HPDE-Zellen verantwortlich sind.

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis darüber geleistet werden, ob bereits im Rahmen einer CP CD4+ T-Zellen in Pankreasgangepithelien Malignität assoziierte Veränderungen in Form einer EMT hervorrufen können und welche Zytokin vermittelten Effekte dabei als EMT Induktoren beteiligt sein könnten.

2. Material

2.1 Geräte

GyroTwister Schwänker	Labnet, Woodbridge, Vereinigte Staaten von Amerika (USA)
HERAFreeze Basic Tiefkühler (-80°C)	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland (D)
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Stuart SRT9 Rollermixer	Bibby Scientific Ltd., Stone, Vereinigtes Königreich (UK)
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, D
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, D

Pipetten

Finnpipette 0.2-2 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 100-1000 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 20-200 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Finnpipette 2-20 µl	Thermo Scientific, Schwerte, D
Multipipette	Thermo Scientific, Schwerte, D
Ripette	Ritter, Schwabmünchen, D

Zentrifugen

Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
Heraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte, D
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, D
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, D

Messgeräte

xCELLigence RTCA DP Analyzer	Roche, Basel, Schweiz (CH)
FACScalibur™ Durchflusszytometer	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Light Cycler® 480-System	Roche, Basel, CH
Photometer Sunrise	TECAN, Männedorf, CH
Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c, PeqLab, Erlangen, D

Mikroskope

AE2000	Motic, Wetzlar, D
Axioskop 40	Zeiss, Jena, D
Axiovert 25	Zeiss, Jena, D
BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, D
Evos XL Core	AMG, Bothell, USA

Inkubationsgeräte

BBD 6220 CO ₂ -Incubator	Thermo Scientific, Schwerte, D
-------------------------------------	--------------------------------

Computerprogramme

BZ-9000 Image Analysis Application	Keyence, Neu-Isenburg, D
FACScalibur Software	BD Bioscience, San Jose, USA
LightCycler480 Software	Roche, Basel, CH
Microsoft Office	Microsoft Corporation Redmond, USA
SigmaPlot 12.5	Systat Software, Inc., Chicago, USA
WinMDI 2.8	Freeware, entwickelt von Joe Trotter

2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
24-/ 96-Well-Flachbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
15 ml / 50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
24-Well-Transwelleinsätze, 8 µm Porengröße	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
96-Well-PCR-Platten, weiß	Roche, Basel, CH
96-Well-Rundbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
10 µl / 100 µl / 1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
1.25 ml / 5.0 ml Ritips	Ritter, Schwabmünchen, D
CryoPure Gefäß 1,0 ml weiss	Sarstedt, Nümbrecht, D
FACS-Röhrchen	Sterilin, London, UK
MACS-LS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS-LD-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Nitril-Untersuchungshandschuhe	Ansell GmbH, München, D
Parafilm „M“	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, D
Skalpell	Feather, Osaka, Japan (J)
Spritzen	BD Discartid. Heidelberg, D
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter, D

2.3 Chemikalien und Reagenzien

3-Amino-9-Ethylkarbazol (AEC)	Dako Diagnostika, Hamburg, D
Substrat Chromogen Ready-to-use	
<i>Accutase solution</i>	EMD Millipore Corporation, Temecula, California, USA
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Biomol, Hamburg, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human recombinant	Life Technologies, Darmstadt, D
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
<i>Fixation/Permeabilization Concentrate</i>	eBioscience, Frankfurt a.M., D.
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, D
Kaiser's Glyceringelatine	Waldeck GmbH, Münster, D
Kollagen Typ I	Sigma-Aldrich, München, D
Kristallviolett	Walter CMP, Kiel, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
LightCycler480 CYBR Green Master I	Roche, Basel, CH
Mayers Hämalun	Applichem, Darmstadt, D
Pancoll human	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, D
<i>phosphate buffer solution (PBS)</i>	PAA, Pasching, A
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience, Frankfurt a.M., D.
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Life Technologies, Darmstadt, D
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
Streptavidin Peroxidase-Konjugat	Jackson Immuno Research, Bar Harbor
Triton X100	Sigma-Adrich, München, D
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, A
X-VIVO	Lonza, Köln, D

2.4 Rezepturen

Kristallviolett-Lösung	300 mg Kristallviolett 6 ml Ethanol 2 % (v/v) 300 ml Boratpuffer (0,1 M; pH 8,5)
MACS-Puffer	100 ml PBS 0,5 g BSA
RPMI-Medium und Keratinozytenfreies Medium (KSFM) (1:1) für die Passagierung der HPDE6c7 Zelllinie	+ 0.5 % (v/v) L-Glutamin + 5 ng/mL EGF + 5 % (v/v) FCS + 50 µg/mL BPE
RPMI-Medium für Invasionsassays der mono- und kokultivierten HPDE-Zellen	+ 1 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) L-Glutamin

2.5 Antikörper und Reagenzien

2.5.1 T-Zell-Isolierung mittels magnetischer Separation

Reagenz	Firma
CD49d Biotin Antikörper, <i>human</i> (monoklonales ImmunglobulinG2b (mIgG2b), Klon: MZ18/24A9)	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, Kalifornien (CA), USA
CD127 Biotin Antikörper, <i>human</i> (mIgG2a, Klon: MB15/18C9)	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA
CD25 Micro Beads II, <i>human</i> (mIgG1)	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA
anti-Biotin MicroBeads, <i>human</i>	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA

2.5.2 Durchflusszytometrische Reinheitsprüfung

Lösung	Antikörper (Verdünnungsverhältnis in MACS-Puffer)
A	Fluoresceinisothiocyanat (=FITC)-konjugiertes mIgG2b (1:20)
	Allophycocyanin (=APC)-konjugiertes mIgG2b (1:80)
	Peridinin-chlorophyll-Protein <i>complex-cyanine</i> 5.5 (=PerCP/C5.5)-konjugiertes mIgG1 (1:20)
	Phycoerythrin (=PE)-konjugiertes mIgG2a (1:600)
B	FITC-konjugiertes anti-CD4 (Klon: OKT4) (1:20)
	APC-konjugiertes anti-CD25 (Klon BC96) (1:20)
	PerCP/C5.5-konjugiertes anti-CD127 (mIgG1, Klon: HCD127) (1:20)
	PerCP/C5.5-konjugiertes anti-CD49d (mIgG1, Klon: 9F10) (1:20)
C	FITC-konjugiertes anti-CD4 (Klon: OKT4) (1:20)
	PE-konjugiertes anti-CD25 (Klon BC96) (1:20)

2.5.3 Immunzytochemische Färbung

Antigen (Klon)	Firma	Spezies/Isotyp
E-Cadherin (32A8)	Cell Signalling, Frankfurt a.M., D	Maus/IgG1
L1CAM (14.10)	*	Maus/IgG1
Vimentin (V9)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Maus/IgG1

* generiert und zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Gerd Moldenhauer, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg

Reagenz	Firma
Biotin-SP-konjugierter <i>rabbit-anti-mouse</i> IgG Antikörper	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, Pennsylvania (PA), USA
Peroxidase konjugiertes Streptavidin	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA

2.5.4 Durchflusszytometrische Färbung

Antigen (Klon) bzw. Kontrollantikörper	Firma	Spezies/Isotyp	Konjugat
E-Cadherin (67A4)	Biolegend, Fell, D	Maus/IgG1	AlexaFluor647
IgG1	Biolegend, Fell, D	Maus/ IgG1	AlexaFluor647
L1CAM (9.3)	*	Maus/IgG1	
IgG1	R&D Systems, Minneapolis, USA	Maus/IgG1	
Vimentin (V9)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Maus/IgG1	Alexa488
IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D	Maus/IgG1	Alexa488

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

Reagenz	Firma
Biotin-SP-konjugierter <i>rabbit-anti-mouse</i> IgG Antikörper	Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA
Streptavidin PerCP/Cy5.5	Biolegend, Fell, D

2.6 Inhibitoren

Reagenz	Firma	Spezies/Isotyp	Konzentration
TNF- α Inhibitor (Etanercept) Fusionsprotein: extrazellulärer TNFR2 + Fc-Teil von IgG1	Pfizer, New York, USA	IgG1/human	10 μ g/ml
Anti IL 6 Rezeptor Antikörper (Tocilizumab)	Roche, Basel, CH	IgG1/humanisiert	10 μ g/ml
Anti CD20 Antikörper (Rituximab)	Roche, Basel, CH	IgG1/ chimär (Maus/ v.a. aber human)	10 μ g/ml

2.7 Kits

Kit	Firma
Bio-Plex®	Bio-Rad Laboratories, München, D
CD4+ T Cell Isolation Kit II	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Auburn, CA, USA
peqGOLD Total RNA Kit	PeqLab, Erlangen, D
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (MA), USA
T Cell Activation/ Expansion Kit, human (Aktivierungsbeads)	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

2.8 Primer

Alle Primer wurden synthetisiert und bezogen von der Firma RealTimePrimers über Biomol, Hamburg, D

E-Cadherin: *forward primer* (FW): 5'-TCTTCCCC-GCCCTGCCAATC-3',
reverse primer (RV): 5'-GCCTCTCTCGAGTCCCCTAG-3';

L1CAM: FW: 5'-TCACGGGCAACAACAGCAACT-3',
RV: 5'-CGGCTTCCTGTCAATCATGCT-3';

Slug: FW: 5'-ATATTCGGACCCACACATTACCT-3',
RV: 5'-GCAAATGCTCTGTT-GCAGTGA-3';

Snail: FW: 5'-CTGCTCCACAAGCACCAAGAGTC-3',
RV: 5'-CCAGC-TGCCCTCCCTCCAC-3';

TATA-Box binding-protein (TBP): FW: 5'-GCTG-GCCCATAGTGATCTTT-3',
RV: 5'-CTTCACACGCCAAGAAACAG-3';

Vimentin: FW: 5'-TGGCACGTCTTGACCTTGAA-3',
RV: 5'-GGTCATCGTG-ATGCTGAGAA-3';

ZEB-1: FW: 5'- TCCATGCTTAAGAGCGCTAGCT-3',
RV: 5'- ACCGTAGTTGAG-TAGGTGTATGCCA-3'.

2.9 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
HPDE6c7	Humanes Pankreas-gangepithel	M.S. Tsao, Ontario Cancer Center, Toronto, Kanada

3. Methoden

3.1 Immunhistochemische Anfärbung von PDAC und CP Paraffinschnitten mit nachfolgender mikroskopischer Beurteilung und Scoring

In 15 Paraffin eingebetteten, humanen CP Geweben wurden vornehmlich PanINs und duktale Gangepithelien auf die mesenchymalen Marker Vimentin und L1CAM und den epithelialen Marker E-Cadherin sowie das umliegende Stromagewebe auf die Anwesenheit von CD4+ T-Zellen untersucht. Für die Untersuchung der CD4+ T-Zellen wurden neben CD4 auch FoxP3 angefärbt, um Tregs zu diskriminieren. Die Beurteilung der T-Zell-Präsenz wurde auf 42 in Paraffin eingebettete humane PDAC Gewebe erweitert. Die Auswertungen der E-Cadherin, L1CAM, FoxP3 und CD4 Färbungen wurden bereits im Rahmen anderer Doktorarbeiten von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Inflammatorische Karzinogenese durchgeführt. Die PDAC Gewebe wurden vom Institut für Pathologie, UKSH Campus Kiel in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Röcken geschnitten und zur Verfügung gestellt. Sie waren histopathologisch alle dem gleichen *staging* angehörig (T3N0M1). Eine derartige Einteilung gibt es für die CP nicht. Daher dienten diagnostische Kriterien wie der Fibrosegrad, die Ausbildungen von PanINs, die Anwesenheit chronischer Entzündungszellen sowie die Einbettung der Drüsengänge in ein bindegewebiges desmoplastisches Gewebe der Beurteilung der 15 CP Gewebeschnitte, die alle diese Kriterien erfüllten. Die CP Gewebe wurden zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Bence Sipos vom Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen. Die Untersuchungen der Gewebe sowie die Verwendung klinischer Daten wurden von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein und des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt (Ethikvotumnummer D430/09 und 470/210BO1). Alle Gewebeschnitte wurden am Institut für Pathologie UKSH Campus Kiel maschinell auf die Marker Vimentin, Zytokeratin und CD4 gefärbt. Die Färbungen für FoxP3, E-Cadherin und L1CAM erfolgten manuell in der Arbeitsgruppe Inflammatorische Karzinogenese am Institut für Experimentelle Tumorforschung, UKSH Campus Kiel.

Um die Schnitte untereinander hinsichtlich ihrer Positivität für die oben genannten Marker vergleichen und sie miteinander in Beziehung bringen zu können, wurde ein semiquantitatives Scoring in 2 Gruppen entwickelt. Dabei wurden die Gewebeschnitte unter dem Mikroskop in 400-facher Vergrößerung durchgesehen, die Ergebnisse der einzelnen Blickfelder zusammengetragen und auf das ganze Präparat übertragen.

Zunächst wurde für die CD4+ T-Zellen ein Score erstellt, der die T-Zell-Präsenz mittels Anfärben von CD4 in 2 Kategorien einteilte. Dafür wurden all diejenigen Schnitte, bei denen CD4+ T-Zellen unter 10 % des gesamten Stromagewebes ausmachten, dem Score 1 zugeteilt und all diejenigen Gewebeschnitte, die einen über 10 %igen CD4+ T-Zellanteil am Stroma aufzeigten, zu Score 2 zugeordnet. Nach demselben Prinzip wurde mit FoxP3+ T-Zellen verfahren, deren % Anteil jedoch auf die CD4+ T-Zellen bezogen wurde. Die L1CAM Expression wurde in pankreatischen Gangepithelien und PanINs ausgewertet und die Scoreeinteilung in 2 Gruppen mit dem Cutoff bei 10 % jeweils in Bezug auf die gesamten Gangepithelien eines Gewebeschnittes bezogen. Azinuszellen wurden hierbei nicht berücksichtigt. Die Anfärbarkeit von neuronalen Strukturen wurde als interne Positivkontrolle mit dem Score 3 versehen. Die Scoreverteilung der E-Cadherin Expression orientierte sich hingegen an einer 90 % Grenze, die darüber entschied, ob ein Schnitt mit einer epithelial-duktalem E-Cadherin Expression von unter 90 % dem Score 1 oder über 90 % dem Score 2 zugeordnet wurde. Um epitheliale Bereiche eindeutig zu identifizieren, wurde sich innerhalb der Schnitte an pan-Zytokeratin gefärbten Strukturen orientiert. Während die Auswertungen der E-Cadherin, L1CAM, CD4 und FoxP3 Färbungen bereits erfolgt waren, erfolgte die Auswertung der Vimentin Färbung für diese Doktorarbeit am Mikroskop Axioskop 40. Da Vimentin in hohem Maße auch im desmoplastischen Gewebe (z.B. in PSC und Myofibroblasten) vorkommt, dienten der Unterscheidung zwischen pankreatischen Gangepithelzellen und Stromazellen weitere Färbungen auf Zytokeratin als Marker für pankreatische Gangepithelien und α -SMA als Marker für PSC und Myofibroblasten. Des Weiteren halfen histo- und zytologische Charakteristika der epithelialen und mesenchymalen Zellen bei der Unterscheidung. Bei dieser Färbung wurde die Vimentin Expression ausschließlich innerhalb der Gangepithelien und PanINs beurteilt und die Grenze von 10 % zur Unterscheidung in Score 1 oder 2 festgelegt. Die Präparate wurden zwei Mal durchgesehen und anschließend von einem zweiten Beobachter stichprobenartig geprüft. Die Ergebnisse der Vimentin Färbung wurden dann mit den Befunden der bereits erfolgten Färbungen auf E-Cadherin, L1CAM, CD4, FoxP3 verglichen, um einen umfassenden Eindruck erhalten zu können, ob die Präsenz von verschiedenen CD4+ T-Zellpopulationen mit dem Auftreten von EMT im pankreatischen Gangepithel korreliert. Die Daten zu L1CAM, CD4 und FoxP3 stammen von Herrn Ruben Mennrich und wurden im Rahmen seiner Doktorarbeit erhoben. Die Daten zu E-Cadherin stammen von Frau Geeske Genrich und wurden im Rahmen ihrer Doktorarbeit erhoben.

3.2 Aussaat und Passagierung der humanen Pankreasgangepithelzelllinie HPDE6c7

Die HPDE6c7 Zelllinie diente in den *in vitro* durchgeführten Versuchen als Modell eines nicht malignen Pankreasgangepithels. Diese HPDE-Zellen wurden mit verschiedenen CD4+ T-Zellpopulationen kokultiviert, um die Zell-Interaktion in der CP zu simulieren und somit einen möglichen Beitrag von CD4+ T-Zellen bei der Induktion einer EMT in HPDE-Zellen zu untersuchen. Dafür mussten die HPDE-Zellen kultiviert, passagiert und in Wells ausgesät werden.

Für die Kultivierung wurden die HPDE-Zellen in einer sterilen Kulturflasche in ihrem Kulturmedium (**Tabelle 1**) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Feuchte (rF) kultiviert.

Tabelle 1: Kulturmedium für HPDE-Zellen

Kulturmedium (Passagierung):
<ul style="list-style-type: none"> • 50:50 RPMI-Medium und Keratinozytenfreies Medium (KSFM) <li style="padding-left: 20px;">+ 0,5 % (v/v) L-Glutamin <li style="padding-left: 20px;">+ 5 % (v/v) FCS <li style="padding-left: 20px;">+ 5 ng/ml EGF <li style="padding-left: 20px;">+ 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt

Sobald 80 % des Flaschenbodens mit den Zellen übersät war, konnte die erneute Passagierung auf zwei Kulturflaschen erfolgen. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt, bevor durch eine Inkubation mit 5 ml Trypsin für 10 Minuten im Brutschrank die Ablösung der Zellen möglich war. Nach anschließender Zugabe von 5 ml RPMI-Medium zur Abstopfung der Trypsin Reaktion wurde der Flascheninhalt gründlich aufgespült, um die verbliebenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Vor der Zellzählung für die Aussaat wurde die Zellsuspension zunächst bei 1200 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und das Pellet mit 10 ml RPMI-Medium aufgespült. In der Regel befanden sich in einer Flasche 50-60 x 10⁵ Zellen. Für die Kokultur mit den CD4+ T-Zellen wurden die HPDE-Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät, wofür pro Well 5 x 10³ HPDE-Zellen in 100 µl Kulturmedium erforderlich waren. Je nach Kokulturversuch bzw. anschließender Expressions- oder Funktionsanalyse der HPDE-Zellen unterschied sich die benötigte Well- und demnach Zellzahl. Der Rest der Zellsuspension wurde auf 20 ml mit RPMI-Medium aufgefüllt, auf zwei neue Kulturflaschen mit je 10 ml verteilt und im Brutschrank kultiviert. Die bestückte

96-Well-Platte wurde für 24 Stunden in den Brutschrank gelegt, damit die HPDE-Zellen für die folgende Kokultur mit den CD4⁺ T-Zellen am Wellboden adhären konnten.

3.3 Isolierung der Teffs und Tregs aus Blut gesunder Spender

Für die Isolierung der T-Zellen wurden zunächst MNZ mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Blut gesunder Spender isoliert. Aus den MNZ lassen sich CD4⁺ T-Zellen über die Methode der negativen magnetischen Separation gewinnen, aus denen sich wiederum CD4⁺CD25⁻ Teffs und CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻ Tregs isolieren lassen. Das Prinzip der negativen Antikörpermagnet-Separation beruht auf der Markierung aller für die weiteren Versuche irrelevanten Zellen einer Zellsuspension mit zellspezifischen Oberflächenantikörpern, die mit magnetischen Partikeln (sogenannten MicroBeads) gekoppelt werden. Die anschließende Separierung der mit den magnetischen Antikörpern gekoppelten Zellen von der Zielzellpopulation erfolgt durch das *magnetic activated cell sorting* (MACS)-System (Quadro MACS Separator, Miltenyi Biotec). Dieses System inkludiert einen starken Magneten, in denen Säulen eingelegt werden können, durch welche die Zellsuspensionen durchlaufen. Dabei werden die mit magnetischen Antikörpern gekoppelten Zellen in einem magnetischen Feld zurückgehalten, während die unmarkierte Zielzellpopulation die Säule ungehindert passieren kann und aufgefangen wird.

3.3.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Blut gesunder Spender

Das Blut für die Isolierung der CD4⁺ T-Zellsubgruppen für die Kokultur mit den HPDE-Zellen wurde von der Blutspendebank im CITTI-Park Kiel zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um ein Leukozyten- und Erythrozyten-Konzentrat. Das Vollblut wurde zuvor in einer Leukozytenreduktionskammer durch Durchlaufen eines kegelförmigen Behälters mit stufenweisem Aufbau von Blutplasma und Thrombozyten getrennt. 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. **Abbildung 3** veranschaulicht die Schritte der Isolierung der MNZ.

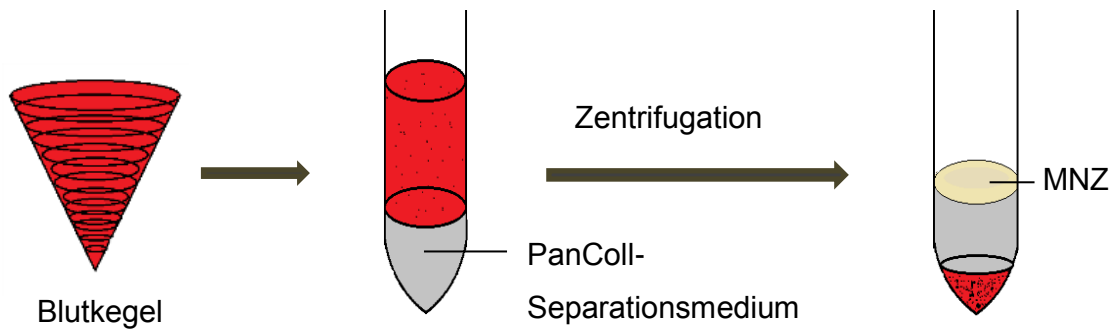


Abbildung 3: Schematische Darstellung der MNZ Separation

Das zuvor mit PBS verdünnte Leukozyten-Erythrozyten Konzentrat, das in einem Blutkegel von der Blutspendebank zur Verfügung gestellt wurde, wurde in ein Rörchen mit PanColl-Separationsmedium überführt und über einen Druckgradienten während der Zentrifugation ohne Bremsfunktion von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Die MNZ setzten sich in Form eines Ringes an der Oberfläche ab und konnten als Überstände abgenommen und in einem neuen Rörchen gesammelt werden.

Für die Isolierung der MNZ wurde das Leukozyten- und Erythrozyten-Konzentrat gesunder Spender durch ein Separationsmedium von den roten Blutkörperchen getrennt. Hierfür wurde das etwa 5 ml fassende konzentrierte Blut mit PBS auf 140 ml aufgefüllt und je 35 ml in vier 50 ml Rörchen, die bereits mit je 15 ml PanColl-Separationsmedium gefüllt worden waren, pipettiert und bei Raumtemperatur (RT) und 1500 UpM ohne Bremsfunktion über einen Zeitraum von 25 Minuten zentrifugiert. Ein Dichtegradient führt somit zur Separation der MNZ von den restlichen Blutbestandteilen. Die MNZ wurden als Überstände in Form eines weißen Ringes in zwei neue 50 ml Rörchen überführt. Nach 2-fachem Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 4°C und 1500 UpM für 10 Minuten mit abschließender Absaugung der Überstände wurden die isolierten MNZ in 30 ml X-VIVO zusammengelegt und über Nacht bei 4 °C gelagert, um am Folgetag CD4+ T-Zellen zu isolieren.

3.3.2 Negative Selektion CD4+ T-Zellen aus MNZ

Die magnetische Negativselektion CD4+ T-Zellen aus MNZ wurde mittels des *CD4+ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Hierbei dient ein Cocktail aus Biotin-konjugierter monoklonaler Antikörper gegen CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und CD235a (GlykophorinA), der alle Zellen der MNZ Suspension, die nicht CD4 exprimieren, wie CD8+ T-Zellen, Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten, B-Zellen und NK-Zellen erfasst und markiert. Anschließend werden die Zellen mit dem CD4+ T-Zell MicroBead Cocktail inkubiert und somit die Antikörper magnetisch gekoppelt. (siehe **Abbildung 4**).

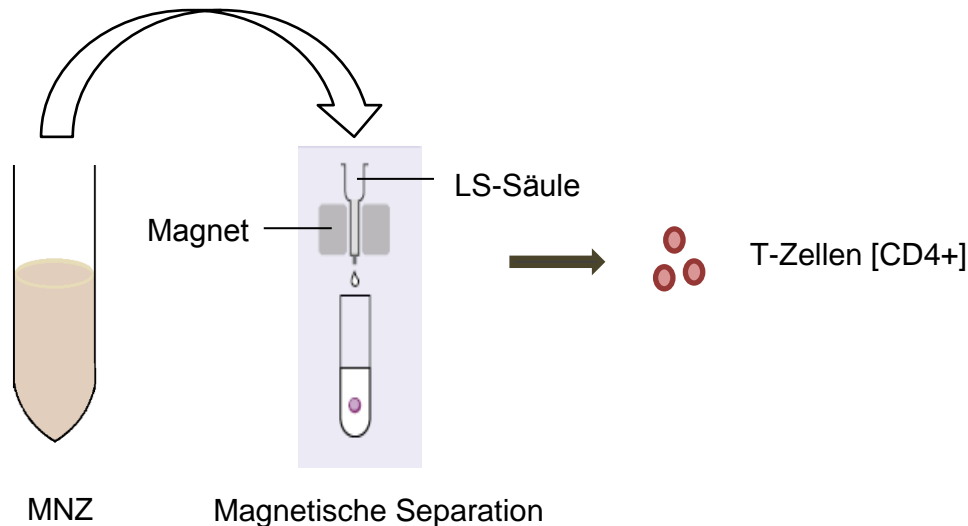


Abbildung 4: Schematische Darstellung der CD4+ T-Zell-Isolierung

Aus zuvor gewonnenen MNZ wurde mittels negativer magnetischer Separation CD4+ T-Zellen isoliert. Das Prinzip beruht auf der Markierung aller MNZ, die kein CD4 exprimieren, mit an magnetischen Teilchen gekoppelten Antikörpern. Die unerwünschten Zellen werden dadurch in einem magnetischen Feld beim Durchlauf einer LS-Säule zurückhalten. Somit durchläuft nur die gewünschte Zellpopulation (hier: CD4+ T-Zellen) das magnetische Feld und kann aufgefangen werden.

Die am Vortag isolierten MNZ (siehe **Kapitel 3.3.1**) wurden zunächst mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt, indem durch Multiplizieren der Zellzahl mit dem Kammerfaktor 10^4 und der MACS-Puffer Verdünnung 10^2 die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension errechnet wurde. Mit einer Zellzahl von 50×10^7 Zellen wurde die Aufreinigung in CD4+ T-Zellen durchgeführt. Alle folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank ausgeführt. **Tabelle 2** gibt das Vorgehen zur Berechnung der Antikörperkonzentrationen für die CD4+ T-Zell-Isolierung wieder.

Tabelle 2: Protokoll der Antikörperkonzentrationen für die CD4+ T-Zell-Isolierung

Isolierung von CD4+ T-Zellen (Mengenangabe für 50×10^7 Zellen)
2000 µl MACS-Puffer
250 µl biotinylierter Antikörper Cocktail
1500 µl MACS-Puffer
500 µl CD4+ T-Zell MicroBead Cocktail

Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 1200 UpM für 7 Minuten und anschließendem Absaugen der Überstände wurde das Pellet der MNZ zunächst in 2000 µl MACS-Puffer aufgespült und in 250 µl des biotinylierten Antikörper Cocktails bei 4 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach erneuter Aufspülung mit 1500 µl MACS-Puffer inkubierte die Zellsuspension mit 500 µl des MicroBead Cocktails bei 4 °C für weitere 15 Minuten. Nach erneuter Waschung mit MACS-Puffer, Zentrifugation bei 4 °C und 1200 UpM für 7

Minuten, Absaugen der Überstände und Aufnahme des Pellets in 2500 µl MACS-Puffer erfolgte die negative magnetische Separation über LS-Säulen mit dem Quadro MACS Separator. Dafür wurden 2 LS-Säulen mit 2 ml MACS-Puffer vorgespült und die in 2,5 ml MACS-Puffer resuspendierten Zellen in 500 µl Schritten auf die Säulen verteilt. Anschließend wurden die übrigen Zellen nochmals mit 2 x 1 ml MACS-Puffer pro Säule aufgespült und die Säulen mit 2 x 1 ml MACS-Puffer nachgespült. Vor jeder neuen Zugabe musste darauf geachtet werden, dass die Säulen nicht mehr tropften, erst dann durfte erneut pipettiert werden. Die aufgefangenen Zellen wurden zusammen in ein 50 ml Röhrchen überführt und waren somit bereit für die nachfolgende Separation.

3.3.3 Negative Selektion regulatorischer T-Zellen und T-Effektorzellen aus CD4+ T-Zellen

Im nächsten Schritt wurden aus den separierten CD4+ T-Zellen die Subgruppen CD4+CD25- Teffs und CD4+CD25+CD127-CD49d- Tregs durch erneute magnetische Negativselektion isoliert (siehe **Abbildung 5**).

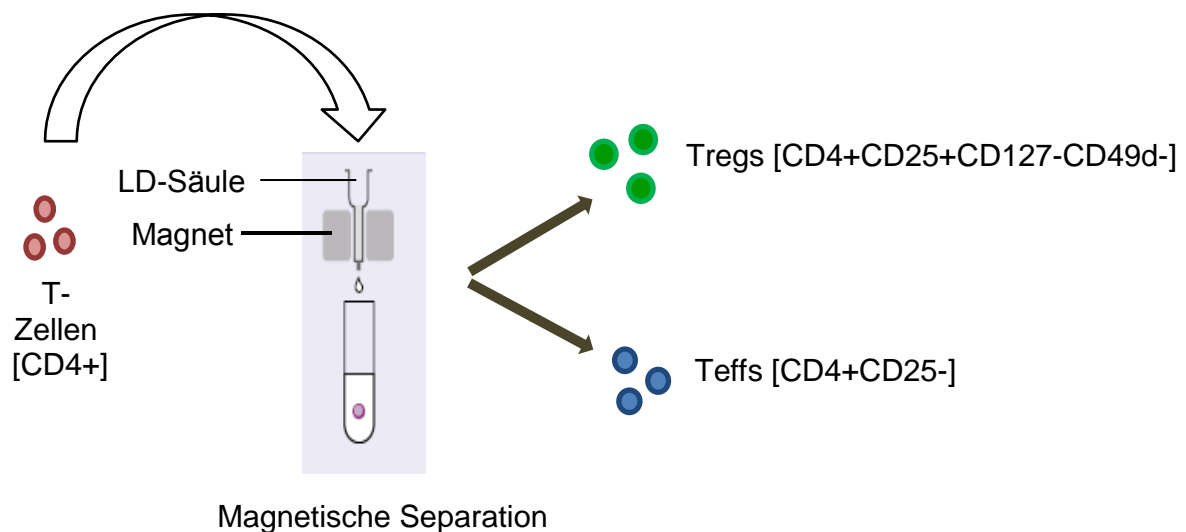


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Teffs- und Tregs-Isolierung

Aus zuvor gewonnenen CD4+ T-Zellen (rote Punkte) wurden mittels negativer magnetischer Separation Tregs (grüne Punkte) und Teffs (blaue Punkte) isoliert. Das Prinzip beruht auf der Markierung für den Versuchsablauf irrelevanter Zellpopulationen mit an magnetischen Teilchen gekoppelten Antikörpern, wodurch diese Zellen in einem magnetischen Feld beim Durchlauf einer LD-Säule zurückgehalten werden. Somit durchläuft nur die gewünschte Zellpopulation (hier: Teffs und Tregs) das magnetische Feld und kann aufgefangen werden.

Dafür wurden die CD4+ T-Zellen in der Verdünnung von 1:10 gezählt und 1×10^7 Zellen für die Isolierung der Teffs verwendet, während der Rest für die wesentlich geringer konzentrierten Tregs benutzt wurde. Nachdem die auf zwei Röhrchen aufgeteilten

Zellsuspensionen gewaschen, bei 4 °C und 1200 UpM für 7 Minuten zentrifugiert und schließlich die Überstände abgesaugt worden waren, wurden die Pellets mit MACS-Puffer aufgespült und die entsprechenden Antikörpercocktails hinzugegeben. **Tabelle 3** gibt das Vorgehen zur Berechnung der Antikörperkonzentrationen für die Tregs- und Teffs-Isolierung wieder.

Tabelle 3: Protokoll der Antikörperkonzentrationen für die Teffs- und Tregs-Isolierung

Isolierung von Teffs (Mengenangabe pro 1×10^7 Zellen)	Isolierung von Tregs (Mengenangabe pro 1×10^7 Zellen)
+ 90 µl MACS-Puffer + 10 µl anti-CD25-Beads	+ 20 µl MACS-Puffer + 15 µl biotinylierte anti-CD49d + 15 µl biotinylierte anti-CD127
	+240 µl MACS-Puffer + 60 µl Anti-Biotin Beads

Für die Teffs wurden die in 90 µl MACS-Puffer resuspendierten 1×10^7 CD4+ T-Zellen mit 10 µl anti-CD25-Beads (Miltenyi Biotec) behandelt und bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert. Bei den anti-CD25-Beads handelt es sich bereits um mit Microbeads magnetisch gekoppelte Antikörper. Nach anschließender Waschung mit 1 ml MACS-Puffer, Zentrifugation bei 4 °C und 1200 UpM für 7 Minuten, anschließendem Absaugen der Überstände und Aufspülung des Pellets in 500 µl MACS-Puffer war die Zellsuspension für die magnetische Separation über das MACS-System mit LD-Säulen bereit.

Während die Antikörper für die Isolierung der Teffs bereits magnetisch gekoppelt waren, mussten die CD4+ T-Zellen, aus denen Tregs isoliert werden sollten, zunächst mit Antikörpern inkubiert werden, die im Anschluss noch mit Microbeads magnetisch gekoppelt werden mussten. Dies erfolgte in zwei separaten, aufeinanderfolgenden Schritten. Da sich die Zellzahl der CD4+ T-Zellen, die zur Aufreinigung der Tregs dienten, bei jeder Isolierung unterschied, sind die folgenden Mengenangaben für Antikörper und MACS-Puffer für je 1×10^7 CD4+ T-Zellen angegeben (siehe **Tabelle 3**). In der Regel handelte es sich für die Aufreinigung der Tregs um eine Zellzahl von ca. 12×10^7 CD4+ T-Zellen. Für die Inkubation der Antikörper wurden für je 1×10^7 CD4+ T-Zellen, resuspendiert in 20 µl MACS Puffer, 15 µl des biotinylierten CD49d Antikörper (Miltenyi Biotec) und 15 µl des biotinylierten CD127 Antikörper (Miltenyi Biotec) eingesetzt. Zur Inkubation wurden die Zellen bei 4 °C für 10 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen noch mit 60 µl anti-Biotin-Beads (Miltenyi Biotec) und 240 µl MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen bei 4°C für 15 Minuten

inkubiert. Nach anschließender Waschung mit MACS-Puffer, Zentrifugation bei 4 °C und 1200 UpM für 7 Minuten, Absaugen der Überstände und Aufspülung in 500 µl MACS-Puffer pro 10×10^7 Zellen war die Zellsuspension bereit für die magnetische Separation über das MACS-System mit LD-Säulen.

Es wurden zwei LD-Säulen für die zwei Zellsuspensionen separat angelegt. Die LD-Säulen wurden zunächst mit 2 ml MACS-Puffer in 1 ml Schritten vorgespült, bevor je 500 µl der Zellsuspensionen auf die zugehörige LD-Säule pipettiert werden konnten. Aufgespült wurde der verbliebene Rest der Zellsuspension nochmals mit 2 x 500 µl MACS-Puffer pro Säule und Zellsuspension. Die Zellsuspensionen wurden dann auf die Säulen verteilt und diese abschließend nochmals mit 2 x 500 µl MACS-Puffer nachgespült. Die durchgelaufenen Zellen wurden bei 4 °C und 1200 UpM für 7 Minuten zentrifugiert, die Überstände abgesaugt, mit je 1 ml X-VIVO aufgespült und anschließend gezählt, um sie in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen in 100 µl X-VIVO pro Well für die Kokultur vorzubereiten.

3.4 Kokultur von frisch isolierten Teffs und Tregs mit HPDE-Zellen

Um den Einfluss der beiden unterschiedlichen CD4⁺ T-Zellpopulationen auf Pankreasgangepithelzellen zu untersuchen, wurden HPDE-Zellen mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte in 100 µl X-VIVO ausgesät (siehe **Kapitel 3.2**). Dies erfolgte am selben Tag der MNZ-Isolierung (siehe **Kapitel 3.3.1**), sodass die HPDE-Zellen 24 Stunden Zeit für das Anwachsen in dem Well hatten. Nach Isolierung der Tregs und Teffs (siehe **Kapitel 3.3.2 - 3.3.3**) wurden folgende Kulturbedingungen angelegt (**Abbildung 6**):

- | | | |
|----|---------------|---------------------|
| 1. | HPDE Mono | - Aktivierungsbeads |
| 2. | HPDE Mono | + Aktivierungsbeads |
| 3. | HPDE Ko-Teffs | - Aktivierungsbeads |
| 4. | HPDE Ko-Teffs | + Aktivierungsbeads |
| 5. | HPDE Ko-Tregs | - Aktivierungsbeads |
| 6. | HPDE Ko-Tregs | + Aktivierungsbeads |

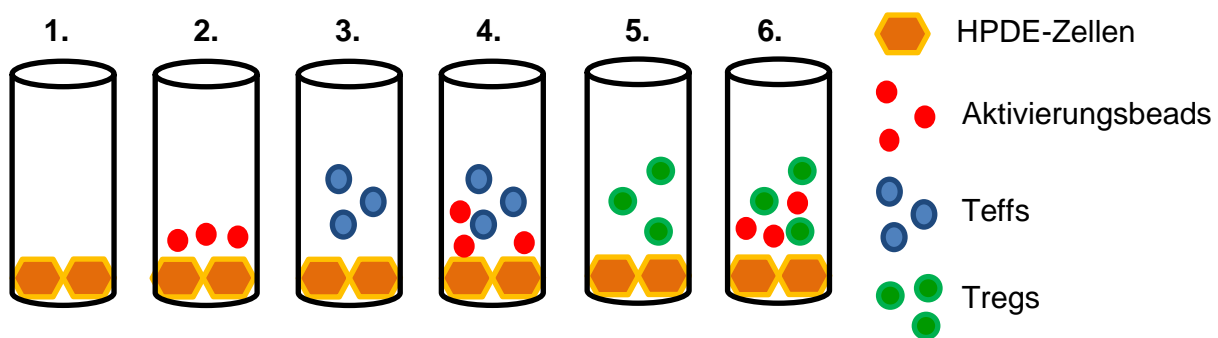


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kulturbedingungen der HPDE Zellen

HPDE-Zellen (gelbe Raute) wurden für 72 Stunden entweder alleine oder zusammen mit Teffs (blaue Punkte) bzw. Tregs (grüne Punkte) in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads (rote Punkte) kultiviert.

Für das Anlegen der Mono- bzw. Kokultur wurde zunächst das Medium aus den Wells der HPDE-Zellen abgesaugt und anschließend die CD4⁺ T-Zellpopulationen, jeweils 1×10^4 Zellen pro Well in 100 μ l X-VIVO resuspendiert, hinzu pipettiert bzw. für die Monokulturen 100 μ l reines X-VIVO hinzu pipettiert. Zusätzlich wurde jede zweite der späteren sechs Bedingungen mit Aktivierungsbeads versehen.

Zur Herstellung der Aktivierungsbeads wurde nach Herstellerangaben des *T cell activation/ expansion kit* (Miltenyi Biotec) verfahren. Das Kit besteht aus Anti-Biotin MACSiBeadTM Partikel und biotinylierten Antikörpern gegen CD2, CD3 und CD28, die kombiniert Antigen präsentierende Zellen simulieren und zur Aktivierung von T-Zellen führen. Die Aktivierungsbeads wurden vor dem Einsetzen 1:200 mit X-VIVO auf ein Volumen von 25 μ l verdünnt. In diejenigen Wells mit Zellen, die ohne Aktivierungsbeads verbleiben sollten, wurden 25 μ l reines X-VIVO zugegeben. Die HPDE-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden entweder alleine (Monokultur) oder in Kokultur mit den Teffs oder Tregs in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads im Brutschrank kultiviert.

Nach den 72 Stunden und Ablösung der T-Zellen konnten die HPDE-Zellen in Folgeversuchen hinsichtlich EMT Merkmalen und Zellinvasion charakterisiert werden. Zunächst wurde aber die Morphologie der CD4+ T-Zellen und HPDE-Zellen unter dem Mikroskop beurteilt und dokumentiert sowie 100 µl der Überstände aus jedem Well mit einer Mehrkanalpipette für die spätere Bio-Plex Analyse abgenommen. Die Überstände wurden bis zur Bio-Plex Analyse bei -20°C gelagert.

Für die Ablösung der T-Zellen wurden alle Wells mit einem sterilen 100 µl Ritip mit kaltem PBS aufgefüllt und auf Eis im Kühlschrank für 15 Minuten belassen, damit sich die T-Zellen von den HPDE-Zellen leichter lösen ließen. Durch die sorgfältige Resuspension in PBS und anschließender Abnahme der in PBS gelösten T-Zellsuspensionen aus den Wells, verblieben die HPDE-Zellen in den Wells zurück. Die noch adhärennten HPDE-Zellen wurden dann durch eine 30 minütige Inkubation mit je 100 µl Accutase pro Well abgelöst und in sechs 15 ml Röhren gemäß ihrer Kulturbedingungen überführt, die zuvor mit entsprechendem 1:1 X-VIVO-Volumen befüllt worden waren. Im Anschluss folgte die Zellzählung der sechs unterschiedlich mono- und kokultivierten HPDE-Zellen in der Neubauer-Zählkammer. Nach einer Waschung mit PBS konnten die HPDE-Zellen für weitere Expressions- sowie Funktionsanalysen eingesetzt werden.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Unterscheidung und phänotypischen Charakterisierung von Zellen in Zellsuspensionen über Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an Oberflächenantigene. Mittels Streulicht- bzw. Fluoreszenzeigenschaften können über Zellgröße und Granularität bzw. über Emissionsunterschiede des Laserstrahls durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper die Zellen charakterisiert und quantifiziert werden.

3.5.1 Reinheitsfärbung der isolierten Teffs und Tregs

Die durchflusszytometrische FACS-Färbung (*fluorescence activated cell sorting*) wurde u.a. eingesetzt zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Teffs und Tregs nach magnetischer Separation (**Kapitel 3.3.2 - 3.3.3**). Dafür kamen Färbecocktails zum Einsatz, die sich aus mehreren Antikörpern zusammensetzen und entsprechend **Tabelle**

4 in MACS-Puffer verdünnt worden waren (für genaue Angaben der Antikörper siehe **Kapitel 2.4**).

Tabelle 4: Antikörperlösungen für die durchflusszytometrische Analyse der Reinheit der T-Zellpopulationen

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

Es wurden jeweils mindestens 2×10^3 Zellen der CD4+ T-Zellen, Teffs und Tregs in 3 FACS-Röhrchen pro Zellpopulation pipettiert und auf 200 µl mit unsterilem MACS-Puffer aufgefüllt, bei RT und 1200 UpM für 7 Minuten zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Mit 10 µl des jeweiligen Färbecocktails wurden die Pellets unter Lichtentzug aufgespült und bei 4 °C für 15 Minuten inkubiert. Abschließend wurde nochmals mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen, bei RT und 1200 UpM für 7 Minuten zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und schließlich die Zellen mit 50 µl 1 %igen Formalin fixiert. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch über den FACScalibur™ Durchflusszytometer (Beckton Dickinson) und der FACScalibur Software. Die Zellsuspensionen wurden nur für die Kokulturen verwendet, wenn mindestens eine 70 %ige Reinheit der Tregs und mindestens eine 90 %ige Reinheit der Teffs bestanden.

3.5.2 Detektion von EMT Markern mittels durchflusszytometrischer Analyse

Um die Expression der EMT Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin in mono- und kokultivierten HPDE-Zellen auf Proteinebene mittels durchflusszytometrischer FACS-Färbung zu erfassen, wurden die HPDE-Zellen der sechs Kulturbedingungen zunächst wie in **Kapitel 3.2 - 3.4** beschrieben behandelt, um dann mit Antikörpern gegen E-Cadherin, L1CAM und Vimentin sowie deren Isotypkontrollen inkubiert zu werden. Die Detektion von E-Cadherin und L1CAM erfolgte auf der Zelloberfläche, während für die Anfärbung von Vimentin, welches sich im Zytoplasma befindet, eine intrazelluläre Färbung erforderlich war. Pro Antikörperansatz wurden jeweils 1×10^4 der sechs

unterschiedlich mono- und kokultivierten HPDE-Zellbedingungen in 25 µl MACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Konzentrationen der Antikörper sind der **Tabelle 5** zu entnehmen.

Tabelle 5: Antikörperkonzentrationen für die durchflusszytometrische Färbung

Primär-antikörper	Eingesetzte Konzentration [µg/ml]	Sekundär-antikörper	Eingesetzte Konzentration [µg/ml]	Sekundär-reagenz	Eingesetzte Konzentration [µg/ml]
E-Cadherin-Alexa647	0,125				
IgG1-Alexa647	0,125				
L1CAM	1	<i>rabbit-anti-mouse</i> Biotin	2,75	Streptavidin PerCP/Cy5.5	2
IgG1	1	<i>rabbit-anti-mouse</i> Biotin	2,75	Streptavidin PerCP/Cy5.5	2
Vimentin-Alexa488	1				
IgG1-Alexa488	1				

Für die E-Cadherin Färbung erfolgte die Inkubation der spezifischen und Kontroll-Antikörper bei 4°C für 15 Minuten und die anschließende Waschung wurde mit 200 µl MACS-Puffer vorgenommen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 1200 UpM für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend die Überstände abgenommen. Fixiert wurden die Zellen mit 50 µl 1 %igen Formaldehyd in MACS-Puffer.

Für die L1CAM Färbung erfolgte die Inkubation der Primärantikörper mit anschließender Waschung wie bei der E-Cadherin Färbung. Der Sekundärantikörper (*rabbit-anti-mouse* Biotin) wurde nach Zentrifugation und Abnehmen der Überstände auf die Pellets gegeben und bei 4°C für 15 Minuten mit den Zellen inkubiert und diese anschließend mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Zentrifugation und Abnehmen der Überstände erfolgte wie in den vorherigen Schritten beschrieben. Im dritten Schritt wurde mit Streptavidin PerCP/Cy5.5 wie im Schritt zuvor inkubiert, die Zellen abschließend gewaschen und wie oben angegeben fixiert.

Für die intrazelluläre Vimentin Färbung wurden die Zellen zunächst bei RT für 10 Minuten mit einer Fix/Perm-Lösung (eBioscience) permeabilisiert, dann bei RT weitere 10 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert, mit 200 µl Pemeabilisierungspuffer im Anschluss gewaschen und anschließend wie beschrieben fixiert. Die Messung erfolgte mit einem FACScalibur™ Durchflusszytometer (Beckton Dickinson) mit Argonlaser und die Auswertung erfolgte mit der Software WinMDI 2.8 (*Freeware*).

3.6 Immunzytochemische Färbung zur Detektion von EMT Markern in HPDE-Zellen

Um die Expression von E-Cadherin, L1CAM und Vimentin in mono- und kokultivierten HPDE-Zellen beurteilen zu können, ohne diese vorher proteolytisch aus den Wells abzulösen, wurde die Expression der drei EMT Marker auf Proteinebene nicht nur mittels durchflusszytometrischer FACS-Färbung, sondern auch über eine IZC-Färbung der HPDE-Zellen direkt in der 96-Well-Platte überprüft. Dafür wurden zunächst die Mono- und Kokulturen der HPDE-Zellen wie in **Kapitel 3.2 - 3.4** beschrieben vorbereitet, wobei die HPDE-Zellen nach Ablösen der T-Zellen, wie in **Kapitel 3.4** beschrieben, im Well belassen wurden. Das Medium wurde nach Ablösung der T-Zellen abgesaugt und die HPDE-Zellen in den Wells mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 100 µl einer 4,5 %igen Paraformaldehydlösung bei RT für 15 Minuten inkubiert, welches anschließend wieder abgesaugt wurde. Die Zellen wurden dann mit 100 µl PBS dreimal für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl einer eiskalten Lösung aus Methanol und Wasserstoffperoxid in einem Verhältnis 1:100 bei -20°C für 10 Minuten zur Blockierung der endogenen Peroxidase versetzt und danach dreimal mit PBS gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubierten die Zellen für 60 Minuten in 100 µl einer 4 %igen BSA-PBS-Lösung, bevor die Lösung wieder abgesaugt wurde. Die Wells, die später auf Vimentin gefärbt wurden, enthielten zusätzlich in dieser Lösung 0,3 %iges Triton X100, um die Zellen zu permeabilisieren und somit für die Antikörper zugänglich zu machen. Die Primärantikörper wurden in der Zwischenzeit mit 1 %igen BSA/PBS, wie in **Tabelle 6** dargestellt, vorverdünnt und nach Beendigung des vorherigen Schrittes mit je 50 µl pro Well auf die Zellen verteilt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tabelle 6: Verdünnungsschema der Erstantikörper für die immunzytochemische Färbung

Antigen/ Klon	Verdünnungslösung	Verdünnung
E-Cadherin (32A8)	BSA (1 %)	1:100
L1CAM (14.10)	BSA (1 %)	1:100
Vimentin (V9)	BSA (1 %) + Triton X100 (0,3 %)	1:50

Am Folgetag wurden die Primärantikörperlösungen abgesaugt und die Zellen dreimal mit 100 µl PBS, je nach intra- oder extrazellulärer Färbung mit oder ohne 0,3 %iges Triton X100 gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet, der als Brücke zwischen Primärantikörper und einem Enzym-Konjugat

fungierte. Eine Anti-Biotin-Antikörper Suspension wurde 1:200 in 1 %igen BSA/PBS +/- Triton X100 verdünnt und davon je 50 µl den Zellen bei RT für 30 Minuten zugegeben. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 50 µl einer 1:500 Verdünnung des Peroxidase-konjugiertem Streptavidins in PBS +/- 0,3 %igen Triton X100 für 30 Minuten inkubieren gelassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde durch Hinzugeben eines Tropfens des Dako AEC-Substrates die Enzymreaktion gestartet, die sich im Verlauf von 3-5 Minuten unter dem Mikroskop verfolgen ließ. Abschließend wurde mit 100 µl PBS dreimal gewaschen und mit Mayers Hämalaun wenige Sekunden die Zellkerne angefärbt und danach unter fließenden Wasser für 5 Minuten wieder entblaut. Fixiert wurden die Zellen mit flüssiger Glyceringelatine. Die Fotoaufnahmen erfolgten mit dem Mikroskop Evos XL Core (AMG, Bothell, USA) bei 400-facher Vergrößerung. Da für die Anfärbung aller drei Marker auf etablierte Färbeprotokolle zurückgegriffen wurde, die die Spezifität der Färbungen dokumentierten [83,94], konnte auf die Durchführung einer Färbung mit entsprechender Isotypenkontrolle verzichtet werden.

3.7 RNA-Isolierung, reverse Transkription und RT-PCR

Für die Isolierung der Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid* = RNA) der sechs unterschiedlich mono- und kokultivierten HPDE-Zellen mussten zunächst die Schritte, wie in **Kapitel 3.2 - 3.4** beschrieben, erfolgen. Für die Isolierung der RNA wurde nach dem Protokoll des *peqGOLD Total RNA Kit* verfahren. Dafür wurden die HPDE-Zellen aus den sechs Behandlungsansätzen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend je 300 µl *Lysis Buffer T* pro Bedingung den Pellets zugeführt. Das Lysat wurde auf die *DNA Removing Column*, die zuvor in 2 ml Röhren gesteckt wurden, verteilt. Diese wurden eine Minute bei 12000 UpM zentrifugiert, damit sich die RNA im Durchfluss sammelte. Die Säule mit enthaltender DNA konnte dann entsorgt werden. Anschließend wurden 300 µl Ethanol (70 %) zum Säulendurchfluss hinzugegeben und im Vortexer vermischt. Das gesamte Volumen wurde dann auf die *PerfectBind Column*, die zuvor in ein 2 ml Röhren gesteckt wurde, umpipettiert und bei 11000 UpM für eine Minute zentrifugiert. Die *PerfectBind Column*, die nun die RNA beinhaltete, wurde auf ein neues 2 ml Röhren gesetzt, mit 500 µl *RNA Wash Buffer I* gewaschen und eine Minute bei 11000 UpM zentrifugiert. Eine erneute Waschung mit 600 µl *RNA Wash Buffer II* und gleicher Zentrifugeneinstellung wie im Schritt zuvor folgte. Für die Elutiation der RNA wurden 40 µl RNase freies Wasser zugegeben und es für eine weitere Minute ruhen gelassen, um

dann abschließend noch einmal eine Minute bei 8000 UpM zentrifugiert zu werden. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe eines Spektrophotometers (PeqLab) gemessen. Für die anschließende Reverse Transkriptase wurden 0,5 µg der RNA abgenommen und eingesetzt. Für eine spätere Gewinnung der komplementären Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid* = cDNA) wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

Um nach dem Prinzip der reversen Transkription aus der RNA cDNA herzustellen, wurde nach den Herstellerangaben des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* verfahren. Dafür wurden zunächst 0,5 µg RNA in nukleasefreiem Wasser aufgenommen, um ein Volumen von 11,5 µl zu erhalten und diese Suspension anschließend mit 1 µl Oligo (dT) Primer, die zur Markierung der Poly-A-Enden der RNA-Stränge für die Transkriptionsenzyme dienen, vermischt. Diese Lösung wurde für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und dann für 5 Minuten bei 12000 UpM zentrifugiert. Nachfolgend wurden in angegebener Reihenfolge folgende Komponenten hinzugegeben:

4 µl Reaktionspuffer
0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)
2 µl 10 mM dNTP Mix
1 µl RevertAid M-MLV Reverse Transkriptase

Das Gesamt-Volumen von 20 µl wurde gevortext und zentrifugiert, um anschließend bei 42°C für 60 Minuten im Wärmeschrank inkubiert und nochmals abschließend bei 70°C für 5 Minuten inkubiert zu werden, womit die enzymatische Reaktion abgeschlossen war. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Das Prinzip bei der hier verwendeten Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*realtime polymerase-chain-reaction*, RT-PCR) mit dem Cyanin-Farbstoff SYBR Green I beruht auf der Detektion doppelsträngiger DNA. Der Farbstoff bildet mit der cDNA einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der stärkere Fluoreszenzsignale mit der doppelsträngigen cDNA als mit Einzelstrang-DNA oder RNA generiert und somit eine Quantifizierung erlaubt. Das gemessene Fluoreszenzsignal steigt mit zunehmender Zahl der Amplifikationskopien. Der zur Auswertung herangezogene *Cycle of threshold*-Wert (CT-Wert) entspricht dem Zyklus der PCR, bei dem sich das Fluoreszenzsignal erstmalig von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je kleiner der Wert, desto eher lässt sich das

Fluoreszenzsignal detektieren und desto mehr Kopien sind bereits zu Beginn der Analyse vorhanden.

Um mit der RT-PCR eine relative Quantifizierung bestimmter transkribierter Gene nachweisen zu können, wurde die zuvor generierte cDNA mit einem Mastermix kombiniert. Zunächst wurde die cDNA in einem 1:5 Verhältnis mit destilliertem Wasser vermischt. In eine 96-Well-Platte wurden pro Bedingung Doppelwerte mit je 2,5 µl der cDNA-Lösung ins Well pipettiert. Für den Mastermix wurden pro Well je 7,5 µl mit folgender Zusammensetzung zubereitet:

5 µl Light Cycler Sybr Green I Master
1,5 µl destilliertes Wasser
1 µl des zu verwendenden Primerpaars

Die 96-Well-Platte wurde abschließend mit selbstklebender Folie verschlossen und für zwei Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Die RT-PCR erfolgte mit dem Light Cycler® 480-System (Roche). Analytierte Gene waren der epitheliale Marker E-Cadherin, die mesenchymalen Marker L1CAM und Vimentin sowie die Transkriptionsfaktoren Slug, Snail und ZEB-1. Zur Normalisierung diente das Haushaltsgen TBP. Als Negativkontrolle wurde Nuklease freies Wasser verwendet. Jeder PCR-Lauf verlief über 60 Amplifikationszyklen mit anschließender Schmelzkurvenanalyse. Ausgewertet wurde mit der Light-Cycler® 480-Software und der Software Excel (Microsoft).

3.8 Invasionsassays

Mithilfe von 2 verschiedenen Assays sollte das Invasionsverhalten der HPDE-Zellen nach Mono- bzw. Kokultur mit Teffs oder Tregs untersucht werden. Die HPDE-Zellen wurden zuvor wie in **Kapitel 3.2 - 3.4** beschrieben behandelt.

3.8.1 xCELLigence

Das xCELLigence System ermöglicht eine Echtzeit-Überwachung von zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Zytotoxizität, Invasion, Migration, Zellhaftung und Lebensfähigkeit unter Verwendung einer elektronischen Zellsubstrat Impedanz Sensorik (ECIS®). Innerhalb des Gerätes wird ein Wechselstrom (I) über die Elektrodenmuster an der Unterseite einer 16-Well-Platte angelegt, die zu einer Spannung (U) an den Elektroden führt und vom ECIS gemessen wird. Die Berechnung der Impedanz (R)

erfolgt dann über das Ohmsche Gesetz $R=U/I$ und wird gegen die Zeit kontinuierlich aufgezeichnet. Für die Messung von Zellmigration und –Invasion werden Zellen in eine sogenannte CIM-Platte¹⁶ ausgesät, die sich aus einem oberen und einem unteren Kompartiment zusammensetzt. Diese Kompartimente sind durch eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von 8 µm voneinander getrennt. Die Elektroden befinden sich auf der Unterseite des oberen Kompartiments, in welches die Zellen ausgesät werden. Nach Durchwandern des oberen Kompartiments (mit Matrixbeschichtung spricht man von Invasion) und Anhaften auf der Elektroden-beschichteten Unterseite kommt es zur Änderung des Widerstandes. Somit lässt sich die Migration bzw. Invasion von Zellen über die Elektroden kontinuierlich graphisch festhalten. Die Auswertung der Daten erfolgt über die RTCA Software 1.2.

Für die Messung des Invasionsverhaltens der unterschiedlich kultivierten HPDE-Zellen musste die CIM-Platte¹⁶ zunächst unter sterilen Bedingungen vorbereitet werden. Dafür wurde die Unterseite des oberen Kompartiments mit 30 µl Kollagenlösung (20 µg/50 µl PBS) pro Well beschichtet, ohne die Goldelektrode am Boden der Wells zu berühren. Die Kollagenlösung musste für 1-2 Stunden bei RT trocknen gelassen werden. In der Zwischenzeit wurden die HPDE-Zellen nach 72 stündiger Mono- und Kokultur (**Kapitel 3.2 - 3.4**) in 100 µl RPMI-Medium (+1 % FCS +1 % L-Glutamin) aufgenommen. Hierbei wurden 40000 Zellen pro Well eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Wells des unteren Kompartiments mit 170 µl RPMI-Medium (+1 % FCS +1 % L-Glutamin) blasenfrei befüllt, bevor das obere Kompartiment mit der trockenen Kollagenschicht darauf gesetzt werden konnte. Nun wurden nach Entfernen des zum zweiten Kompartiments zugehörigen Deckels 30 µl Medium zugeführt und für 1 Stunde zum Equilibrieren in den Brutschrank gestellt. Nach Einsetzen der Platte in die vorgesehene Messeinrichtung wurden dann die Verbindungen überprüft und das Hintergrundsignal bestimmt. Dann wurden je 100 µl der Zellsuspensionen als Doppelwerte in die Wells überführt und die restlichen Wells sowie die Reservoirkammern mit 100 µl PBS als Verdunstungsschutz aufgefüllt. Nach Platzierung der Platte im Brutschrank für 30 Minuten zum gleichmäßigen Absetzen der Zellen, wurde die Platte in die Messeinrichtung gestellt und die Messung gestartet. Zur Beurteilung der Zellinvasion wurden nur die ersten 24 Stunden berücksichtigt, da im Rahmen von Vorversuchen ermittelt wurde, dass nach 24 Stunden die Zellen anfangen zu proliferieren und somit die erfassten Signale nicht mehr eindeutig auf Invasion zurückgeführt werden können.

3.8.2 Boydenkammer Assay

Ähnlich wie das xCELLigence System besteht die Boydenkammer aus einem Zellkulturgefäß mit zwei Kammern, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind (siehe **Abbildung 7**). Um das Invasionsvermögen der unterschiedlich mono- und kokultivierten HPDE-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in Kollagen beschichtete Transwells mit einer Porengröße von 8 µm ausgesät, die in die Wells einer 24-Well-Platte eingehängt wurden, wodurch ein Zweikammersystem geschaffen wurde. Pro Kulturbedingung der HPDE-Zellen wurden je 2 Transwells bestückt und die Zellen für 24 Stunden invadieren gelassen. Im ersten Transwell wurden dann alle Zellen, die sich nach 24 Stunden noch auf der Oberseite der Transwells befanden und nicht invadiert waren, entfernt, wodurch sich nur noch die invadierten Zellen auf der Unterseite der Membran im System befanden. Beim zweiten Well wurden keine Zellen entfernt und somit alle Zellen der Ober- und Unterseite detektiert (Gesamtzellmenge). Der Prozentsatz der invadierten Zellen wurde daraus wie folgt ermittelt:

% invadierte Zellen = invadierte Zellen x 100 % / Gesamtzellmenge

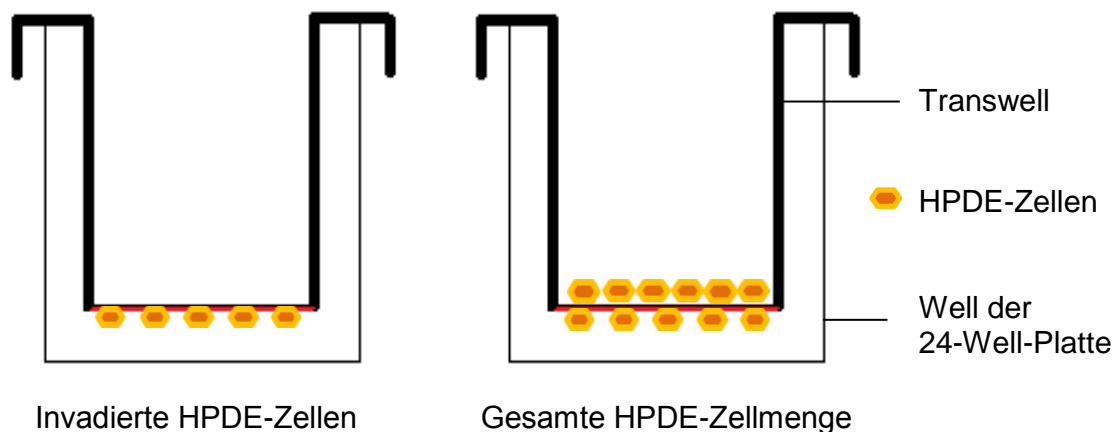


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Boydenkammer

Mittels der Boydenkammer wurden unterschiedlich mono- und kokultivierte HPDE-Zellen (gelbe Raute) in Doppelansätzen auf ihr Invasionspotential untersucht. Die eingesetzten Transwells besitzen eine mit Kollagen beschichtete Membran mit 8 µm Porengröße. In diesen wurden die HPDE-Zellen für 24 Stunden invadieren gelassen und anschließend die Oberseite eines Transwell der Doppelansätze von den Zellen bereinigt. Der erste Ansatz beinhaltete somit nur Zellen auf der Unterseite der Membran (=Invadierte HPDE-Zellen), der zweite Ansatz beinhaltet Zellen auf Ober- und Unterseite (=Gesamte HPDE-Zellmenge). Aus dem Quotienten der Absorptionswerte beider Ansätze nach oben genannter Formel wurde die relative Invasionsrate berechnet.

Zunächst mussten die Transwells vorbereitet werden. Die Unterseiten der Transwells wurden unter der Sterilbank mit 50 µl verdünnten Kollagen (20 µg/50 µl PBS) beschichtet und mussten bei RT für 1-2 Stunden trocknen. Anschließend wurden die Transwells in

eine 24-Well-Platte, deren Wells mit 500 µl RPMI-Medium (+1 % FCS +1 % L-Glutamin) zuvor befüllt worden waren, umgesetzt und mit 500 µl der Zellsuspensionen befüllt. Die Zellkonzentration pro Well belief sich dabei auf 30000 Zellen in 500 µl RPMI Medium (+1 % FCS +1 % L-Glutamin) resuspendiert. Die bestückten Platten wurden nun über einen Zeitraum von 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Die Aufarbeitung begann am Folgetag mit der Absaugung der Medien aus den Wells und Transwells. Jedes zweite Well wurde anschließend mit einem Wattestäbchen fein säuberlich von den nicht invadierten Zellen im Inneren des Transwells befreit, sodass von jeder Bedingung ein Transwell verblieb, das nur die Zellen enthielt, die über 24 Stunden durch die Poren auf die Unterseite des Transwells invadiert waren. Das zweite Well verblieb unbehandelt und enthielt alle ausgesäten Zellen. Nachfolgend wurden 100 µl Kristallviolett-Lösung in jedes Transwell sowie weitere 400 µl in die darunter befindlichen Wells pipettiert und bei RT für 30 Minuten einwirken lassen. Es folgten drei Waschschrte à 15 Minuten mit je 1000 µl Aqua dest für die Wells und je 500 µl Aqua dest für die Transwells. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 %iger Essigsäure entfärbt. Dafür wurden je 300 µl Essigsäure in die Wells und je 200 µl Essigsäure in die Transwells pipettiert und für eine Stunde einwirken lassen. Um dann die Farbkonzentration zu messen, wurde die gefärbte Essigsäure aus Transwell und Well zusammenpipettiert und je 100 µl jeder Bedingung in Doppelwerten in eine neue 96-Well-Platte überführt. Als Referenzgröße dienten zwei zusätzliche Wells mit je 100 µl 10 %iger Essigsäure. Das Photometer bestimmte bei einer Wellenlänge von 580 nm die Absorption. Unter der Verwendung der erhaltenen Absorptionsmesswerte wurde die relative Invasionsrate wie oben dargelegt errechnet.

3.9 Bio-Plex Analyse

Mit der Bio-Plex Methode lassen sich bis zu 100 Analyten gleichzeitig in einer Probe detektieren. Das System beruht auf einer Kombination aus einem klassischen Sandwich-ELISA und einer Durchflusszytometrie. Mit dieser Methode wurden Überstände aus der Mono- bzw. Kokultur der HPDE-Zellen mit aktivierten Teffs (siehe **Kapitel 3.2 - 3.4**) untersucht, um das durch Interaktion beider Zellpopulationen entstandene Zytokinprofil zu bestimmen. Die monokultivierten HPDE-Zellen dienten hierbei als Referenzgröße. Die bis zur Analyse bei -20°C gelagerten Überstände wurden auf folgende Zytokine untersucht: IL-6, IL-8, IL-12(p70), IL-13, IFN γ , MCSF, GCSF, TGF- β 1 und TNF- α . Die Methode wurde nach Herstelleranleitung am Bio-Plex® 200 Reader am

Forschungszentrum Borstel durchgeführt und die Datenanalyse wurde mit der Bio-Plex Manager 6.1 Software der Firma Bio-Rad ausgeführt.

3.10 Blockade von TNF- α und IL-6 während der Kokulturen

Um zu überprüfen, ob TNF- α und IL-6 eine Rolle in der T-Zell-vermittelten EMT und Invasion von HPDE-Zellen spielen, wurden beide Faktoren unter Kokulturbedingungen blockiert. Hierfür wurden HPDE-Zellen ausgesät und mit aktivierten Teffs (siehe **Kapitel 3.2 -3.4**) kokultiviert. Die Aktivität von IL-6 oder TNF- α wurde neutralisiert, indem zu Beginn der 72 stündigen Kokultur 10 $\mu\text{g/ml}$ des antagonistischen IL-6 Rezeptor-Antikörpers Tocilizumab oder 10 $\mu\text{g/ml}$ des löslichen TNF- α Rezeptors Etanercept den Zellen zugeführt wurden. Als Kontrolle dienten 10 $\mu\text{g/ml}$ Rituximab, einem Antikörper gegen CD20, welches sich weder auf der Oberfläche pankreatischer Epithelzellen noch auf CD4+ T-Zellen befindet. Daraus ergaben sich folgende Bedingungen, unter denen die HPDE-Zellen für 72 Stunden kokultiviert wurden:

1. HPDE + Ko-Teffs + Aktivierungsbeads
2. HPDE + Ko-Teffs + Aktivierungsbeads + Rituximab
3. HPDE + Ko-Teffs + Aktivierungsbeads + Tocilizumab
4. HPDE + Ko-Teffs + Aktivierungsbeads + Etanercept

Die Aufarbeitung erfolgte wie in **Kapitel 3.4** erläutert. Die abgelösten HPDE-Zellen wurden im Anschluss auf eine Veränderung ihrer Zellmorphologie mikroskopisch untersucht, das Invasionsverhalten in der Boydenkammer (**Kapitel 3.8.2**) geprüft und ihre RNA nach Umschreibung in cDNA mittels RT-PCR auf EMT Marker Expression analysiert (**Kapitel 3.7**).

3.11 Statistische Auswertung

Die semiquantitativ erhobenen *in situ* Daten wurden in Kreuztabellen mittels Chi-Quadrat-Tests auf signifikante Korrelationen untersucht. Die *in vitro* Daten wurden zunächst hinsichtlich einer Normalverteilung überprüft. Nicht normalverteilte Daten sind als Mediane mit 1. und 3. Quartil dargestellt und wurden mit dem Mann-Whitney Rangsummentest auf Signifikanz getestet. Normalverteilte Daten wurden mit dem

Student's t-Test über Bildung der Mittelwerte und der Standardabweichung auf Signifikanz getestet. Für die statistische Auswertung wurde SigmaPlot Software 12.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) verwendet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Detektion von EMT assoziierten Veränderungen in pankreatischen Gangepithelien und hoher CD4+ T-Zell-Präsenz in CP Geweben kann als Hinweis auf entzündungsinduzierte EMT gewertet werden

Um die T-Zell-Präsenz innerhalb des pathologischen pankreatischen Stromas zu beurteilen, wurden chronisch entzündete und maligne entartete Pankreasgewebeschnitte auf CD4 und FoxP3 gefärbt und untersucht. Diese Daten wurden im Rahmen einer anderen Doktorarbeit erhoben [95]. Hierfür wurden Gewebeproben von 15 CP und 42 PDAC Patienten verwendet. Weitere Charakteristika der Patienten sind **Tabelle 7** zu entnehmen.

Tabelle 7: Charakteristika von CP und PDAC Patienten

Parameter	Anzahl der Fälle
CP Patienten	15
Median Alter (Spanne)	52 (40-69)
Geschlecht (männlich/weiblich)	13/2
PDAC Patienten	42
Median Alter (Spanne)	65 (46-85)
Geschlecht (männlich/weiblich)	24/18
T stage	T3
N stage	N1
M stage	M0
Tumor grading	
G1	6
G2	23
G3	13
G4	0

Tabelle 8 gibt die Scoreverteilungen der CD4+ T-Zell-Präsenz wider. Auffällig war die Präsenz von CD4+ T-Zellen, die im chronisch entzündeten Gewebe in über 90 % der Schnitte einen großen Anteil der Stromazellen ausmachten und sich interessanterweise erhöht um die Gangepithelien lokalisiert beobachten ließen. Dieser Anteil CD4+ T-Zellen am Gesamtstroma nahm im PDAC hingegen wieder ab und war nur noch in der Hälfte

der PDAC Gewebeschnitte deutlich über 10 % zu detektieren. Die Präsenz von Tregs, die durch FoxP3 Positivität im CD4+ T-Zellkompartiment detektiert wurde, zeigte in der CP einen nur geringen Anteil der CD4+ Zellen, nahm jedoch in den PDAC Gewebeschnitten einen größeren Anteil CD4+ T-Zellen ein.

Tabelle 8: Scoreverteilung der CD4+ und FoxP3+ T-Zell-Präsenz im CP und PDAC Gewebe

Dargestellt sind Fallzahlen der Scoreverteilung der untersuchten CD4+ und FoxP3+ T-Zellen. NA steht für nicht auswertbar.

Variable	CP (n=15)			PDAC (n=42)		
T-Zellen (bezogen auf)	Zahl der Fälle (Score)			Zahl der Fälle (Score)		
CD4+ (Stroma)	1 (1)	14 (2)		21 (1)	21 (2)	
FoxP3 (CD4+)	11 (1)	4 (2)		17 (1)	24 (2)	1 NA

So wurden die CP Gewebeschnitte von einem FoxP3 negativen CD4+ T-Zelltyp dominiert. Da CP Gewebe bereits eine hohe Präsenz von CD4+ T-Zellen aufweisen und im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass in Pankreasgangepithelien durch eine chronische Entzündung EMT induziert wird [23], sollte als nächstes untersucht werden, ob eine EMT bereits im humanen chronisch entzündeten Gewebe von den Pankreasgangepithelien durchlaufen wird und die hohe Präsenz von CD4+ T-Zellen damit korreliert.

Vimentin und L1CAM werden in Zellen, die eine EMT durchlaufen, erhöht exprimiert, jedoch physiologisch nicht in Epithelzellen [83,96]. Im Gegensatz dazu wird E-Cadherin obligat in Epithelzellen exprimiert [96]. Darauf beruhend wurden die 15 CP Gewebeschnitte zusätzlich zu den bereits erfolgten E-Cadherin und L1CAM Färbungen auf Vimentin gefärbt. **Tabelle 9** zeigt die Scoreverteilung der Gewebeschnitte nach Anfärbung der EMT Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin.

Tabelle 9: Scoreverteilung der EMT Marker Expressionen im CP Gewebe

Dargestellt sind die Fallzahlen der Scoreverteilung der EMT Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin in Pankreasgangepithelien in CP Geweben. NA steht für nicht auswertbar.

EMT Marker	Zahl der Fälle (Score) von n=15 CPs		
	Score 1	Score 2	NA
E-Cadherin	2	10	3
L1CAM	5	10	
Vimentin	7	8	

Eine Vimentin Expression in über 10 % der Pankreasgangepithelien (Score 2) konnte bei 8 der 15 untersuchten CP Geweben nachgewiesen werden. Besonders in jenen, die in ein aktives desmoplastisches Gewebe eingebettet waren, war eine starke Vimentin Anfärbung zu beobachten. Dies ließ sich zusätzlich daran festmachen, dass all diejenigen CP Gewebeschnitte, in denen mehr als 10 % der Gangepithelien positiv für Vimentin waren, ebenso eine starke CD4+ T-Zell-Präsenz (Score 2) vorherrschte (100 %). Dies traf nicht auf die Tregs zu. Nur 25 % (2 von 8) der Vimentin hochexprimierenden CP Gewebeschnitte wies gleichzeitig eine hohe Tregs-Präsenz auf (beide Score 2). 6 der 8 Vimentin hochexprimierenden Gewebe (Score 2) wiesen auch eine starke L1CAM Expression (Score 2) auf. Bei einem der Gewebeschnitten mit starker Vimentin Expression im Gangepithel (Score 2) ließ sich eine verminderte E-Cadherin Expression feststellen. Weder die Vimentin Expression noch die Expression der anderen EMT Marker ließen sich jedoch mit der Präsenz von CD4+ T-Zellen und FoxP3+ T-Zellen statistisch signifikant korrelieren (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Statistische Korrelationen der T-Zell-Präsenz mit EMT Markern in CP Geweben

Dargestellt sind p-Werte des Chi-Quadrat-Tests nach Auswertung der Kreuztabellen von dem Score-Vergleich CD4+ T-Zellen und FoxP3+ Tregs mit den EMT-Markern E-Cadherin, L1CAM und Vimentin.

Variable	E-Cadherin	L1CAM	Vimentin
CD4+ Zellen	0,167	0,333	0,467
FoxP3+ Tregs	0,455	0,560	1

Es lassen sich die *in situ* Befunde so zusammenfassen, dass sich bereits im chronisch entzündeten Gewebe EMT Marker nachweisen lassen, die sich in Form von einer erhöhten L1CAM und Vimentin Expression in Gangepithelien von Vorläuferläsionen in CP Geweben darstellen ließen. Ein deutlicher Verlust der E-Cadherin Expression war nur in den wenigsten Gangstrukturen zu verzeichnen. Die hohe Präsenz der CD4+ T-Zellen innerhalb der CP Gewebe wurde von einem FoxP3 negativen Phänotyp der CD4+ T-Zellen dominiert. Es besteht zwar keine statistisch signifikante Korrelation zwischen EMT Markern und CD4+ T-Zellen, aber bei genauerer Analyse einzelner Gänge war auffällig, dass Gangstrukturen bzw. PanINs, die verstärkt von CD4+ T-Zellen umgeben waren, eindeutige EMT Anzeichen in Form erhöhter Expression von Vimentin und partiellem Verlust von E-Cadherin aufwiesen (**Abbildung 8**).

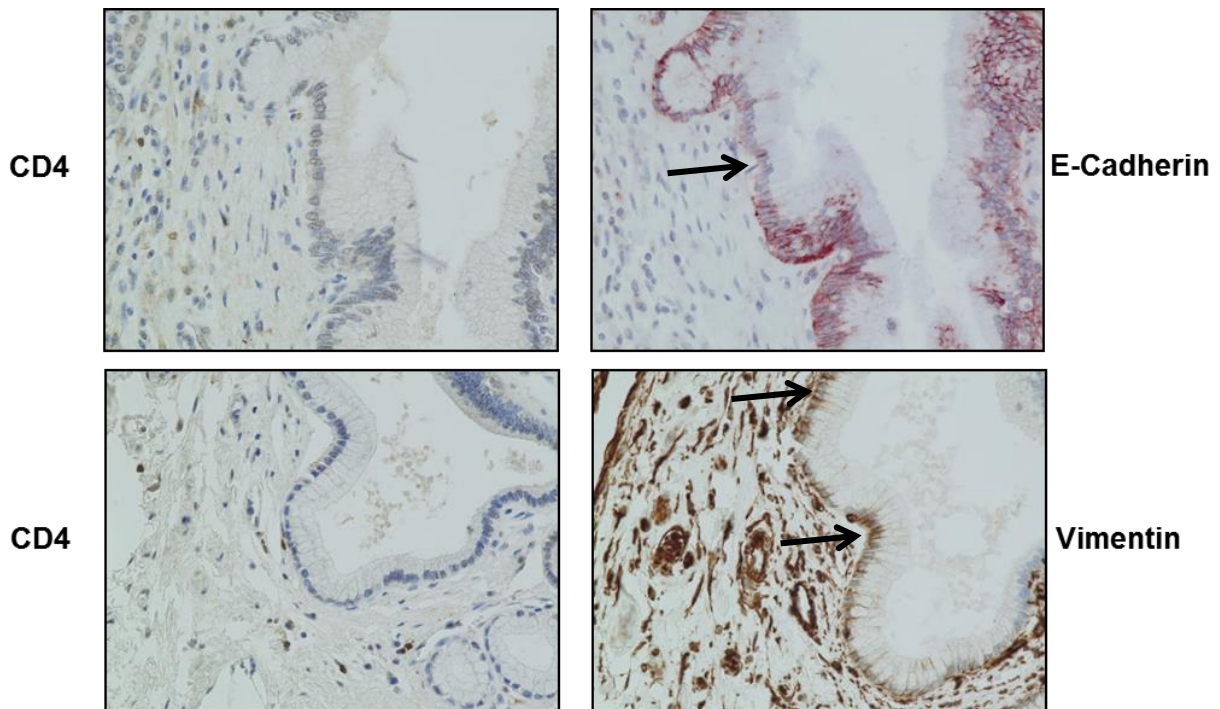


Abbildung 8: CD4+ T-Zell-Präsenz und EMT typische Expression in CP Geweben

Repräsentative CP Gewebeschnitte demonstrieren verminderte E-Cadherin Expression (siehe Pfeil) und erhöhte Vimentin Expression (siehe Pfeil) in Duktalzellen eines PanINs, das eingebettet ist in ein desmoplastisches Stroma mit angereicherten CD4+ T-Zellen (400-fache Vergrößerung).

Um die frühen EMT assoziierten Veränderungen bereits im nicht malignen chronisch entzündeten Pankreasgewebe näher zu charakterisieren und zu überprüfen, inwiefern T-Zellen aus dem entzündlichen Stroma an diesem Prozess beteiligt sind, wurde *in vitro* im Rahmen von direkten Kokulturen der Einfluss von verschiedenen CD4+ T-Zellpopulationen auf die EMT Induktion im prämaligen Pankreasgangepithelien untersucht.

4.2 Durchflusszytometrische Färbung zur Reinheitsbestimmung der mittels negativer Selektion isolierter Teffs und Tregs

Um den Einfluss von verschiedenen CD4+ T-Zellpopulationen auf Pankreasgangepithelien zu untersuchen, wurden aus dem Blut gesunder Spender CD4+CD25- Teffs und CD4+CD25+CD127-CD49d- Tregs isoliert und für anschließende Kokulturversuche verwendet. Die Isolierung der Teffs und Tregs erfolgte nach der Methode nach Kleinewietfeld et al. mit wenigen Modifikationen über eine magnetische Separation zuvor markierter T-Zellen [60]. Aus MNZ wurden über negative Selektion zunächst CD4+ T-Zellen isoliert. Von dieser Zellsuspension wurde ein Teil für die Isolierung der Teffs verwendet, während der Großteil für die Isolierung der Tregs diente.

Teffs sind charakterisiert über die Expression von CD4 sowie der Abwesenheit von CD25. Immunsupprimierende Tregs hingegen sind positiv für CD4, FoxP3 und CD25 sowie immer negativ für die Kombination von CD49d und CD127. Die der Isolierung folgende Färbung der Teffs und Tregs auf CD4, CD25, CD49d und CD127 erlaubte eine Überprüfung der Reinheit der Subpopulationen mittels der Durchflusszytometrie (Abbildung 9).

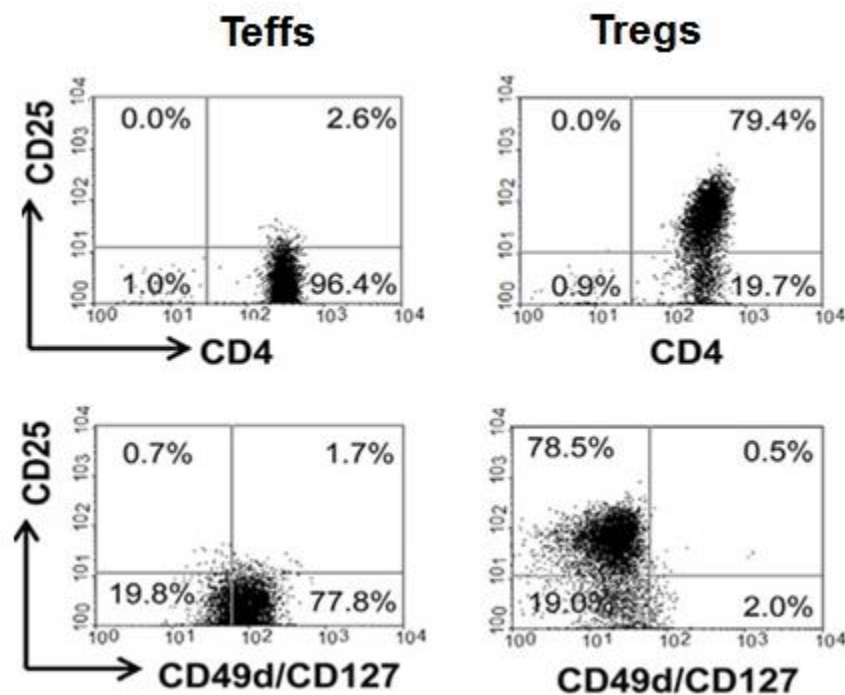


Abbildung 9: Durchflusszytometrie zur Reinheitsprüfung negativ selektierter Teffs und Tregs

Die Isolierung der Teffs und Tregs erfolgte nach der Methode nach Kleinewietfeld et al. [60] aus Blut gesunder Spender. Die isolierten Teffs und Tregs wurden auf CD4, CD25, CD49d und CD127 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Exemplarisch dargestellt sind die Daten aus einer Isolierung (n = 24 Isolierungen).

Für die Verwendung für Kokulturversuche mussten Tregs eine Reinheit von mindestens 70 % und Teffs eine Reinheit von 90 % aufweisen. Die immunsupprimierende Funktion der frisch isolierten Tregs konnte mittels Testung der Proliferationsinhibition von Teffs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt [97]). Dieser Funktionsnachweis der Tregs unterstützt die Charakterisierung der Tregs durch die hier durchgeführte durchflusszytometrische Messung der Oberflächenmoleküle.

4.3 HPDE-Zellen erwerben eine spindelförmige Zellform vornehmlich durch Kokultur mit aktivierten Teffs

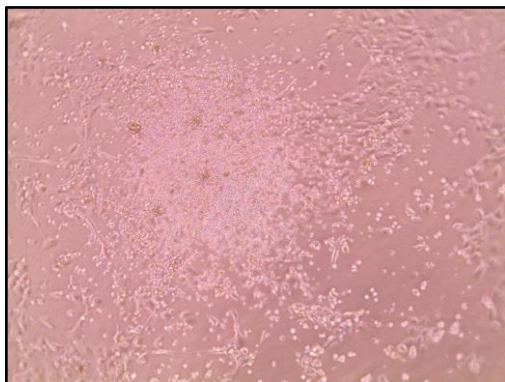
Um den Einfluss von Teffs und Tregs auf prämaliges Pankreasgangepithel zu untersuchen, wurden HPDE-Zellen in Mono- und Kokultur mit Teffs oder Tregs für 72 Stunden kultiviert. Um zusätzlich zu überprüfen, ob der Aktivierungsstatus der T-Zellen einen Einfluss dabei hat, wurden alle Kulturbedingungen in An- oder Abwesenheit von Aktivierungsbeads durchgeführt, durch die die Präsenz von Antigenpräsentierenden Zellen simuliert wird [98]. Nach der 72 stündigen Mono- und direkten Kokultur mit den CD4+ T-Zellsubgruppen wurden die HPDE-Zellen morphologisch mit dem Mikroskop Evos bei 400-facher Vergrößerung beurteilt, um die HPDE-Zellen auf eine veränderte Morphologie in Richtung eines mesenchymalen Phänotyps zu untersuchen. Zuvor wurde vor Ablösen der T-Zellen die T-Zellformation und Verteilung innerhalb der Wells begutachtet.

Die Verteilung der T-Zellen in den Wells zeigten Unterschiede zwischen den aktivierten Teffs und Tregs. Ohne Aktivierungsbeads waren beide T-Zellpopulationen zentral lokalisiert und bildeten eine klare Abgrenzung zu den HPDE-Zellen (Fotos nicht gezeigt).

Abbildung 10 zeigt die unterschiedliche Verteilung der aktivierten Teffs und Tregs nach 72 stündiger Kokultur mit den HPDE-Zellen. Die aktivierten Teffs verteilten sich im Well, bildeten ausgeprägte Cluster und waren bis in die Peripherie vorgedrungen.

Der Großteil der aktivierten Tregs blieb ähnlich der inaktivierten Teffs und Tregs bevorzugt zentral gelegen. Nur vereinzelte Zellen lösten sich aus dem zentralen Verband und waren peripher lokalisiert.

Kokultivierte aktivierte Teffs



Kokultivierte aktivierte Tregs

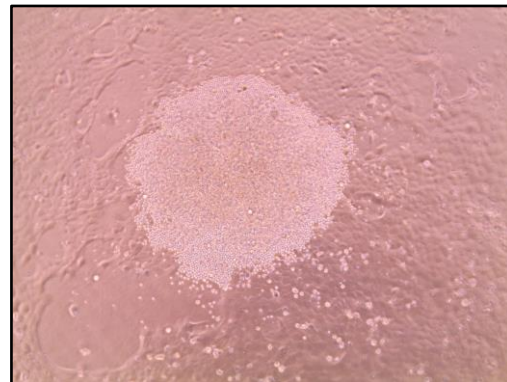


Abbildung 10: Kokultivierte aktivierte Teffs und Tregs

Dargestellt sind aktivierte Teffs und Tregs nach 72 stündiger Kokultur mit HPDE-Zellen. Die Fotos repräsentieren 24 unabhängige Versuche, wofür Blut von 24 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde.

Im Anschluss wurden die T-Zellen aus den Wells gelöst und die Morphologie der HPDE-Zellen begutachtet (**Abbildung 11**).

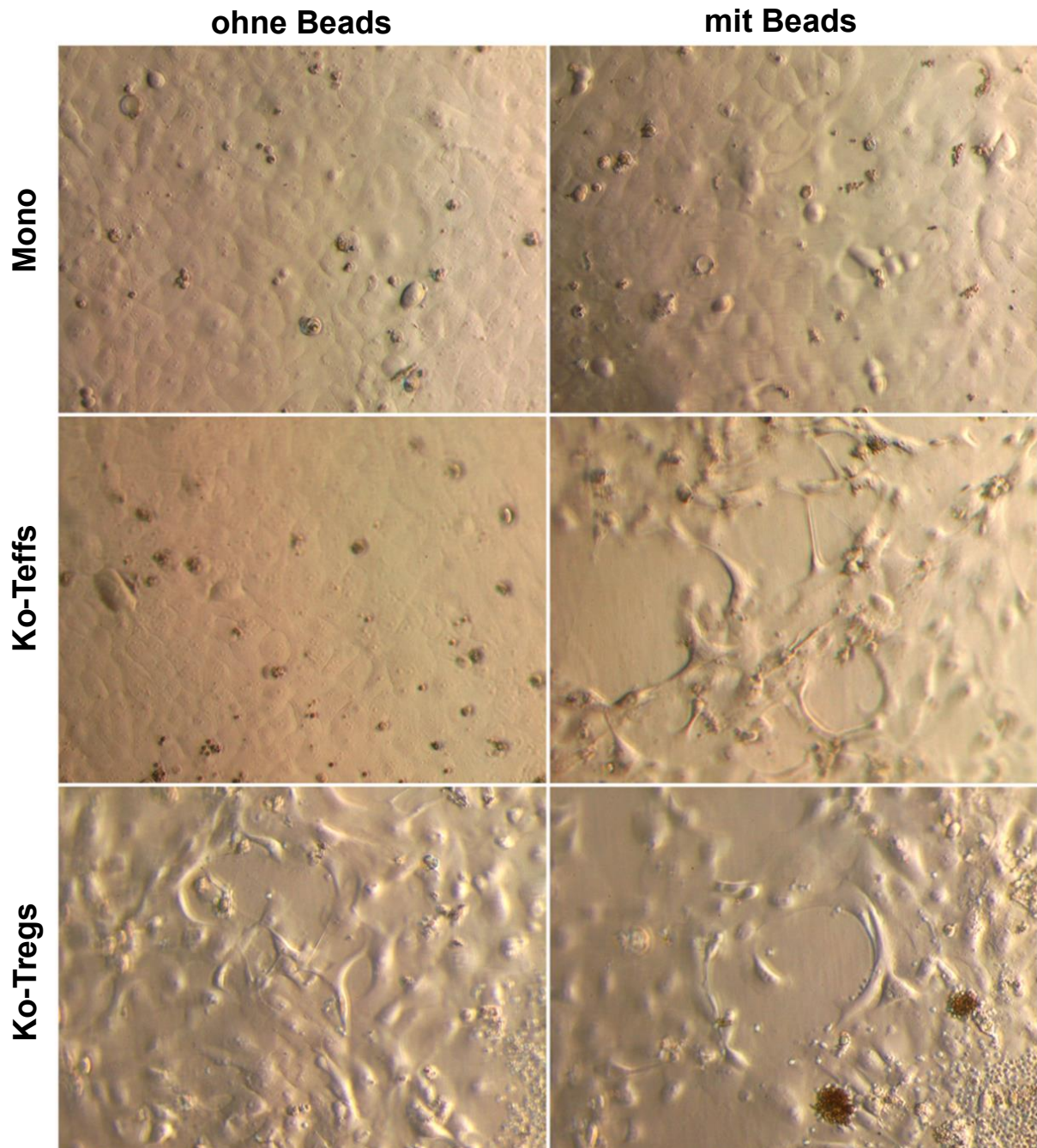


Abbildung 11: Zellmorphologie der HPDE-Zellen nach Mono- bzw. Kokultur

HPDE-Zellen nach 72 stündiger Mono- (Mono) oder Kokultur mit Teffs (Ko-Teffs) oder Tregs (Ko-Tregs) in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads (ohne Beads/ mit Beads). T-Zellen waren hier bereits abgelöst. Die Fotos wurden bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen und repräsentieren 24 unabhängige Versuche, wofür Blut von 24 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde.

Die monokultivierten HPDE-Zellen zeigten unabhängig der An- oder Abwesenheit von Aktivierungsbeads einen homogenen Zellrasen mit polygonalen Zellgrenzen und

kubischer Zellform, wie es dem epithelialen Charakter dieser Drüsengangepithelien entspricht.

Während die HPDE-Zellen sich nach Kokultur mit den nicht aktivierten Teffs kaum bis gar nicht von den monokultivierten HPDE-Zellen unterschieden, zeigten die Epithelzellen in Gegenwart der aktivierten Teffs eine stark reduzierte Zellzahl und deutlich mesenchymal morphologische Veränderungen. Die HPDE-Zellen lagen verteilt im Well vor, bildeten kaum mehr einen homogenen Zellrasen aus und Zell-Zell Kontakte waren aufgehoben. Die Zellmorphologie ließ eine stark spindelförmige Form erkennen, charakteristisch für mesenchymale Zellen. Zudem waren die Zellen vergrößert und zeigten in alle Richtungen vorstoßende Pseudopodien.

Nach Kokultur mit nicht aktivierten Tregs zeigten die HPDE-Zellen morphologische Veränderungen im Vergleich zur Monokultur. Zwar war der Zellrasen überwiegend homogen geblieben, doch ließen sich vereinzelt nach Ablösen der Tregs spindelförmige Zellen nachweisen. Nach Kokultur mit aktivierten Tregs zeigten die HPDE-Zellen vermehrt Zelllöcher und spindelförmige Zellen, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den mit aktivierten Teffs kokultivierten HPDE-Zellen. Diese schienen in Anwesenheit von Aktivierungsbeads den größten Einfluss auf die Morphologie der HPDE-Zellen hinsichtlich eines mesenchymalen Phänotyps zu haben.

Um zu überprüfen, ob die teilweise deutlich veränderte Morphologie der HPDE-Zellen in Gegenwart von Teffs und Tregs mit weiteren EMT typischen Veränderungen assoziiert sind, wurde als nächstes die Expression von EMT Markern untersucht.

4.4 HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs weisen deutliche EMT assoziierte Veränderungen auf

Um EMT Marker in den HPDE-Zellen nach Einfluss der Teffs und Tregs zu charakterisieren, wurden zunächst die Expression von epithelialelem E-Cadherin, mesenchymalen L1CAM und Vimentin sowie der EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren ZEB-1, Snail und Slug auf RNA-Ebene mittels RT-PCR analysiert. **Abbildung 12** gibt die Ergebnisse der RT-PCR wider.

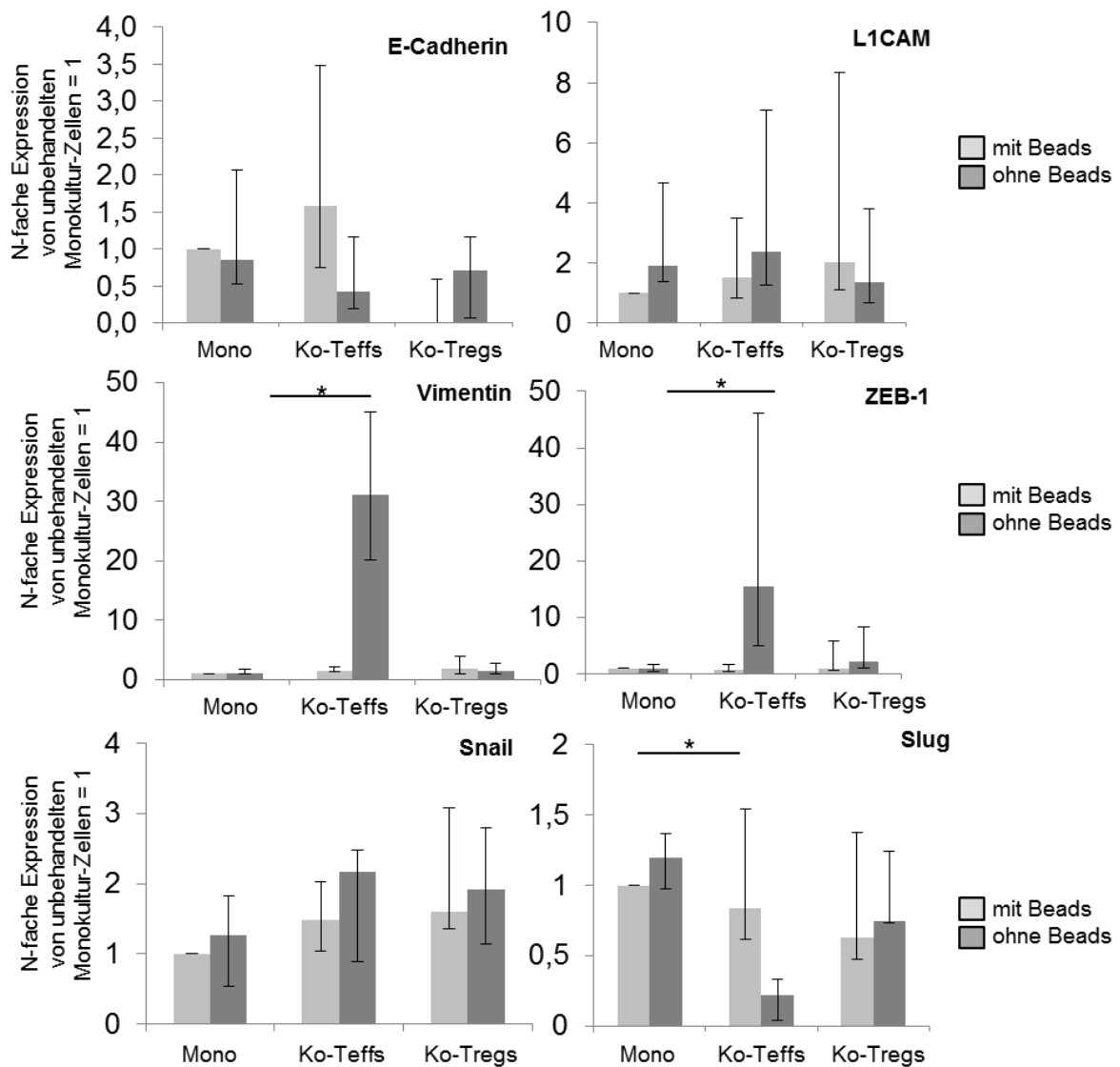


Abbildung 12: EMT Marker Expression in HPDE-Zellen nach Mono- bzw. Kokultur

Untersucht wurden HPDE-Zellen nach 72 stündiger Mono- oder Kokultur mit Teffs oder Tregs in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads (ohne Beads/mit Beads) auf die Expression von EMT Markern. Es wurde zunächst auf TBP als Kontroll-Haushaltsgen normalisiert. Die Daten sind dann als n-fache Expression von der unbehandelten Monokultur (ohne Aktivierungsbeads) dargestellt. Die Daten sind dargestellt als Mediane + 3. bzw. 1. Quartil von 5-7 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 5-7 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierung genutzt wurde. * = $p < 0.05$.

Der Aktivierungsstatus der T-Zellen hatte einen deutlichen Einfluss auf die Expression EMT assoziierter Marker in HPDE-Zellen in der RT-PCR. Die Unterschiede in der Expression von HPDE-Zellen, die mit inaktivierten T-Zellen kokultiviert wurden, waren weniger ausgeprägt im Vergleich zur unbehandelten Monokultur als nach Kokultur mit aktivierten T-Zellen. So war die Expression von E-Cadherin in HPDE-Zellen vornehmlich reduziert nach Kokultur mit inaktivierten Tregs. Nach Kokultur mit inaktivierten Teffs oder Tregs wurden jedoch leicht erhöhte Expressionen für Vimentin, L1CAM, ZEB-1 und Snail

in den HPDE-Zellen beobachtet. Slug zeigte dagegen nur negative Veränderungen verglichen mit der Monokultur.

In Einklang mit den vorherigen Beobachtungen zur spindelförmigen Morphologie wiesen HPDE-Zellen vornehmlich in Gegenwart von aktivierten Teffs und etwas weniger ausgeprägt von aktivierten Tregs mit Aktivierungsbeads eine EMT charakteristische Expression der untersuchten Marker im Vergleich zur Monokultur auf. So zeigten die HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs eine deutlich verminderte E-Cadherin Expression. Besonders deutlich (31-fach) war die Hochregulation der Vimentin Expression in HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs. Ähnlich erhöht war die Expression von ZEB-1 unter dieser Bedingung. Des Weiteren konnten erhöhte mRNA Spiegel für L1CAM und Snail in HPDE-Zellen unter Kokultur mit aktivierten Teffs detektiert werden. Überraschenderweise wurde die Expression von Slug in den HPDE-Zellen durch Anwesenheit aktivierter Teffs herunterreguliert.

Die mit aktivierten Tregs kokultivierten HPDE-Zellen zeigten ebenfalls EMT charakteristische Veränderungen hinsichtlich der vier EMT Marker E-Cadherin, Vimentin, ZEB-1 und Snail, jedoch waren diese nicht so sehr ausgeprägt wie in den HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs.

Da die kokultivierten HPDE-Zellen auf RNA-Ebene EMT assoziierte Veränderungen im Vergleich zu der Monokultur aufwiesen, galt es zu untersuchen, ob diese Veränderungen auch auf Proteinebene erfassbar sind. Dafür wurden die unterschiedlich kultivierten HPDE-Zellen mit Antikörpern gegen E-Cadherin, L1CAM und Vimentin inkubiert, um diese anschließend in der Durchflusszytometrie zu detektieren (**Abbildung 13**).

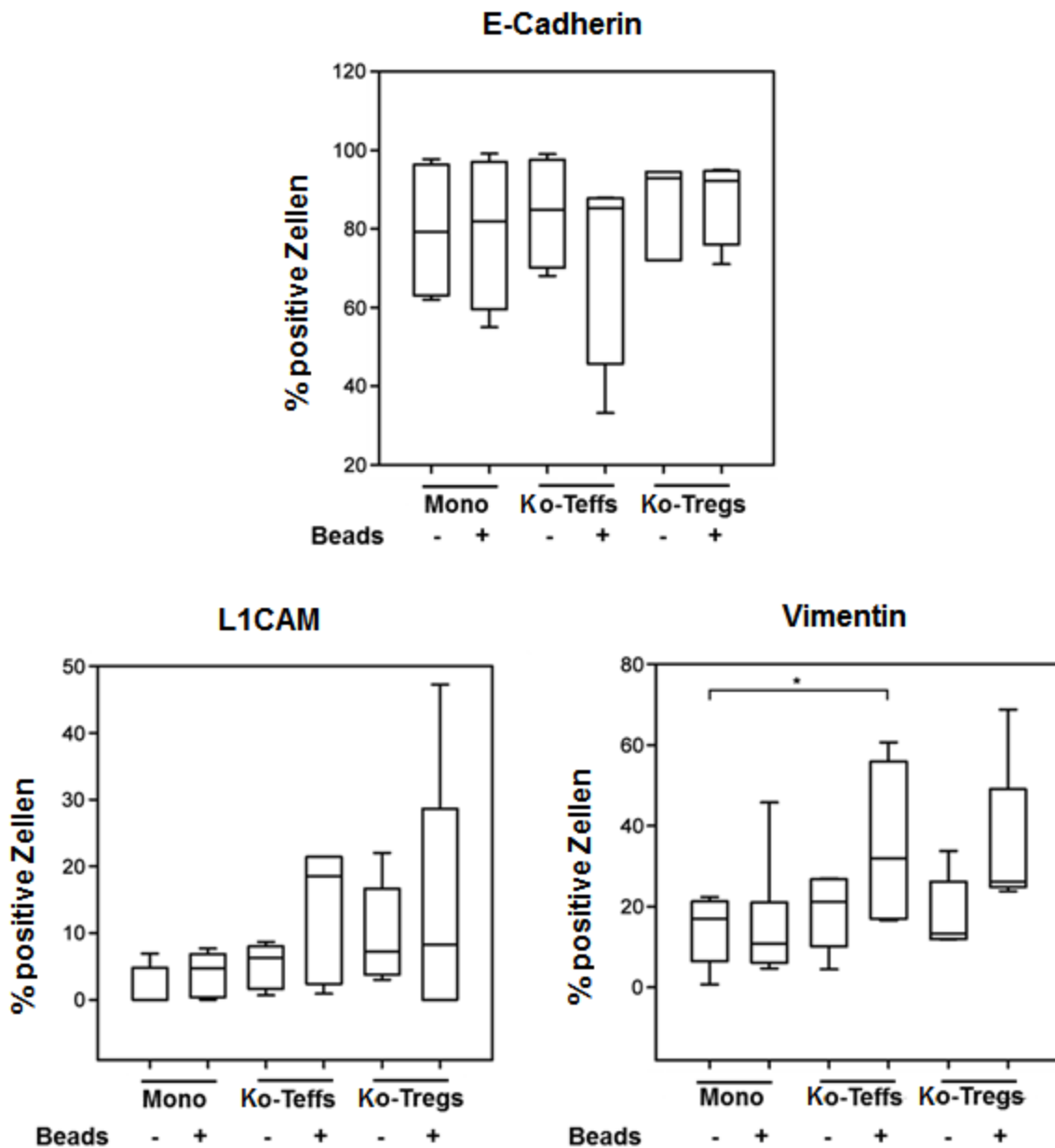


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse von EMT Markern in HPDE-Zellen

Durchflusszytometrisch analysiert wurden HPDE-Zellen nach 72 stündiger Mono- (Mono) oder Kokultur mit Teffs (Ko-Teffs) oder Tregs (Ko-Tregs) in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads (-Beads/+Beads) auf die Expression von E-Cadherin, L1CAM und Vimentin. Die Auswertungen der Versuche sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Daten stammen von 3-6 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 3-6 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde. * = $p < 0.05$.

Auch hierbei zeigten sich die stärksten Veränderungen hinsichtlich einer EMT in den HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs. Die aktivierten Teffs führten in der Kokultur der HPDE-Zellen dazu, dass die Zahl der E-Cadherin exprimierenden Zellen abnahm, während die Zellzahl der L1CAM und Vimentin exprimierenden HPDE-Zellen sich erhöhte.

Um auszuschließen, dass vor allem die Expression der membranständigen Markerproteine E-Cadherin und L1CAM in den HPDE-Zellen durch den proteolytischen Ablösevorgang aus der Platte verändert wurde, erfolgte zusätzlich eine Färbung von E-Cadherin, L1CAM und Vimentin direkt im Well nach Kokultur und anschließendem Ablösen der T-Zellen (**Abbildung 14**).

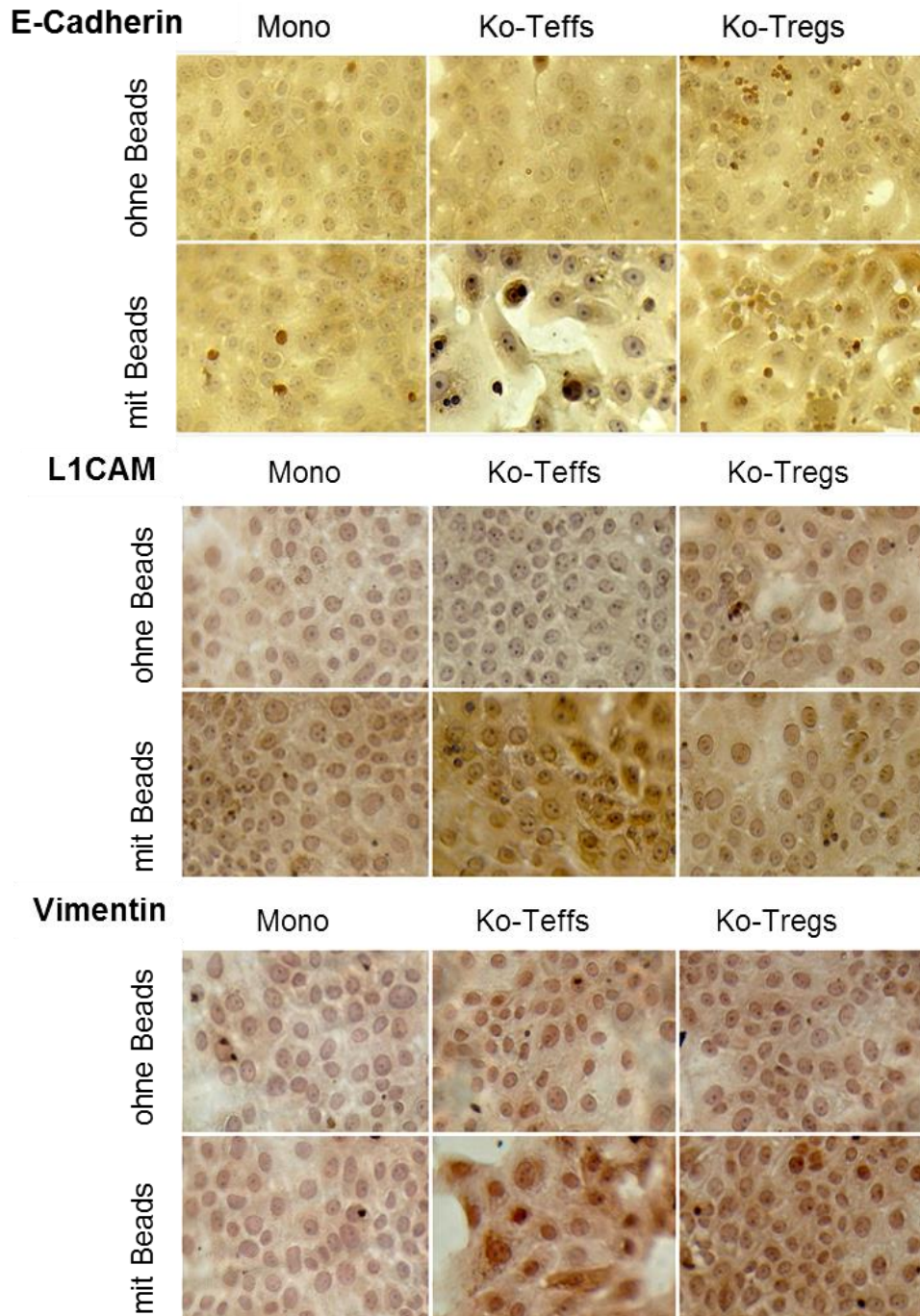


Abbildung 14: Immunzytochemische Färbung von EMT Markern in HPDE-Zellen

Gefärbt wurden HPDE-Zellen, die für 72 Stunden mono- (Mono) oder kokultiviert mit Teffs (Ko-Teffs) oder Tregs (Ko-Tregs) in An- oder Abwesenheit von Aktivierungsbeads (mit Beads/ohne Beads) wurden. Die Fotos wurden bei 580-facher Vergrößerung aufgenommen und repräsentieren 3 unabhängige Versuche, wofür Blut von 3 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde.

Die unbehandelten monokultivierten HPDE-Zellen zeigten dabei einen homogenen Rasen polygonaler Zellen, die sich für E-Cadherin anfärben ließen, jedoch kaum bis gar nicht L1CAM und Vimentin exprimierten. Ähnlich verhielten sich die monokultivierten HPDE-Zellen in Anwesenheit von Aktivierungsbeads, wobei jedoch bei der L1CAM Färbung eine leichte Anfärbbarkeit zu beobachten war.

Die stärksten Veränderungen zu den unbehandelten monokultivierten HPDE-Zellen waren unter den mit aktivierten Teffs kokultivierten HPDE-Zellen zu beobachten. Entsprechend der Daten aus der Durchflusszytometrie zeigte sich hierbei die schwächste E-Cadherin Anfärbung unter den sechs Bedingungen sowie eine deutliche Anfärbung von L1CAM und Vimentin.

Die mit aktivierten Tregs kokultivierten HPDE-Zellen zeigten gegenüber den monokultivierten HPDE-Zellen lediglich eine leicht erhöhte Expression von L1CAM und Vimentin, während die E-Cadherin Expression unverändert blieb.

Zusammenfassend zeigen die Daten aus RT-PCR, Durchflusszytometrie und immunzytochemischer Färbung, dass prämaligne HPDE-Zellen vor allem in der Anwesenheit aktivierter CD4+ Teffs und weniger unter Einfluss aktivierter Tregs einen mesenchymalen Phänotyp erwerben, erkennbar an einer spindelförmigen Zellmorphologie, verminderten E-Cadherin Expression sowie einer erhöhten L1CAM und besonders erhöhten Vimentin Expression.

Um zu verifizieren, ob diese EMT typischen Veränderungen auch mit einem veränderten Invasionspotential einhergehen, wurden HPDE-Zellen aus Mono- bzw. Kokulturen auf ihr Invasionsverhalten untersucht.

4.5 Im xCELLigence System weisen HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs ein vermindertes Invasionsvermögen auf

Um das Invasionsverhalten der mono- und kokultivierten HPDE-Zellen zu untersuchen, wurde auf verschiedene Methoden zurückgegriffen. Die ersten Versuche erfolgten mit dem xCELLigence-System, mit welchem die Zellinvasion in Echtzeit über Impedanzänderungen untersucht werden kann. Hierfür wurden 40000 Zellen pro Bedingung eingesetzt und das Invasionsverhalten durch eine Kollagen-I-Matrix über einen Zeitraum von 24 Stunden ermittelt. Bei der Auswertung wurden alle Werte auf die Monokultur ohne Beads als Referenz normalisiert. Die Ergebnisse aus 3 Versuchen zeigen, dass mono- und kokultivierte HPDE-Zellen in Abwesenheit von

Aktivierungsbeads ein vergleichbares Invasionsverhalten zeigten und dass die HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs und Tregs sogar eine verminderte Invasion im Vergleich zu monokultivierten HPDE-Zellen aufwiesen (**Abbildung 15**).

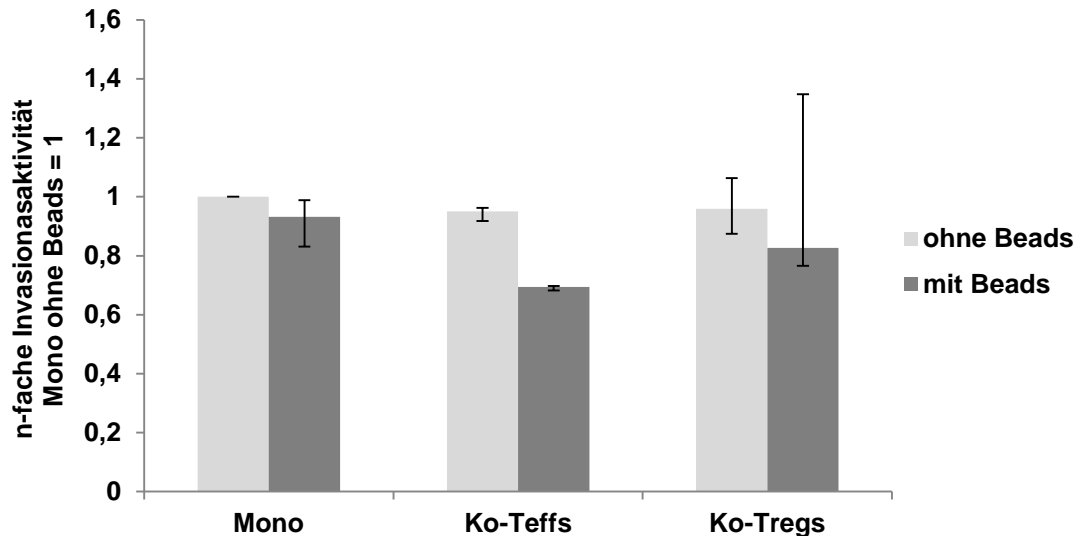


Abbildung 15: Invasionsaktivität der HPDE-Zellen im xCELLigence-System

Dargestellt ist die Invasionsaktivität der für 72 Stunden mono- (Mono) bzw. kokultivierten HPDE-Zellen mit Teffs (Ko-Teffs) oder Tregs (Ko-Tregs) in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads (ohne Beads/mit Beads). Normalisiert wurde auf die monokultivierten HPDE-Zellen ohne Aktivierungsbeads (=1). Die Daten sind dargestellt als Mediane + 3. bzw. 1. Quartil aus 3 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 3 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde.

Dieser Befund steht somit nicht im Einklang mit der Beobachtung, dass HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs die deutlichste morphologische Veränderung sowie die stärksten EMT Marker Veränderungen aufwiesen.

4.6 Im Boydenkammer Assay weisen HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs ein erhöhtes Invasionspotential auf

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass ein durch die Kokultur mit aktivierten Teffs verändertes Adhärenzverhalten der HPDE-Zellen die Messung des Invasionspotentials beeinflusst, wurde zur Beurteilung des Invasionsverhalten zusätzlich ein Boydenkammer Assay durchgeführt. Ein verändertes Adhärenzverhalten kann in einem verminderten Anwachsen der Zellen im Transwell resultieren, wodurch *per se* weniger Zellen, die auch invadieren könnten, im System wären. In Boydenkammer Assay müssen die Zellen ebenfalls durch ein kollagenbeschichtetes Transwell wandern, allerdings werden von jeder Kulturbedingung zwei Ansätze angelegt. In einem Ansatz werden nach 24 Stunden

nur die auf der Unterseite des Transwells befindlichen (invadierten) HPDE-Zellen gefärbt und gemessen. In dem zweiten Ansatz werden alle im System befindlichen Zellen (nichtinvadierte + invadierte Zellen) gefärbt und gemessen, woraus sich ein prozentualer Anteil der invadierten Zellen ermitteln lässt. Darüber können o.g. Unterschiede im Adhärenzverhalten berücksichtigt werden.

Hierfür wurden je 30000 HPDE-Zellen nach 72 stündiger Mono- bzw. Kokultur in Doppelwerten in die Transwells gegeben und diese über 24 Stunden invadieren gelassen, um anschließend die relative Invasionsrate zu erfassen (**Abbildung 16**).

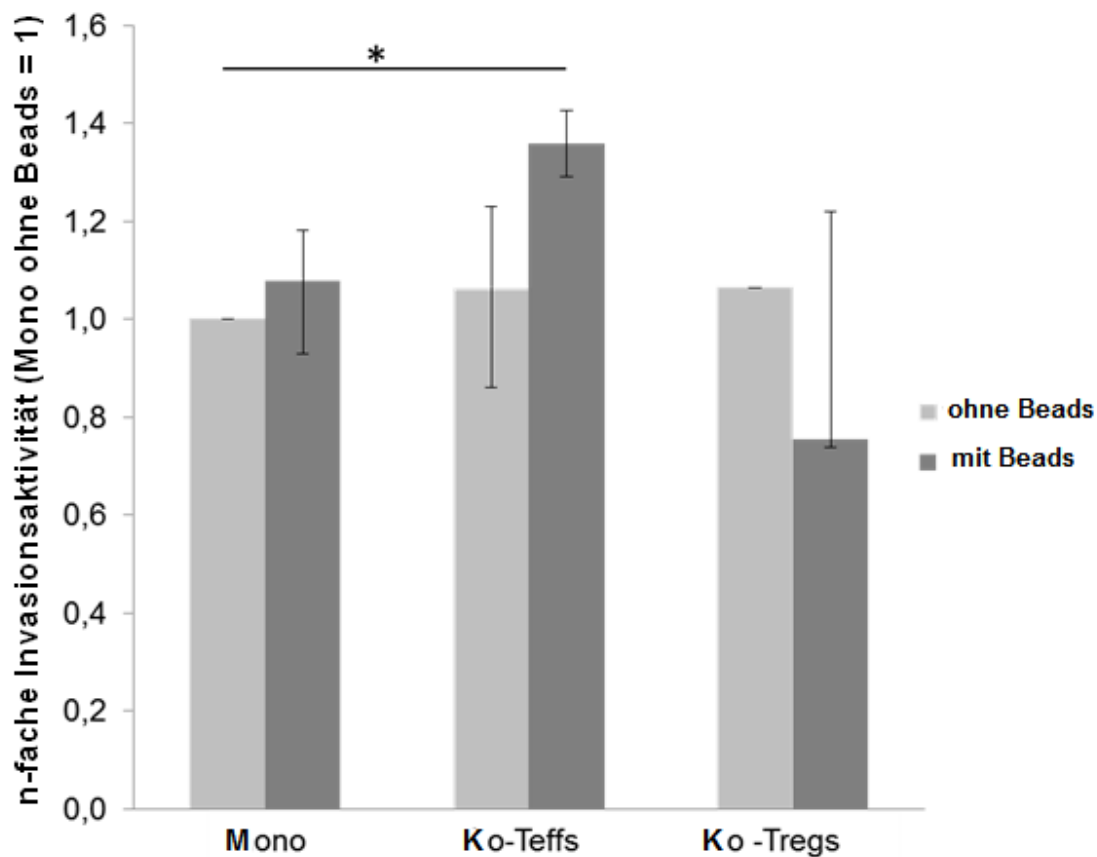


Abbildung 16: Relative Invasionsaktivität der HPDE-Zellen in der Boydenkammer

Die HPDE-Zellen wurden für 72 Stunden mono- (Mono) bzw. kokultiviert mit Teffs (Ko-Teffs) oder Tregs (Ko-Tregs) in Ab- oder Anwesenheit von Aktivierungsbeads (ohne Beads/mit Beads) und anschließend in der modifizierten Boydenkammer mit Kollagen beschichteten Transwells auf ihr Invasionsverhalten untersucht. Die Daten sind als n-fache Invasionsaktivität der unbehandelten monokultivierten HPDE-Zellen (ohne Beads) gezeigt. Dargestellt sind Mediane + 3. bzw. 1. Quartil von 3 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 3 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde. * = $p < 0.05$

Die kokultivierten HPDE-Zellen mit unaktivierten Teffs und Tregs zeigten gegenüber den unbehandelten monokultivierten HPDE-Zellen kaum Veränderungen hinsichtlich der Invasionsrate. Dagegen ließen sich divergente Veränderungen der Invasionsaktivität bei HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten T-Zellen feststellen. Die HPDE-Zellen zeigten

hierbei ein um 36 % signifikant erhöhtes Invasionspotential gegenüber den unbehandelten monokultivierten HPDE-Zellen.

Die HPDE-Zellen aus der Kokultur mit aktivierten Tregs zeigten hingegen ein deutlich vermindertes Invasionsvermögen gegenüber allen anderen Bedingungen.

Der Nachweis des verstärkten Invasionspotentials nach Kokultur mit aktivierten Teffs stand im Einklang mit den Ergebnissen aus der RT-PCR, der durchflusszytometrischen sowie immunzytochemischen Färbung und unterstützt die Hypothese, dass aktivierte Teffs zur EMT Induktion und Erhöhung der Invasionsfähigkeit in HPDE-Zellen beitragen. Als nächstes sollte untersucht werden, über welche Faktoren es zur EMT Induktion in HPDE-Zellen unter Einfluss aktivierter Teffs kommt.

4.7 Überstände aus Kokultur von HPDE-Zellen und aktivierten Teffs weisen erhöhte Spiegel von potenziellen EMT induzierenden Faktoren auf

Um zu überprüfen, über welche löslichen Faktoren es unter Kokultur mit aktivierten Teffs zur Induktion von EMT und zur erhöhten Zellinvasion in HPDE-Zellen kommt, wurden Überstände von mono- und mit aktivierten Teffs kokultivierten HPDE-Zellen auf verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren mittels Bio-Plex Analyse untersucht. Im Vordergrund standen dabei Faktoren, die bereits als EMT Induktoren beschrieben worden sind, wie z.B. TGF- β und TNF- α [83,88] oder von CD4+ T-Zellen sezerniert werden. Die Überstände der mono- und kokultivierten HPDE-Zellen wurden auf folgende Mediatoren untersucht: IL-6, IL-8, IL-12(p70), IL-13, IFN- γ , MCSF, GCSF, TGF- β 1 und TNF- α . Dabei zeigten IL-12 (p70), IL-13, IFN- γ , MCSF, GCSF und TGF- β in den HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs keine signifikanten Erhöhungen im Vergleich zur Monokultur (Daten nicht gezeigt). Anders hingegen verhielten sich IL-8, TNF- α und IL-6, wobei letztere zwei bereits als EMT Induktoren beschrieben sind [99,100]. Diese waren in den Überständen der kokultivierten Zellkulturen mit aktivierten Teffs gegenüber den Überständen der unbehandelten HPDE-Monokultur stark erhöht (**Abbildung 17**).

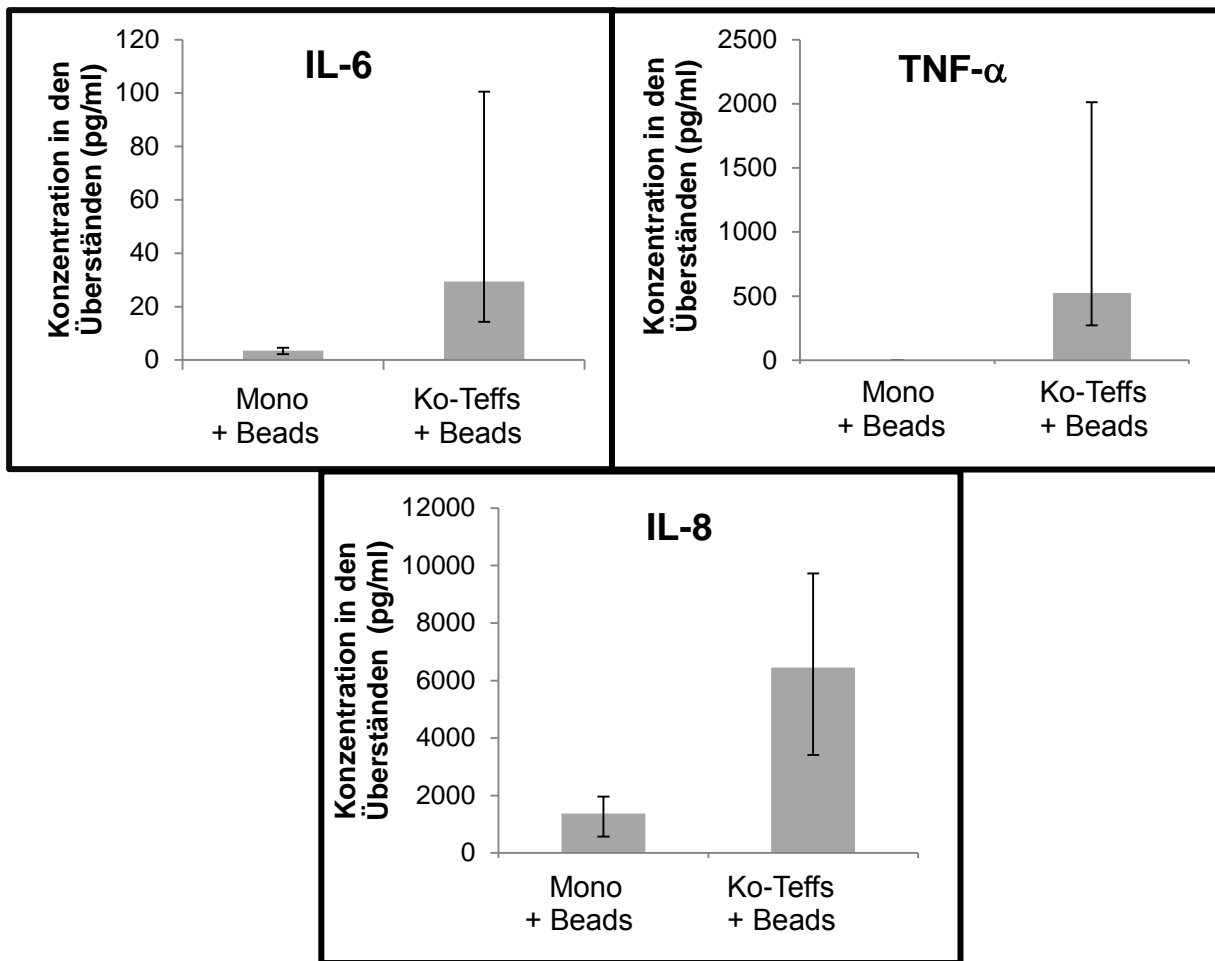


Abbildung 17: IL-6, TNF- α und IL-8 Konzentrationen in Überständen von mono- bzw. kokultivierten HPDE-Zellen

Gemessen wurden die IL-6, TNF- α und IL-8 Konzentrationen in Überständen von HPDE-Zellen, die entweder für 72 Stunden monokultiviert (Mono + Beads) oder kokultiviert mit aktivierten Teffs (Ko-Teffs + Beads) wurden. Normalisiert wurde auf die monokultivierten HPDE-Zellen mit Aktivierungsbeads. Die Daten sind als Konzentration [pg/ml] in den Überständen angegeben und repräsentieren Mediane + 3. bzw. 1. Quartil von 3 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 3 gesunden Spendern für die T-Zell-Isolierungen genutzt wurde.

Um nun zu untersuchen, ob die unter Kokultur mit aktivierten Teffs erhöhten Spiegel an TNF- α bzw. IL-6 kausal für die EMT assoziierten Veränderungen in HPDE-Zellen verantwortlich sind, wurde die Aktivität dieser Faktoren während der Kokultur inhibiert und die HPDE-Zellen im Anschluss auf EMT Merkmale untersucht.

4.8 Erhöhte Spiegel von TNF- α und IL-6 unter Kokultur mit aktivierten Teffs sind verantwortlich für den Erwerb eines mesenchymalen Phänotyps der HPDE-Zellen

Für die Überprüfung des Einflusses von TNF- α und IL-6 auf die EMT assoziierten Veränderungen in HPDE-Zellen wurde während der Kokulturen mit Teffs und Aktivierungsbeads entweder TNF- α (Etanercept) oder IL-6 (Tocilizumab) blockiert bzw. ein Kontrollantikörper (Rituximab) zugesetzt. Hierbei zeigte sich, dass unter beiden Blockadebedingungen die morphologischen Veränderungen der HPDE-Zellen weniger stark ausgeprägt waren als unter Kokultur mit Kontrollantikörpern. Obgleich immer noch gestreckte Zellen zu detektieren waren, war die Gesamtanzahl spindelförmiger Zellen deutlich vermindert und mehr kubische, polygonalförmige Zellen zu beobachten. Am stärksten war dies unter der Neutralisierung von TNF- α mittels Etanercept zu beobachten (**Abbildung 18**).

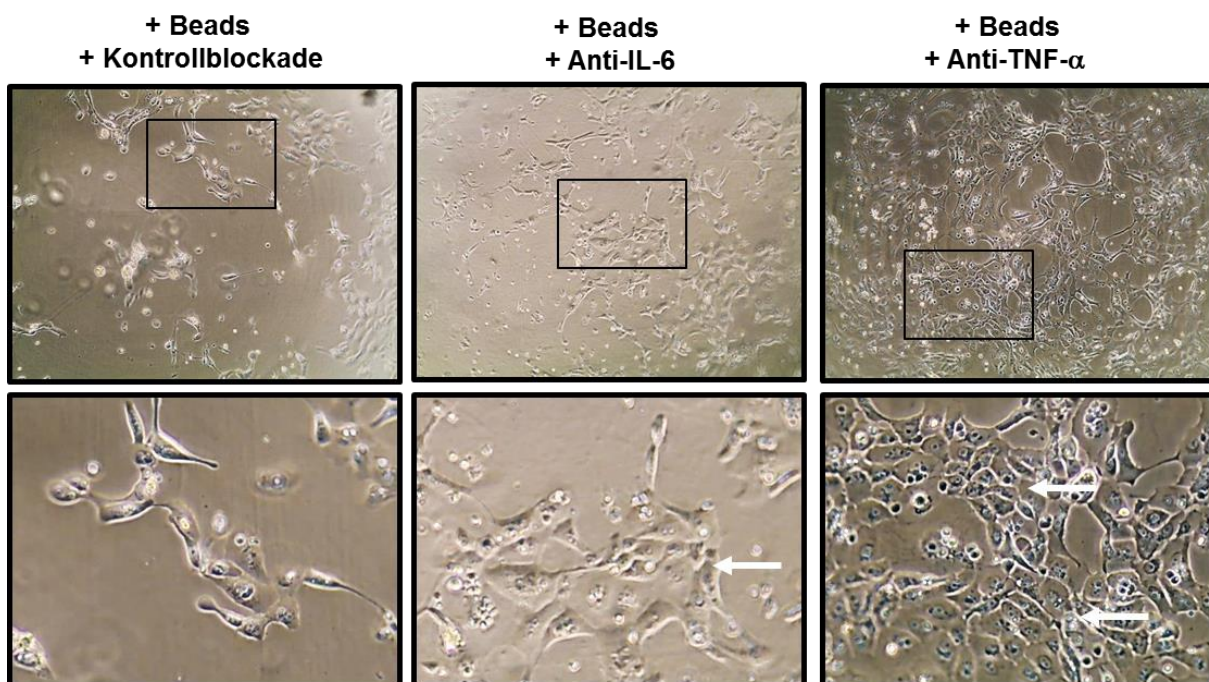


Abbildung 18: Zellmorphologie der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs und unter IL-6 oder TNF- α Blockade

Dargestellt sind HPDE-Zellen nach 72 stündiger Kokultur mit aktivierten Teffs (+ Beads) und Zusatz eines Kontrollantikörpers, IL-6-Rezeptor-Antikörpers oder eines löslichen anti-TNF- α -Rezeptors. Die Pfeile zeigen auf polygonale/kubische Zellen hin, bei denen die EMT revertiert wurde. Die Bilder zeigen repräsentativ die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Blockade-Versuchen, für die Blut von 3 gesunden Spendern zur Isolierung der Teffs benutzt wurde. Die Teffs waren bei den Bildaufnahmen bereits abgelöst. Die Vergrößerung der oberen Bildreihe beträgt 280-fach, die der unteren 560-fach.

Als Nächstes wurde die Expression der EMT assoziierten Marker E-Cadherin, L1CAM, Vimentin sowie ZEB-1 in den HPDE-Zellen unter den o.g. Bedingungen mittels RT-PCR untersucht.

Durch Inhibition sowohl von IL-6 als auch TNF- α konnte eine Erhöhung der E-Cadherin Expression gegenüber der Kontrollbehandlung beobachtet werden. Ferner war zu beobachten, dass die Expression von L1CAM durch Blockade der beiden Faktoren erhöht war, wohingegen die Expression von Vimentin und ZEB-1 deutlich vermindert war (**Abbildung 19**).

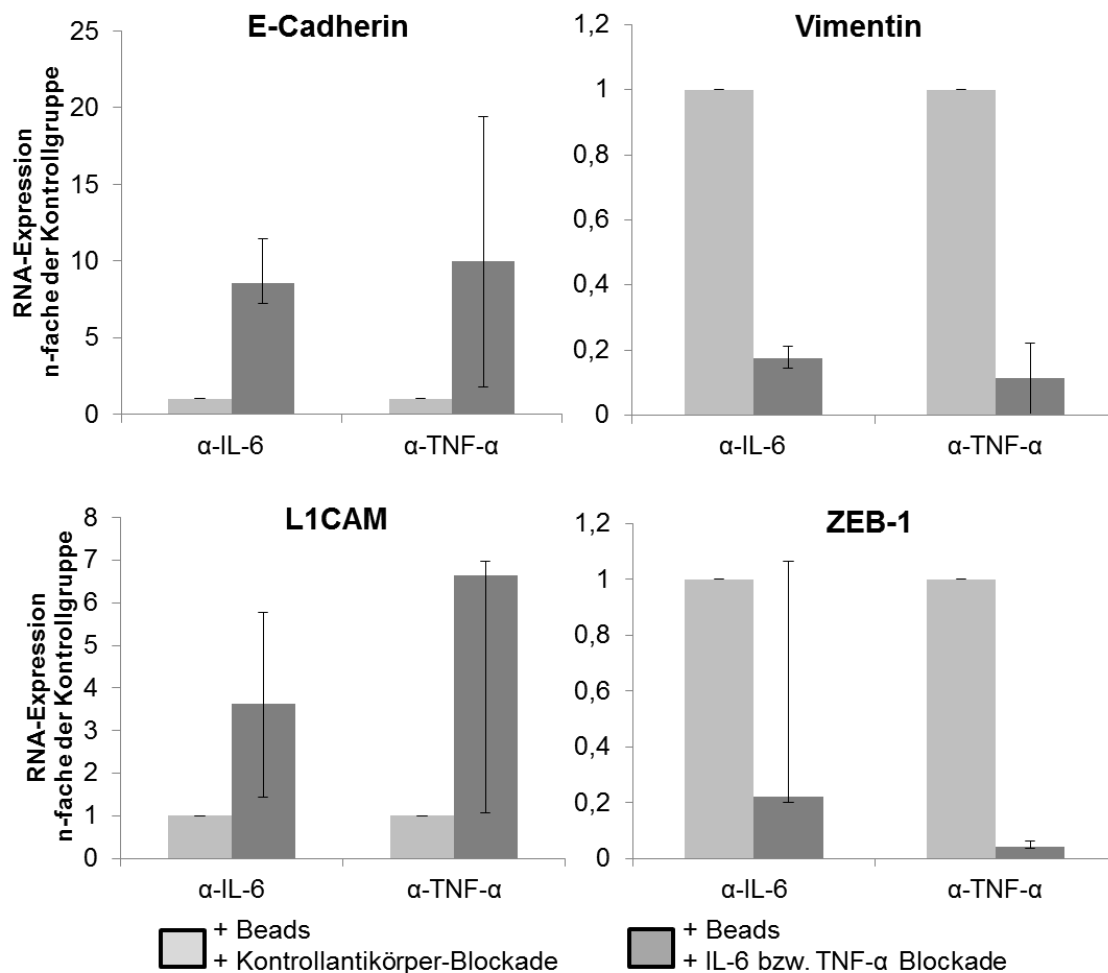


Abbildung 19: EMT-Marker Expression in HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs und unter IL-6 oder TNF- α Blockade

Analysiert wurden HPDE-Zellen, die über 72 Stunden mit aktivierten Teffs (+ Beads) und Zusatz eines Kontrollantikörpers, IL-6-Rezeptor-Antikörpers oder eines löslichen anti-TNF- α -Rezeptors kultiviert worden waren. Die Ergebnisse sind auf die Expression des Haushaltsgen TBP sowie auf kokultivierte HPDE-Zellen unter Kontrollantikörper-Behandlung (hellgraue Säule) normalisiert. Die Daten sind dargestellt als Mediane + 3. bzw. 1. Quartil von 3-4 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 3-4 gesunden Spendern für die Teffs-Isolierungen genutzt wurde. * = $p < 0.05$

Somit kann aus diesen Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass durch Blockade von IL-6 oder TNF- α eine deutliche, wenn auch nicht komplette Reversion der Teffs vermittelten EMT in HPDE-Zellen erzielt werden kann.

Um zu überprüfen, ob IL-6 bzw. TNF- α auch kausal an der erhöhten Invasionsfähigkeit der kokultivierten HPDE-Zellen beteiligt ist, wurde das Invasionsverhalten der mit aktivierten Teffs kokultivierten HPDE-Zellen unter Neutralisation von IL-6 und TNF- α in einer modifizierten Boydenkammer analysiert. Wie in **Abbildung 20** zu sehen ist, zeigten die kokultivierten HPDE-Zellen nach Neutralisierung der TNF- α Aktivität eine um 40 % reduzierte Invasionsrate. Auch die Blockade von IL-6 durch Tocilizumab ließ die Zellen um 20 % weniger invadieren im Vergleich zu Zellen, die in Gegenwart von aktivierten Teffs und unter Behandlung mit dem Kontrollantikörper kokultiviert worden waren. Die Ergebnisse bekräftigten somit die Bedeutung der Zytokine IL-6 und TNF- α an der Teff vermittelten EMT Induktion und erhöhten Invasivität der HPDE-Zellen.

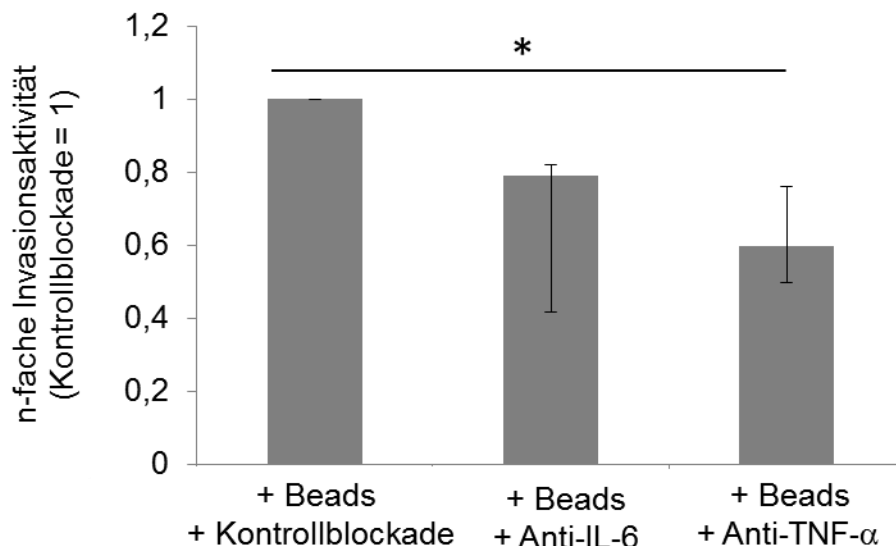


Abbildung 20: Invasionsaktivität der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs unter IL-6 oder TNF- α Blockade

Untersucht wurde die Invasionsaktivität von HPDE-Zellen nach 72 stündiger Kokultur mit aktivierten Teffs (+ Beads) und Zusatz eines Kontrollantikörpers, IL-6-Rezeptor-Antikörpers oder eines löslichen anti-TNF- α -Rezeptors in einer modifizierten Boydenkammer. Die Daten repräsentieren Mediane + 3. bzw. 1. Quartil von 3 unabhängigen Experimenten, wofür Blut von 3 gesunden Spendern für die Teffs-Isolierungen genutzt wurde. * = $p < 0.05$.

Zusammenfassend untermauern diese Daten die Hypothese, dass aktivierte CD4+ Teffs EMT und Zellinvasion in prämaligen Pankreasgangepithelien fördern. In diesem Prozess scheinen IL-6 und TNF- α , die durch die Wechselwirkungen beider Zellpopulationen erhöht gebildet und freigesetzt werden, eine wichtige Rolle zu spielen.

5. Diskussion

Das PDAC gilt als eines der bösartigsten Tumorentitäten, was unter anderem der frühen Invasion und Metastasenbildung sowie der hohen Therapierefraktärität geschuldet ist [1]. Bis dato hat sich die infauste Prognose des PDAC trotz intensiver Forschung nicht wesentlich verbessern können, weshalb innovative und neue therapeutische Strategien dringend erforderlich sind. Das PDAC ist charakterisiert durch eine starke desmoplastische Reaktion des umliegenden Stroma-Kompartiments [18]. Lange hat sich die Erforschung des PDAC vorwiegend auf die Tumorzellen selbst konzentriert, ohne dabei auf die Mitwirkung des Stromas Rücksicht zu nehmen. Immer mehr Studien konnten jedoch eine klinische Relevanz der Stromareaktion aufzeigen [21,30,83], das die Hoffnung hervorruft, durch ein besseres Verstehen dieser Stroma-Tumor-Interaktionen das Ansprechen auf Chemotherapeutika durch Eingreifen in diese Interaktionen zu verbessern bzw. eine Stroma induzierte Krebsentstehung in ihrem Ursprung zu verhindern. Entscheidende Merkmale bei der Entstehung einer Krebszelle stellen hierbei die von Weinberg & Hanahan deklarierten *Hallmarks of cancer* dar, nach denen Krebszellen sich die Eigenschaften aneignen können, apoptotische und wachstumshemmende Signale zu umgehen, Auswachsen von Blutgefäßen zu induzieren, autonomes und unlimitiertes Wachstum zu betreiben, auf veränderte Metabolismussysteme zur Energiegewinnung umzustellen, den Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entweichen sowie über u.a. EMT vermittelte Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten zu verfügen [101]. Dass Stroma- und Immunzellen bei dem Erwerb dieser Merkmale beteiligt sein können, konnte bereits mehrfach, u.a. auch für das PDAC belegt werden. So können Myofibroblasten unter anderem die Angiogenese fördern und Krebszellen vor Apoptose schützen [28,102] sowie Makrophagen das Proliferations- und Invasionsverhalten erhöhen [103]. Basierend auf diesen Beobachtungen werden daher die entzündlichen Prozesse neben genetischen Alterationen und genomischer Instabilität als *enabling hallmarks of cancer* bezeichnet, weil sie die Aneignung der anderen Merkmale fördern [19]. Die Aufgabe der Forschung besteht daher darin, die entzündlichen Prozesse in der Tumorumgebung genau zu beschreiben und zu verstehen, um den beteiligten Entzündungszellen ihren jeweiligen Beitrag an der Krebsentstehung zuordnen zu können. Hierbei ist zu beachten, dass die Krebsentstehung über den Erwerb der *Hallmarks of cancer* keiner linearen Progression folgt, sondern dass es sich um einen Prozess handelt, der sich variabel im zeitlichen Erwerb der *Hallmarks* präsentiert und bereits in benignen/prämaligen Zellen im

Rahmen einer Entzündung beginnen kann. CD4⁺ T-Zellen machen nicht nur den größten Teil der PDAC infiltrierenden T-Zellen aus, sondern sind auch verstärkt im Stroma der CP [24], die als Risikofaktor für das PDAC gilt, zu finden, wo sie schon früh mit Pankreasgangepithelien interagieren können. Daher konzentriert sich diese Arbeit auf die Erforschung der Interaktion zwischen CD4⁺ T-Zellpopulationen und benignen/prämalignen Pankreasgangepithelien und den Einfluss CD4⁺ T-Zellen auf EMT assoziierte Veränderungen in Gangepithelien, durch die Epithelzellen eine erhöhte Invasionsfähigkeit erlangen können [67].

Immunsupprimierende Tregs werden schon lange in der Literatur als protumorigene Zellen innerhalb des desmoplastischen Stromas diskutiert, indem sie den Krebszellen bei dem Ausweichen der Immunabwehr behilflich sind, Angiogenese fördern können [65] und ein immunsuppressives Milieu generieren, das zu einer Progression des Tumors beiträgt [29]. Bei der Funktion der CD4⁺ Tregs innerhalb dieser Stroma-Tumor-Interaktion wird meistens davon ausgegangen, dass sie durch eine Immunsystem aktivierende Eigenschaft eine antitumorigene Funktion einnehmen. Bis dato ist jedoch noch wenig über ihre direkten Effekte auf Epithel- und Tumorzellen in der Krebsentstehung bekannt. In dieser Arbeit sollte ausgehend von dem Befund, dass eine hohe Anzahl an Tregs im PDAC Gewebe mit einer schlechten Prognose für PDAC Patienten korreliert [64], erforscht werden, ob Tregs oder auch CD4⁺ Tregs bereits im prämaligen Pankreasgangepithelien zum Erwerb von Malignität assoziierten Eigenschaften im Sinne einer EMT und somit zur pankreatischen Tumorgenese beitragen.

Zunächst wurde in Gewebeschnitten untersucht, ob in jenen CP Geweben, in denen ein hoher Anteil von CD4⁺ T-Zellen oder FoxP3⁺ Tregs zu detektieren ist, die Pankreasgangepithelien den Prozess einer EMT durchlaufen, indiziert durch eine entsprechende Expression EMT charakteristischer Marker. Dies würde Rückschlüsse auf eine mögliche Induktion der EMT in Pankreasgangepithelien durch die Präsenz dieser CD4⁺ T-Zellen bereits im Rahmen einer chronischen Entzündung ergeben. Hierbei wurde sich auf E-Cadherin, L1CAM und Vimentin als wichtige EMT Marker fokussiert (siehe **Kapitel 1.4.2**), die anschließend *in vitro* in den Versuchen zur Charakterisierung der EMT in HPDE-Zellen herangezogen wurden.

Es wurden bereits erfolgte Auswertungen von Färbungen auf CD4⁺ T-Zellen, FoxP3⁺ Tregs, E-Cadherin sowie L1CAM in CP Gewebeschnitten verwendet und mit einer in dieser Arbeit erfolgten Färbung auf Vimentin vergleichend analysiert, um erstmalig eine Korrelation von EMT Parametern mit der Präsenz der CD4⁺ T-Zellsubgruppen zu prüfen.

In der Zusammenschau konnte in Gangepithelien vieler CP Gewebe Anzeichen einer EMT zusammen mit einer hohen Präsenz von CD4+FoxP3- T-Zellen beobachtet werden, es konnte jedoch keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt werden. Eine Beobachtung hierbei war, dass meistens nur einzelne Areale bzw. Zellen eines Ganges und nie ganze Gänge vollständig die EMT typischen Veränderungen aufwiesen. Wurden jedoch jene Gewebereiche gezielt auf die Präsenz der CD4+ T-Zellen untersucht, so konnte beobachtet werden, dass besonders Drüsenepithelien mit Arealen verstärkter Vimentin Expression in ein starkes desmoplastisches Stroma mit hoher CD4+FoxP3- T-Zell-Präsenz eingebettet waren. Eine weitere nicht statistisch signifikante Beobachtung war, dass in solchen Duktalzellen auch partiell die epitheliale E-Cadherin Expression vermindert bzw. verloren gegangen war. Dieser partielle Verlust der E-Cadherin Expression bei gleichzeitiger Zunahme der Vimentin Expression kann als Zeichen einer EMT gewertet werden.

Die Befunde aus den *in situ* durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass CD4+ T-Zellen und speziell CD4+FoxP3- T-Zellen eine Rolle in der EMT Induktion im Gangepithel während einer CP spielen können. Um jedoch die Verknüpfung der unphysiologisch auftretenden Vimentin Expression sowie dem Expressionsverlust von E-Cadherin in benignen/prämalignen Drüsenepithelien mit der gleichzeitig erhöhten Anwesenheit CD4+FoxP3- T-Zellen statistisch signifikant belegen zu können, fehlte es in dieser Arbeit an einem ausreichend großen Kollektiv an CP Gewebeschnitten. Daher sind weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv an CP Gewebeschnitten geplant. Ferner soll das methodische Scoring verfeinert werden, bei dem sich nicht auf das ganze Präparat, sondern fokussierter auf vereinzelte Drüsenareale und PanINs konzentriert wird, um die partiell beobachteten EMT Veränderungen besser berücksichtigen und erfassen zu können.

Da FoxP3+ Tregs in den CP Geweben im Vergleich zu den PDAC Geweben einen geringeren Teil der CD4+ T-Zellen ausmachen und diese auch nicht in unmittelbarer Nähe der Gangstrukturen zu finden waren, lässt sich vermuten, dass die beobachteten EMT assoziierten Veränderungen in der frühen Phase einer möglichen Krebsentstehung durch andere CD4+ T-Zellen oder Stromazellen getriggert werden. So existieren zahlreiche Arbeiten, die verschiedenen Stromazellen, z.B. Myofibroblasten und Makrophagen, eine entscheidende Rolle als Induktoren der EMT Merkmalsausprägungen in pankreatischen Gangepithelien innerhalb der PDAC

nachweisen konnten [30,94]. Im Mausmodell konnten Rhim et al. zeigen, dass bereits PanINs Anzeichen einer EMT aufweisen, wodurch sie befähigt werden, aus dem Pankreas zu disseminieren. Durch eine CP wurden diese Effekte weiter verstärkt, was die Bedeutung von entzündlichen Prozessen in der EMT Induktion bereits in einem frühen Stadium der Tumorgenese untermauert. Welche Bedeutung T-Zellen dabei zukommt, ist bisher jedoch nicht untersucht [23]. Der Anteil an CD4+CD25+ Tregs an T-Zellen im peripheren Blut von CP sowie PDAC Patienten ist gegenüber dem Anteil an Tregs aus dem Blut gesunder Spender erhöht [62]. Innerhalb des Pankreasgewebes machen aber CD4+CD25- Tregs bei CP Patienten mit 88 % und bei PDAC Patienten mit 91 % den größten Anteil an Gewebe infiltrierender CD4+ T-Zellen aus [104]. Die Charakterisierung der Tumor und Entzündung infiltrierenden T-Zellen, die als mögliche EMT Induktoren fungieren, stellt in der Forschung aufgrund der Vielfalt der T-Zellsubgruppen mit immunaktivierenden und immunsupprimierenden Funktionen nach wie vor jedoch eine Herausforderung dar. Die vereinfachte Darstellung, nach der bei Tregs von einem immunsupprimierenden CD4+CD25+ Phänotyp sowie bei immunaktivierenden Tregs von einem CD4+CD25- Phänotypen auszugehen ist, gilt mittlerweile als überholt. So konnten neuere Studien z.B. eine immunsupprimierende T-Zellpopulation mit dem Phänotyp CD4+CD25-CD69+ im peripheren Blut von CP und PDAC Patienten identifizieren [29]. In der Literatur wird dieser Phänotyp als Subgruppe der Tregs beschrieben, die einen immunsuppressiven Effekt besitzt und über membrangebundenes TGF- β 1 (mTGF- β 1) andere CD4+ T-Zellen in ihrer immunaktivierenden Funktion hemmt [105].

Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang nachweisen, dass CD4+CD25- Tregs, die nach der in dieser Arbeit ebenfalls angewandten Methode von Kleinewietfeld et al. aus MNZ gesunder Blutspender isoliert wurden, durch Kokultur mit L1CAM exprimierenden HPDE-Zellen oder PDAC-Zellen verstärkt einen solchen immunsupprimierenden CD4+CD25-CD69+ Phänotyp annehmen [104]. Dies belegt, dass CD4+ Tregs nicht nur immunaktivierend wirken, sondern sie durch den Einfluss ihrer Mikroumgebung in immunsupprimierende T-Zellen konvertiert werden können. Die Anwesenheit von L1CAM fördert in Tregs den Erwerb eines immunsuppressiven CD4+CD25-CD69+ Phänotyps und verdeutlicht die hohe Plastizität von Tregs, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Anzahl an Phänotypen immunsupprimierender CD4+ T-Zellen viel größer als angenommen ist.

Es konnte neben dem Blut auch für das PDAC bzw. CP Gewebe gezeigt werden, dass immunsupprimierende CD4+CD25-CD69+ T-Zellen mit 47 % bzw. 54 % den größten

Anteil an Tumor bzw. Entzündung infiltrierender CD4+ T-Zellen ausmachen und dass bei PDAC Patienten eine erhöhte Präsenz dieser Population mit einem Befall der Lymphknoten (N1) und einem höhergradig dedifferenzierten *grading* (G3/4) korreliert [104]. Dies bestätigt die Sichtweise, dass eine immunsupprimierende Aktivität von T-Zellen im Tumorgewebe die Tumorprogression vorantreibt, doch gibt es auch vermehrt Studien, die immunaktivierenden Faktoren protumorigene Effekte zusprechen. So gibt es Immunzellen, die in sich immunaktivierende sowie –supprimierende Eigenschaften vereinen. Anhand verschiedener Zelltypen lässt sich dies im Folgenden beschreiben: So zeigen z.B. T_H17-Zellen aus der Gruppe der CD4+ Teffs in ihrer Funktion als Entzündungsmodulatoren ein kontroverses Verhalten auf. Sie haben durch ein angiogenetisches und immunsuppressives Auftreten einerseits eine protumorigene Wirkung, bewirken andererseits aber eine Rekrutierung weiterer Immunzellen und unterhalten somit die Immunreaktionen [56]. Es wird diesem Teff-Subtyp mit immunaktivierenden und –supprimierenden Effekten in der Literatur sowohl eine protumorigene als auch antitumorigene Aktivität zugesprochen [106]. Ähnlich beschreibt Helm et al. für Makrophagen dieses Phänomen; proinflammatorische M1- und antiinflammatorische M2-Makrophagen sind beide in der Lage, EMT und das Invasionspotential von HPDE- und PDAC-Zellen zu erhöhen [30]. Diese Beispiele verdeutlichen, dass Immunzellen nicht allein aufgrund immunsupprimierender Eigenschaften tumorfördernd wirken können und dass ferner die in dieser Arbeit verstärkt im CP Gewebe detektierten CD4+FoxP3- T-Zellen weder ein immunaktivierender noch -supprimierender Charakter zugesprochen werden muss, um EMT Effekte in den umliegenden HPDE-Zellen induzieren zu können. Neben der Charakterisierung der T-Zelle hinsichtlich einer immunaktivierenden oder immunsupprimierenden Aktivität ist demnach die Kenntnis wichtiger, über welche Effekte Immunzellen über ihre immunologische Funktion hinaus einen Beitrag an der Entstehung und Progression von Tumoren haben.

Weiterhin ist bei der Betrachtung der CP und PDAC assoziierten Desmoplasie immer davon auszugehen, dass es sich um kein homogenes Gewebe handelt, nicht nur in Bezug auf die T-Zellen, sondern, dass alle Stromalen Komponenten mal mehr und mal weniger aktiv bzw. frequent sein können. So lassen sich große Unterschiede in der Präsenz nicht neoplastischer Zellen im desmoplastischen Stroma von den PanIN-Stadien ausgehend über das CIS bis hin zu dem invasiven, entdifferenzierten PDAC (G4) mit Lymphknoten- und Fernmetastasen (T1-4N1M1) ausmachen [21,24,42].

PanINs, die von Entzündungsinfiltraten umgeben sind, lassen sich sowohl im chronisch entzündeten Gewebe, als auch innerhalb eines PDAC Gewebes nachweisen, womit sich auch immer das umliegende Entzündungsinfiltrat je nach Grad der Erkrankung mitverändert [18,23]. So muss davon ausgegangen werden, dass noch nicht maligne duktale Epithelzellen in einer chronischen Entzündung sowie Krebszellen in der frühen und späten Phase der Karzinogenese durch Immun- und Stromazellen unterschiedlich beeinflusst werden. So könnte für CD4+ Tefs und Makrophagen durch ihre dominante Präsenz in der CP eine protumorigene Funktion in einer frühen Phase der Karzinogenese postuliert werden, während Zellen wie Myofibroblasten und CD4+ Tregs, die im PDAC Gewebe stärker präsent sind als in der CP, eher später in der Tumorprogression eine Rolle spielen [24,30,83].

Mit Hilfe der *in vitro* durchgeführten Untersuchungen von HPDE-Zellen, die in An- oder Abwesenheit verschiedener CD4+ T-Zellsubpopulationen, aber gezielt unter Ausschaltung anderer Einflüsse der Stromaumgebung, kultiviert wurden, sollte überprüft werden, ob bzw. welche CD4+ T-Zellpopulationen in der Lage sind, EMT assoziierte Veränderungen in prämaligen HPDE-Zellen zu induzieren und welche Faktoren dabei eine zentrale Rolle spielen.

Tatsächlich konnten die *in vitro* durchgeführten Versuche bestätigen, dass es vor allem aktivierte CD4+CD25- Tefs sind, die verstärkt EMT assoziierte Charakteristika in HPDE-Zellen hervorrufen. So zeigten HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Tefs morphologisch eine vergrößerte, spindelförmige Zellform, wiesen eine verstärkte Vimentin und L1CAM Expression sowie eine verminderte E-Cadherin Expression in der IZC- und durchflusszytometrischen Färbung auf. Mittels RT-PCR konnten diese Befunde bestätigt werden sowie eine Hochregulation EMT assoziierter Transkriptionsfaktoren wie Snail und ZEB-1 gezeigt werden. Damit Zellen invadieren können, müssen sie u.a. ihre Zell-Zell-Kontakte lösen, indem sie E-Cadherin herunterregulieren und die Fähigkeit zur Motilität durch die Expression mesenchymaler Proteine wie Vimentin erwerben [67]. Im Einklang mit den beschriebenen EMT Charakteristika wiesen die HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Tefs ein erhöhtes Invasionspotential im Boydenassay auf.

Diese Daten deuten auf eine neue Rolle von aktivierten CD4+ Tefs in der Induktion von EMT in Pankreasgangepithelien hin, das ursächlich für das erhöhte Invasionspotential der Zellen sein könnte.

Es konnten zwar auch EMT assoziierte Veränderungen in HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Tregs im Vergleich zu monokultivierten HPDE-Zellen beobachtet werden, doch waren diese wesentlich geringer ausgeprägt. Die Expressions- und Funktionsanalysen der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Tregs zeigten morphologisch vereinzelt spindelförmige Zellformen, in der RT-PCR war nur die Expression der Transkriptionsfaktoren Snail und ZEB-1 und minimal die Expression von Vimentin erhöht, während in der durchflusszytometrischen und IZC-Färbungen nur geringe Effekte auf die Vimentin und L1CAM Expression zu verzeichnen waren. Entsprechend zeigten die mit Tregs kokultivierten HPDE-Zellen auch kein erhöhtes Invasionspotential im Boydenassay.

Diese Befunde können darauf hinweisen, dass Tregs weniger eine Rolle bei der EMT Induktion in Pankreasgangepithelzellen spielen als Teffs. Allerdings muss auch berücksichtigt werden, dass die durchflusszytometrisch erfasste mindestens 70 %ige Reinheit der Tregs impliziert, dass in dieser Population auch andere CD4+ T-Zellen enthalten waren. Daher könnten die Effekte, die durch die Gegenwart dieser Zellen zu beobachten waren, ggf. durch nicht entfernte Teffs hervorgerufen worden sein.

In Bezug auf die hier angewendeten Invasionassays kamen die Befunde aus der Boydenkammer und dem xCELLigence nicht zu den gleichen Ergebnissen. Dies ist dem Prinzip der xCELLigence Methode zuzusprechen, durch die nicht das verminderte Adhärenzverhalten der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs als Störfaktor berücksichtigt wurde. Durch ein deutlich verringertes Anwachsen der HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Teffs waren insgesamt weniger Zellen in den Transwells, das sich in einem verminderten Invasionspotential im xCELLigence widerspiegelte. Dies war auch im Boydenkammer Assay zu beobachten, allerdings wird bei dieser Methode durch die Messung aller Zellen in einem zweiten Ansatz die relative Invasionsrate bestimmt und dabei Unterschiede im Adhärenzverhalten der unterschiedlich kultivierten HPDE-Zellen berücksichtigt. Ein weiterer Rückschluss, der durch diese Versuche gezogen werden kann, ist, dass Teffs demnach auch das Adhärenzverhalten der HPDE-Zellen beeinflussen. Dies könnte als Folge einer veränderten Adhärenzprotein Expression aus der Gruppe der Integrine zu erklären sein, über die sich Epithelzellen über Zell-Matrix Kontakte an der EZM, die in den Invasionsassays in reduzierter Form durch eine Kollagen I beschichtete Membran repräsentiert wurde, verankern. Die Integrin-Familie bildet eine große Gruppe aus verschiedenen zusammengesetzten Heterodimeren aus α - und β -Glycoproteinketten mit unterschiedlicher Affinität zu extrazellulären

Matrixproteinen wie Kollagen, Laminin und Fibronectin [107]. Sie tragen darüber hinaus durch intrazelluläre Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zur Invasivität mesenchymaler Zellen bei [108]. Da sie sowohl von mesenchymalen Zellen als auch Epithelien exprimiert werden, werden sie bis dato nicht als etablierte Marker zur Detektion einer EMT herangezogen [109]. Dennoch konnte im Zusammenhang mit einer onkogenen Transformation im Sinne einer EMT eine Änderung der α - β Komposition beobachtet werden, das zu einer Auflösung der Zell-Matrix Kontakte führte [110]. So können $\alpha 2\beta 1$ Integrine und $\alpha 3\beta 1$ Integrine über starke Affinität u.a. zu Kollagen I das Adhärenzverhalten stabilisieren und wirken der Krebsprogression und Metastasierung entgegen, während die Hochregulation von $\alpha 5\beta 1$ und $\beta 3$ Integrinen in Krebszellen beobachtet wurde, die eine EMT durchlaufen, was in einem verstärkten Invasionsvermögen resultiert [67,111,112]. So geben die Beobachtungen eines durch Teffs induzierten verminderten Adhärenzverhalten in HPDE-Zellen den Anreiz für Folgestudien, die sich auf die Charakterisierung der Integrin Expressionen in Pankreasgangepithelien innerhalb von CP und PDAC Geweben konzentrieren könnten. Dies könnte zum Ziel haben, bestimmten α - β Kompositionen eine Rolle in der EMT vermittelten Invasivität von Krebszellen im PDAC sowie Vorläuferzellen in der CP zuzusprechen und somit die Charakterisierung der EMT über Etablierung neuer EMT Marker zu erweitern.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten Charakterisierung von mono- und kokultivierten HPDE-Zellen darauf hin, dass HPDE-Zellen vornehmlich in Gegenwart von aktivierten Teffs und weniger Tregs eine EMT durchlaufen, was mit einem gesteigerten Invasionsvermögen einhergeht. Im Einklang mit den *in situ* durchgeführten Analysen weisen die Ergebnisse ferner darauf hin, dass es bereits im Rahmen einer chronischen Entzündung, in der solche CD4+ Teffs vorherrschen, zu einer EMT in pankreatischen Duktalzellen kommen kann. Dies untermauert die Theorie der inflammatorischen Karzinogenese mit einer CP als Präkanzerose für ein PDAC. Diese Theorie ließ sich bereits für Krebsentstehungen in anderen Organen z.B. in Hinblick auf die Barrett-Ösophagitis [113], den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [114], der chronischen Hepatitis [115] sowie der chronischen Gastritis durch *Helicobacter pylori* [116] bestätigen. So besagt die Theorie, dass durch die Persistenz eines Entzündungsreizes das Ziel einer akuten Entzündung, das Gewebe unversehrt wiederherzustellen (*Restitutio ad integrum*), nicht erreicht werden kann. Es kommt zu einer unkontrolliert, sich selbst unterhaltenden chronischen Entzündung, die sich als

eigene unheilbare Krankheit beschreiben lässt und über verschiedene Effekte die Krebsentstehung im umliegenden Gewebe fördern kann [117]. Infektionsbedingte chronische Entzündungen sind für die Entstehung von schätzungsweise 20 % der Krebserkrankungen ursächlich [118], woran Immunzellen, darunter CD4+ T-Zellen, durch Aktivierung, Steuerung und Aufrechterhaltung der Entzündung wesentlich beteiligt sein können. Neben ihrer Funktion bei der Modulation der Immunantwort generieren Immunzellen vereinfacht dargestellt ein komplexes Milieu aus Angiogenese- und Wachstumsfaktoren, die umliegende Zellen zur Hyperproliferation bewegen und somit das Risiko für Mutationen erhöhen [119,120]. Zusätzlich fördern sie durch den Entzündung assoziierten Metabolismus die Bildung von oxidativem Stress über reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite mit mutagener Wirkung [117] und schütten Zytokine aus, die das Erbmateriale umliegender, ortsständiger Parenchymzellen über epigenetische oder mutagene Effekte verändern können.

Um die Theorie der inflammatorischen Karzinogenese mit einer CP als Präkanzerose für ein PDAC fundierter zu belegen, bedarf es weiterer Untersuchungen. Für jedes Experiment wurde Blut eines neuen, gesunden Spenders zur Isolierung der CD4+ T-Zellen herangezogen, während die HPDE-Zellen immer der gleichen Zelllinie entstammten. Da die Befunde aus einer Zelllinie nur eine limitierte Generalisierung der Ergebnisse zulässt, ist geplant, die hier erfolgten Kokultivversuche mit aktivierten Teffs zum Nachweis EMT typischer Effekte mit einer weiteren Zelllinie der HPDE-Zellen durchzuführen.

Nach der Beantwortung der Frage, welche T-Zellpopulation vornehmlich für die EMT Veränderungen in den HPDE-Zellen verantwortlich ist, sollte ferner analysiert werden, über welche Zytokin vermittelten Effekte Teffs EMT Prozesse in den HPDE-Zellen induzieren können. Dafür wurden die Überstände der mono- und kokultivierten HPDE-Zellen mit aktivierten Teffs nach 72 Stunden auf ihr Zytokinprofil untersucht. Identifiziert wurden dabei erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- α unter Kokultur mit aktivierten Teffs, von denen IL-6 und TNF- α als EMT Induktoren bereits in Mamma- und Kolonkarzinomen sowie im PDAC beschrieben wurden [81,99,100]. Der Wachstumsfaktor TGF- β , der als starker Induktor der EMT bekannt ist und von immunsupprimierenden CD4+CD25-CD69+ T-Zellen und Tregs exprimiert und sezerniert wird, lag hierbei nicht erhöht vor.

IL-8 wurde bisher zwar nicht mit der Induktion einer EMT in Beziehung gebracht, doch gibt es Hinweise, dass IL-8 von geschädigten pankreatischen Epithelien innerhalb einer

chronisch obstruktiven Pankreatitis produziert wird [121] und dass erhöhte IL-8 Spiegel in Zusammenhang mit oxidativem Stress auftreten [122,123]. Dies könnte darauf hinweisen, dass die alleinige Präsenz von CD4+ Teffs in der Kokultur bereits einen Stressfaktor für die HPDE-Zellen darstellt mit Bildung reaktiver Metabolite, die eine Kaskade der Zellschädigung in Gang setzt, die bis zu einer erhöhten Apoptoseneigung der HPDE-Zellen führen könnte. Dazu belegen Daten eines M30 Apoptose Assays, mit dem die mono- und kokultivierten HPDE-Zellen auf ihre Apoptoseverhalten untersucht wurden, dass im Vergleich zu allen anderen Bedingungen HPDE-Zellen unter Kokultur mit aktivierten Teffs tatsächlich vermehrt in Apoptose gehen (unveröffentlichte Daten).

Veranlasst durch die Frage nach den ursächlichen Produzenten der erhöhten Spiegel von IL-6 und TNF- α unter HPDE-Zell-Kokultur mit aktivierten Teffs ergaben RT-PCR Analysen beider Zellpopulationen, dass TNF- α vornehmlich von Teffs und IL-6 vorwiegend von HPDE-Zellen produziert wird (unveröffentlichte Daten). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass nach jeder Kokultur eine Ablösung und Entfernung der T-Zellen erfolgte, wobei anschließend mikroskopisch kontrolliert wurde, ob die T-Zellen vollständig aus den Wells mit den HPDE-Zellen entfernt worden waren. Auffällig war, dass die Teffs im Allgemeinen schwieriger aus dem Well zu lösen waren als die Tregs. Damit ist also nicht auszuschließen, dass sich unter den untersuchten HPDE-Zellen noch vereinzelt Teffs befanden, die zu den erhöhten IL-6 RNA Level in den HPDE-Zellen beigetragen haben könnten.

Des Weiteren sollte in Kokulturversuchen untersucht werden, ob die durch aktivierte Teffs vermittelten EMT Effekte in den HPDE-Zellen durch Blockade von IL-6 und TNF- α reversibel sind, um deren Beteiligung als EMT Induktoren zu prüfen. Durch Blockade der Zytokine IL-6 und TNF- α konnten die EMT Veränderungen sowie das erhöhte Invasionsvermögen in den kokultivierten HPDE-Zellen partiell unterdrückt werden. Dies war besonders auffallend bei der Blockade von TNF- α zu beobachten, da hier die Hochregulierung von ZEB-1 und Vimentin, die E-Cadherin Herunterregulierung sowie der Erwerb einer spindelförmigen Zellform deutlich unterdrückt wurden sowie das durch die Teffs erhöhte Invasionsvermögen am deutlichsten reduziert werden konnte. Die unter diesen Bedingungen in den HPDE-Zellen erhöhte L1CAM Expression scheint hingegen nicht TNF- α induziert zu sein, da sich unter der Neutralisation sogar eine erhöhte Expression in den HPDE-Zellen nachweisen ließ. Dies steht im Einklang mit Studien, die belegen konnten, dass eine L1CAM Hochregulierung vornehmlich durch TGF- β induziert wird [83].

Interessant ist, dass die Anwesenheit von aktivierten Teffs zur Erhöhung der ZEB-1 Expression in HPDE-Zellen führte und sich unter Blockade von TNF- α keine erhöhte ZEB-1 Expression mehr darstellte, was impliziert, dass CD4+ Teffs EMT in HPDE-Zellen über TNF- α abhängige Induktion von ZEB-1 fördern. In ähnlicher Weise konnte Maier et al. zeigen, dass eine TNF- α abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Hochregulierung von ZEB-1 und Vimentin sowie zur Herunterregulierung von E-Cadherin in PDAC-Zellen führte. Ferner wurde die Annahme einer spindelförmigen Zellform beobachtet und die beschriebenen EMT assoziierten Effekte konnten ähnlich wie in dieser Arbeit unter Neutralisation von TNF- α unterdrückt werden. Zudem konnte auch eine TNF- α abhängiges erhöhtes Invasionsverhalten in den PDAC-Zellen unterdrückt werden [124]. Was Maier et al. für humane PDAC-Zellen beschreibt, konnte diese Arbeit hingegen schon für nicht maligne HPDE-Zellen zeigen und CD4+ Teffs als Induktoren dieser EMT Effekte charakterisieren. Dennoch sei hier erwähnt, dass auch andere Immunzellen, wie z.B. M1-Makrophagen im PDAC TNF- α produzieren können und darüber auch zur EMT in HPDE-Zellen bzw. PDAC-Zellen beitragen [30]. Im Gegensatz zu Maier et al. konnten Wang et al. für maligne Kolorektalepithelien zwar ebenfalls zeigen, dass diese Zellen unter TNF- α Stimulierung eine spindelförmige Zellform annehmen und E-Cadherin herunterregulieren, aber diese Veränderungen werden offenbar über den Transkriptionsfaktor Snail und nicht ZEB-1 reguliert [100]. Maier et al. untersuchten die Abhängigkeit der EMT zwar auch über TNF- α induziertes Snail, aber konnten keine so auffällige Abhängigkeit der EMT wie durch ZEB-1 feststellen. Ob Snail auch eine Rolle in der TNF- α vermittelten EMT in HPDE-Zellen spielt, kann nicht ausgeschlossen werden, da es in dieser Arbeit in den Expressionsanalysen der HPDE-Zellen unter TNF- α Blockade nicht untersucht wurde.

Die Untersuchungen ergeben zusammengefasst, dass der unter Kokultur mit CD4+ Teffs erhöhte TNF- α Spiegel zu einer ZEB-1 Hochregulierung in den HPDE-Zellen führte, was mit einer verminderten Expression von E-Cadherin und einer erhöhten Expression von Vimentin einhergeht. Diese EMT assoziierten Veränderungen gingen einher mit dem Erwerb einer spindelförmigen Zellform und einem erhöhten Invasionsvermögen von HPDE-Zellen. Dass Zellen, die noch keine komplette maligne Transformation erfahren haben, disseminieren können, ist beschrieben. So konnten Rhim et al. zeigen, dass es bereits zur Ausschwemmung pankreatischer Drüsenzellen ins periphere Blut bei Patienten mit zystischen Läsionen im Pankreas ohne Hinweis auf Malignität kommt [125]. Wird davon ausgegangen, dass TNF- α als Induktor für ein erhöhtes Invasionspotential fungiert, eröffnet sich die therapeutische Option, mit TNF- α Blockern

gezielt die EMT vermittelten Invasions- und Metastasierungsfähigkeiten im PDAC zu inhibieren bzw. zu reduzieren. Dieses konnte bereits in einem murinen PDAC Modell erfolgreich gezeigt werden. So konnten Egberts und al. eine verminderte Metastasenbildung durch die therapeutische Gabe der TNF- α Blocker Infliximab und Etanercept erzielen [126].

Der Nachweis einer Beteiligung von TNF- α an der Induktion einer EMT assoziierten Invasion *in vitro* und verstärkten Metastasenbildung *in vivo* sowie deren erfolgreiche Reduzierung durch Infliximab und Etanercept stellen einen erfolgsversprechenden neuen Ansatz in der Therapie des PDAC dar.

Auch unter der Blockade von IL-6 konnten EMT Veränderungen und das Invasionsvermögen der HPDE-Zellen unterdrückt werden, wenn auch nicht so deutlich, wie unter Blockade von TNF- α . Sullivan et al. konnten EMT assoziierte Veränderungen in humanen Brustkrebszellen durch IL-6 Induktion belegen. Dabei zeigten Krebszellen unter IL-6 Exposition eine Herunterregulierung von E-Cadherin, eine Heraufregulierung von Vimentin sowie ein verstärktes Invasionspotential [99]. In dieser Arbeit wurden ähnliche Ergebnisse IL-6 abhängiger EMT Ausprägungen bereits in benignen/prämalignen HPDE-Zellen beobachtet. Basierend auf den PCR Befunden, die darauf hinweisen, dass HPDE-Zellen vornehmlich IL-6 und CD4+ Teffs vornehmlich TNF- α produzieren und auf Studien, die eine TNF- α induzierte IL-6 Synthese in Krebszellen belegen konnten [127], lässt sich die Hypothese formulieren, dass die IL-6 Produktion in HPDE-Zellen durch die erhöhten TNF- α Spiegel induziert wird. Dafür sprechen Studien, die eine IL-6 Expression über NF- κ B-Aktivierung in Krebsgeweben postulieren [128,129] und eine TNF- α induzierte NF- κ B-Aktivierung vornehmlich für die Induktion einer EMT verantwortlich machen [124]. Ob TNF- α wirklich ursächlich für die erhöhten IL-6 Spiegel ist, soll in weiteren Versuchen geklärt werden, indem die Überstände von Kokulturen der HPDE-Zellen mit aktivierten Teffs unter TNF- α Blockade auf IL-6 untersucht werden.

Insgesamt untermauern die Ergebnisse eine Beteiligung von IL-6 an dem Erwerb eines mesenchymal invasiven Phänotyps. Analog hierzu konnten Goumas et al. ein vermindertes Tumorwachstum und eine geringere Metastasenbildung in einem orthotopen PDAC Mausmodell durch Hemmung von IL-6 mit Tocilizumab erzielen. IL-6 stellt somit ebenfalls ein vielversprechendes Zielmolekül in der Therapie des PDAC dar. Zusammenfassend betonen die Befunde dieser Arbeit die Wichtigkeit, sich neben den erkrankten Pankreaszellen auch mit dem Entzündungsinfiltrat des Tumors sowie der

chronischen Entzündung auseinander zu setzen, da entzündliche Prozesse als *enabling hallmarks of cancer* wesentlich an der Entstehung und Progression des PDAC beteiligt zu sein scheinen. So weist diese Arbeit auf eine neue, aber wesentliche Rolle von CD4+CD25- Tregs in der entzündungsinduzierten Entstehung Malignität typischer Eigenschaften von Pankreasgangepithelien innerhalb einer CP hin. *In situ* lässt sich dies ableiten von dem positiven Anfärben EMT assoziierter Marker in Gegenwart CD4+FoxP3- T-Zellen in CP Geweben und *in vitro* durch den Nachweis zahlreicher EMT Charakteristika sowie erhöhter Invasivität in HPDE-Zellen nach Kokultur mit aktivierten Tregs. Weiterhin festigen die Ergebnisse die Beteiligung der Zytokine IL-6 und TNF- α an dem Erwerb eines mesenchymalen Phänotyps mit resultierendem erhöhten Invasionspotential und lassen daher deren therapeutische Blockade schon in frühen Stadien der Tumorgenese sinnvoll erscheinen.

6. Zusammenfassung

Patienten mit einem duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) haben durch die späte klinische Erscheinung, die frühe Invasions- und Metastasierungsaktivität sowie dem geringen therapeutischen Ansprechen des Tumors nach wie vor eine infauste Prognose. Dies macht neue Ansätze zur Früherkennung bzw. Therapie dieser Erkrankung dringend erforderlich. Viele Studien konzentrieren sich hierbei auf die Charakterisierung des stark ausgeprägten desmoplastischen Stromas, da es zum Erwerb der *Hallmarks of cancer* führt und somit einen wesentlichen Beitrag an der Krebsentstehung und dessen Progression im PDAC leistet. Zu diesen Stroma induzierten *Hallmarks* zählt die früh auftretende Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) vermittelte Invasivität der PDAC-Zellen, die mit der erhöhten Metastasenbildung assoziiert ist.

Bereits für die Chronische Pankreatitis (CP), ein wesentlicher Risikofaktor des PDAC, ist ein desmoplastisches Stroma charakteristisch. Vorläuferläsionen und gesunde Gangepithelien sind in ein Entzündungsinfiltrat eingebettet, in dem CD4⁺ T-Zellen einen großen Anteil der Zellen ausmachen. Daher kann es schon früh zu einer möglichen Beeinflussung benigner/prämaligner Pankreasgangepithelien durch CD4⁺ T-Zellen kommen. Das Ziel dieser Arbeit war daher zu prüfen, ob CD4⁺ T-Zellen bereits im Pankreasgangepithel zum Erwerb Tumor assoziierter Eigenschaften in Form einer EMT beitragen und über welche Faktoren diese Effekte vermittelt werden.

Hierfür wurden humane CP Gewebeschnitte auf die Expression EMT charakteristischer Marker untersucht und geprüft, ob das Auftreten dieser Marker mit der Präsenz CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen (Tregs) korreliert. Zwar konnte keine statistisch signifikante Korrelation hergestellt werden, jedoch konnte vor allem in solchen Pankreasgangepithelien, die umgeben waren von einem Stroma mit CD4⁺ T-Zellen, eine partiell erhöhte Vimentin sowie erniedrigte E-Cadherin Expression detektiert werden. Um den Einfluss von CD4⁺ T-Zellen auf humane Pankreasgangepithel-Zellen (HPDE-Zellen) zu untersuchen, wurden CD4⁺CD25⁻ T-Effektorzellen (Teffs) und CD4⁺CD25⁺CD127⁻CD49d⁻ Tregs aus Blut gesunder Spender über eine negative magnetische Separation isoliert. Für die Kokultivversuche wurden HPDE-Zellen für 72 Stunden entweder alleine (Mono) oder zusammen mit Teffs oder Tregs kultiviert. Um den Aktivierungsstatus der T-Zelle zu berücksichtigen, wurden alle Ansätze in An- oder Abwesenheit von Antikörper gekoppelten Beads durchgeführt, die die Anwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen simulieren sollen. Die Befunde aus Expressions- und Funktionsanalysen der

HPDE-Zellen nach erfolgter Mono- und Kokultur weisen auf eine neue Rolle aktivierter CD4+CD25- Teffs als Induktoren einer EMT sowie eines erhöhten Invasionspotentials hin. So nehmen HPDE-Zellen vor allem in Gegenwart von aktivierten Teffs einen mesenchymalen Phänotyp an, der sich in Form einer spindelförmigen Zellform, einer erhöhten L1CAM und Vimentin sowie erniedrigten E-Cadherin Expression auf RNA- und Protein-Ebene präsentiert. Darüber hinaus konnte eine Erhöhung der EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren Snail und ZEB-1 nachgewiesen werden. Verstärkt wird diese These durch den Nachweis eines erhöhten Invasionspotentials der HPDE-Zellen, das ausschließlich nach Kokultur mit aktivierten Teffs beobachtet werden konnte. Über die Analyse der Überstände der Kokulturen von HPDE-Zellen und aktivierten Teffs konnten erhöhte Spiegel von IL-6, IL-8 und TNF- α identifiziert werden. Durch Blockade von IL-6 oder TNF- α während der Kokulturen mit aktivierten Teffs konnte eine partielle Reversion EMT assoziierter Charakteristika sowie ein statistisch signifikant reduziertes Invasionspotential in HPDE-Zellen erzielt werden. Eine TNF- α und IL-6 Abhängigkeit EMT typischer Charakteristika konnte ferner für den Erwerb einer spindelförmigen Zellform, der Hochregulierung der ZEB-1 und Vimentin Expression sowie der Herunterregulierung der E-Cadherin Expression demonstriert werden. Zudem scheint vor allem TNF- α an der Induktion eines erhöhten Invasionspotentials beteiligt zu sein.

Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Pankreasgangepithelien in Gegenwart von CD4+CD25- Teffs, wie sie in hohen Mengen während einer CP vorliegen, EMT assoziierte Veränderungen erfahren, die mit einem erhöhten Invasionspotential einhergehen. Weiterhin untermauern die Ergebnisse die Bedeutung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 für die Induktion einer EMT und den Erwerb invasiver Fähigkeiten, was die Möglichkeit einer therapeutischen Blockade von TNF- α und IL-6 zur Prävention bzw. Therapie einer frühen Invasivität und Metastasenbildung im PDAC eröffnet.

7. Literaturverzeichnis

1. Bundes-Gesundheitsberichterstattung (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010. 48-51 p.
2. Keleg S, Büchler P, Ludwig R, Büchler MW, Friess H (2003) Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2: 14.
3. Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJA, Falatko FC, Brune KA, et al. (2001) Increased Risk of Incident Pancreatic Cancer Among First-degree Relatives of Patients with Familial Pancreatic Cancer Increased Risk of Incident Pancreatic Cancer Among First-degree Relatives of Patients with Familial Pancreatic Cancer 1: 738–744.
4. Bansal P, Sonnenberg A (1995) Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology* 109: 247–251.
5. Lüllmann-Rauch R (2006) Histologie. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 402-407 p.
6. Han H, Von Hoff DD (2013) SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer Cell* 23: 424–424.e1.
7. Klöppel, Gunter; Heitz, Philipp U.; Perren A (2013) Tumors of the endocrine pancreas. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. Elsevier. pp. 1326–1342.
8. Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter a M, Klöppel G (2012) New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis. *Pathologie* 33 Suppl 2: 189–193.
9. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000) Progression Model for Pancreatic Cancer Progression Model for Pancreatic Cancer 1: 2969–2972.
10. Saavedra JA, Compton C, Ph D, Garrett ES, Goodman SN, et al. (2001) Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. 25: 579–586.
11. Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban R (2005) Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* 12: 81–91.
12. Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005) Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology* 128: 1606–1625.
13. Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M YS (2004) An Illustrated Consensus on the Classification of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28: 977–987.
14. Sipos, B., S. Frank, T. Gress, S. Hahn GK (2009) Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Revisited and Updated. *Pancreatology* 9: 45–54.

15. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, et al. (2003) Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 16: 902–912.
16. S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom (2013): 1–136.
17. Hiddemann W, Bartram C (2009) Pankreaskarzinom. Die Onkologie Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. Springer Verlag. p. 938.
18. Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, et al. (2007) Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer* 121: 699–705.
19. Hanahan D, Weinberg R a. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674.
20. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Aurelia Lugea, Gukovskaya A (2009) Desmoplasia of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11: 44–47.
21. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, et al. (2013) Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108: 914–923.
22. M. Erkan, C. Reiser-Erkan CWM, J. Kleeff (2010) Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Exp Oncol* 32: 128–131.
23. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, et al. (2012) EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148: 349–361.
24. Helm O, Mennrich R, Petrick D, Goebel L, Freitag-Wolf S, et al. (2014) Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 9.
25. Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, et al. (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128: 907–921.
26. Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon a C, Salter D, et al. (1999) Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* 5: 662–668.
27. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, et al. (2004) Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1beta. *Cancer Res* 64: 1331–1337.
28. Lunardi S, Muschel RJ, Brunner TB (2014) The stromal compartments in pancreatic cancer: Are there any therapeutic targets? *Cancer Lett* 343: 147–155.

-
29. Grage-Griebenow E, Schäfer H, Sebens S (2014) The fatal alliance of cancer and T cells: How pancreatic tumor cells gather immunosuppressive T cells. *Oncoimmunology* 3: e29382.
 30. Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, et al. (2014) Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* 135: 843–861.
 31. Bonde A-K, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA (2012) Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 12: 35.
 32. Lüttges J, Klöppel G (2005) Das lokale Pankreaskarzinom und seine Vorläufer. *Pathologe* 26: 12–17.
 33. Eleano Schober, Jesenofsky, Faissner, Weidenauer, Hagmann, Michl, Heuchel, Haas L (2014) Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 6: 2137–2154.
 34. Oettle H, Heinemann V, Herrmann R, Wörmann BJ (2010) *Onkopedia Leitlinie zum Pankreaskarzinom*. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Kapitel 5.1.8.6 Prognose.
 35. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler C, Friess H, et al. (2004) Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 91: 586–594.
 36. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A et al. (2013) Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine and Long-term Outcomes Among Patients With Resected Pancreatic Cancer: The CONKO-001 Randomized Trial. *JAMA* 310: 1473–1481.
 37. Ellermeier J (2013) *Immuntherapie des Pankreaskarzinoms: Mechanismen und Strategien zur Durchbrechung tumorinduzierter Immunsuppression*. [Dissertation], München.
 38. Keim V (2004) Pankreatitis: Von der chronischen Entzündung zum Karzinom. *Dtsch Medizinische Wochenschrift* 129: 94–95.
 39. Hoffmeister A, Mayerle J, Beglinger C, Büchler MW, Bufler P, et al. (2012) S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol* 50: 1176–1224.
 40. Härtwig SJ (2011) *Untersuchungen zum Krankheitsverlauf der chronischen Pankreatitis*. [Dissertation], Rostock.
 41. Stevens T, Conwell DL ZG (2004) Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol* 99: 2256–2270.
 42. Steele CW, Jamieson NB, Evans TRJ, McKay CJ, Sansom OJ, et al. (2013) Exploiting inflammation for therapeutic gain in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 108: 997–1003.

43. Baumgart M, Werther M, Bockholt A, Scheurer M, Ruschoff J, et al. (2010) Genomic instability at both the base pair level and the chromosomal level is detectable in earliest PanIN lesions in tissues of chronic pancreatitis. *Pancreas* 39: 1093–1103.
44. Etemad B, Whitcomb DC (2001) Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 120: 682–707.
45. Witt H (2013) Pathogenese der chronischen Pankreatitis. *Der Gastroenterol* 9: 6–13.
46. Ito T, Ishiguro H, Ohara H, Kamisawa T, Sakagami J, et al. (2016) Evidence-based clinical practice guidelines for chronic pancreatitis 2015. *J Gastroenterol* 51: 1–8.
47. Richter, A., Wendl, K., Post, S., Trede M (2000) Operationsindikationen bei chronischer Pankreatitis. *chir.praxis* 57: 47–56.
48. Mössner J, Keim V (2003) Therapie der chronischen Pankreatitis. *Internist* 44: 1515–1523.
49. Murphy KM, Travers P, Walport M (2009) *Janeway - Immunologie*. 7. Auflage. Berlin: Springer Spektrum.
50. Girardi M (2006) Immunosurveillance and immunoregulation by $\gamma\delta$ T cells. *J Investig Dermatology* 126: 25–31.
51. Murphy KM, Travers P, Walport M (2012) *Janeway's Immunobiology*. 8th editio. Science G, editor Taylor&Francis Group.
52. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom T, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
53. Raulf-Heimsoth M, Stock P (2008) T-Helferzellen und ihre Zytokine. *Allergo J* 17: 152–155.
54. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, et al. (2008) Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9: 1341–1346.
55. Trifari S, Kaplan C, Tran E, Crellin N, H. S (2009) Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10: 864–871.
56. Guery L, Hugues S (2015) Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int* 2015: 314620.
57. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, et al. (2014) Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. *Front Immunol* 5: 1–13.
58. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M TM (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151–1164.

-
59. Kmiecik M, Gowda M, Graham L, Godder K, Bear HD, et al. (2009) Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J Transl Med* 7: 89.
 60. Kleinewietfeld M, Starke M, Di Mitri D, Borsellino G, Battistini L, et al. (2009) CD49d provides access to “untouched” human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. *Blood* 113: 827–836.
 61. Sakaguchi S, Powrie F (2007) Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* (80-) 317: 627–629.
 62. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, et al. (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.
 63. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, et al. (2012) Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 41: 409–415.
 64. 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.
 65. Facciabene A, Motz GT, Coukos G (2012) T Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis. *Cancer Res* 72: 2162–2171.
 66. Wartenberg M, Zlobec I, Perren A, Koelzer VH, Gloor B, et al. (2015) Accumulation of FOXP3+T-cells in the tumor microenvironment is associated with an epithelial-mesenchymal-transition-type tumor budding phenotype and is an independent prognostic factor in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 6: 4190–4201.
 67. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442–454.
 68. Peinado H, Portillo F CA (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48: 365–375.
 69. Bornslaeger E a, Corcoran CM, Stappenbeck TS GK (1996) Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *J Cell Biol* 134: 985–1001.
 70. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G et al. (2008) Epithelial- mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 68: 989–997.
 71. Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 131–142.
 72. Ivaska J (2011) Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small GTPases* 2: 51–53.

-
73. Mendez MG, Kojima S-I, Goldman RD (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24: 1838–1851.
 74. Xu J, Lamouille S, Derynck R (2009) TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19: 156–172.
 75. Gurzu S, Turdean S, Kovacs A, Contac AO, Jung I (2015) Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World J Clin cases* 3: 393–404.
 76. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, et al. (2013) Increased expression of slug and vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 34: 2548–2557.
 77. Nieto MA (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 155–166.
 78. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, et al. (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161: 1881–1891.
 79. Böcker W, Denk H, Heitz PU., Moch H, Höfler G, et al. (2012) *Pathologie*. 5. Auflage. Urban & Fischer Verlag Elsevier GmbH.
 80. Talmadge J, Fidler I (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 70: 5649–5669.
 81. Dangi-Garimella S, Krantz SB, Shields MA, Grippo PJ, Munshi HG (2012) Epithelial - mesenchymal transition and pancreatic cancer. In: Grippo PJ, Munshi H, editor. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*.
 82. Maier HJ, Wirth T, Beug H (2010) Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma: 2058–2083.
 83. Geismann C, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, et al. (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.
 84. Struck B (2012) Die TGF- β 1-induzierte L1CAM-Expression in intestinalen Epithelzellen: Untersuchungen zu beteiligten Signalwegen und zellulären Auswirkungen [Dissertation] Kiel.
 85. Bergmann F, Wandschneider F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B et al. (2010) Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *EOncol Rep* 24: 909–915.
 86. Natalwala A, Spychal R, Tselepis C (2008) Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 14: 3792–3797.

-
87. Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265–273.
 88. Huber M a, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, et al. (2004) NF- κ B is essential for epithelial- mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114: 569–581.
 89. Huber MA, Kraut N, Beug H (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548–558.
 90. Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, et al. (2007) Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13: 4769–4776.
 91. Von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M et al. (2009) E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 137: 361–371.
 92. Yamazaki K, Masugi Y, Effendi K, Tsujikawa H, Hiraoka N, et al. (2014) Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest* 94: 683–691.
 93. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, Mcconkey DJ CW (2009) Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 69: 5820–5828.
 94. Schäfer H, Geismann C, Heneweer C, Egberts JH, Korniienko O, et al. (2012) Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. *Carcinogenesis* 33: 84–93.
 95. Mennrich R (2015) Vergleichende Analyse von regulatorischen T-Zellen und der duktaalen Expression von FoxP3 und L1CAM in der chronischen Pankreatitis und dem duktaalen Pankreasadenokarzinom sowie deren Korrelation mit der Überlebenszeit. [Dissertation], Kiel.
 96. Kalluri R, Weinberg R a (2009) Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428.
 97. Grage-Griebenow E, Jerg E, Gorys A, Wicklein D, Wesch D, et al. (2014) L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression. *Mol Oncol* 5: 982–997.
 98. Goebel L, Grage-Griebenow E, Gorys A, Helm O, Genrich G, et al. (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.
 99. Sullivan NJ, Sasser a K, Axel a E, Vesuna F, Raman V, et al. (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28: 2940–2947.

-
100. Wang H, Wang HS, Zhou BH, Li CL, Zhang F, et al. (2013) Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Induced by TNF- α Requires AKT/GSK-3 β -Mediated Stabilization of Snail in Colorectal Cancer. *PLoS One* 8: e56664.
 101. Hanahan D, Weinberg R a, Francisco S (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57–70.
 102. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, et al. (2008) Pancreatic stellate cells: Partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68: 2085–2093.
 103. Meng F, Li C, Li W, Gao Z, Guo K, et al. (2014) Interaction between pancreatic cancer cells and tumor-associated macrophages promotes the invasion of pancreatic cancer cells and the differentiation and migration of macrophages. *IUBMB Life* 66: 835–846.
 104. Gorys A (2016) Die Rolle von L1CAM bei der Anreicherung und Funktion von immunsuppressiven T-Zellen im duktalem Pankreasadenokarzinom. [Dissertation], Kiel.
 105. 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- β 1. *J Immunol* 182: 111–120.
 106. Weiping Zou; Nicholas P. Restifo (2010) T H 17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10: 248–256.
 107. Hynes RO (2002) Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110: 673–687.
 108. Huttenlocher A, Horwith AR (2011) Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
 109. Zeisberg M, Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119: 1429–1437.
 110. Madamanchi A, Zijlstra A, Zutter MM (2014) Flipping the Switch: Integrin Switching Provides Metastatic Competence. *Sci Signal* 7: pe9.
 111. Kim S, Kang HY, Nam EH, Choi MS, Zhao XF, et al. (2010) Tmprss4 induces invasion and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of integrin α 5 and its signaling pathways. *Carcinogenesis* 31: 597–606.
 112. Desgrosellier JS, Cherech D (2010) Integrins in cancer: biological implications in therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9–22.
 113. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012 10. 30 p.
 114. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012 10. 38 p.
 115. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2015) Krebs in Deutschland 2011/2012 10. 42 p.

-
116. Moss SF, Blaser MJ (2005) Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2: 90–97.
 117. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J (2006) Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 56: 69–83.
 118. Entzündung und Krebs (2014). Pressemitteilung, 98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. Jörg Maas, Generalsekretär der DGP. Berlin.
 119. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones P a, Henderson BE (1990) Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 50: 7415–7421.
 120. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860–867.
 121. Motoo Y, Xie M, Mouri H, Sawabu N (2004) Expression of Interleukin-8 in Human Obstructive Pancreatitis. *JOP* 5: 138–144.
 122. Verhasselt V, Goldman M, Willems F (1998) Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells. *Eur J Immunol* 28: 3886–3890.
 123. Paszti-Gere E, Csibrik-Nemeth E, Szeker K, Csizinsz R (2012) Acute Oxidative Stress Affects IL-8 and TNF- α Expression in IPEC-J2 Porcine Epithelial Cells. *Inflammation* 35: 994–1004.
 124. Maier HJ, Schmidt-Straßburger U, Huber MA, Wiedemann EM, Beug H, et al. (2010) NF- κ B promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett* 295: 214–228.
 125. Rhim AD, Thege FI, Santana SM, Lannin TB, Saha TN, et al. (2014) Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology* 146: 647–651.
 126. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, et al. (2008) Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68: 1443–1450.
 127. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, et al. (2010) Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation* 7.
 128. Yin Y, Si X, Gao Y, Gao L, Wang J (2013) The nuclear factor- κ B correlates with increased expression of interleukin-6 and promotes progression of gastric carcinoma. *Oncol Rep* 29: 34–38.
 129. Sheshadri N, Catanzaro JM, Bott AJ, Sun Y, Ullman E, et al. (2014) SCCA1/SerpinB3 promotes oncogenesis and epithelial-mesenchymal transition via the unfolded protein response and IL-6 signaling. *Cancer Res* 74: 6318–6329.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Formulierung des spannenden Dissertationsthemas und die intensive Betreuung. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft und Lehre, ihr Vertrauen in junge Wissenschaftler sowie ihre stets präsente fachliche Unterstützung haben mich während meiner Dissertation sehr motiviert.

Bedanken möchte ich mich auch herzlich bei Frau Dr. Evelin Grage-Griebenow, die mich zu Beginn meiner Laborarbeit betreute und mir somit die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten erleichterte.

Herrn Dr. Ole Helm gebührt ein besonderer Dank, der mir mit seiner fachlichen Kompetenz und seiner unerschöpflichen Geduld und Gelassenheit bei etlichen inhaltlichen und technischen Fragen zur Seite stand.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Inflammatorische Karzinogenese, besonders Dagmar Leisner und Lennart Lenk, danke ich für ihre Freundschaft, ihre fachliche Unterstützung und die unzähligen lustigen Momente innerhalb und außerhalb des Labors.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, Charlotte Wehr-Goebel und Christoph Goebel danke ich für ihre Liebe und Unterstützung während dieser und jeder anderen Zeit.

Allen voran danke ich meiner Mutter, die mich mit ihrem grenzenlosen Vertrauen stets ermutigt meinen eigenen Weg zu gehen.

Ich danke meinen Großeltern, Beate Goebel und Dr. Walther Goebel, meiner Patentante Karin Boerner-Jöckel sowie Dr. Thomas Schnug, die mich während des Studiums und meiner Dissertation sehr unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meinem Bruder, Jan-Christian Tobias Goebel, der mich immer wieder ermutigt aufzustehen, "meine Krone" zu richten und weiterzugehen.

Viele Menschen haben mich in den letzten 3 Jahren mit ihrer Freundschaft begleitet, denen ich an dieser Stelle dafür danken möchte. Hervorheben möchte ich Maren Pein, Marija Voloschina, Sophie Ebbecke und Daniela Debré.

Ganz besonders danke ich meinen ältesten und besten Freunden Christine Brodt und Lukas Jöckel für ihre liebevolle und humorvolle Begleitung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 3. August 1989
 Geburtsort: Bad Soden am Taunus, Deutschland

Ausbildung:

2008 – 2015 Abgeschlossenes Studium der Humanmedizin,
 Christian-Albrecht Universität, Kiel, Deutschland
 1999 – 2008 Gymnasium Melanchthon-Schule Steinatal, Hessen, Deutschland
 Abschluss Abitur

Medizinische Praktika:

16.8. – 5.9.15 **Dental Health Project**
 Zahnärztliche Vorsorge und Versorgung in Ladakh, Kashmir
 Projekt des Vereins KINDER des HIMALAYA e.v.

2014 – 2015 **PJ-Tertiale**
 Innere Medizin: 8 Wochen, Kardiologie, Chest Hospital, London, UK
 8 Wochen, Allg.-Innere Medizin, Queen Elizabeth
 Hospital, Blantyre, Malawi
 Pathologie 16 Wochen, LMU, München, D
 Chirurgie 16 Wochen, GK Havelhöhe, Berlin, D

2010 – 2012 **Famulaturen**
 Innere Medizin Franz Tappeiner, Meran, Italien
 Pathologie UKSH, Kiel, D
 Allgemeinmedizin Alma mater studiorum, Bologna, Italien
 Orthopädie Orthopädische Klinik, Hessisch Lichtenau, D

Medizinische Doktorarbeit:

02.2013 – 01.2016 AG Inflammatorische Karzinogenese am Institut für Experimentelle Medizin
 (ab 1.10.2015 Institut für Experimentelle Tumorforschung) mit dem Thema:
 "Einfluss verschiedener CD4+ T-Zellpopulationen auf die Epitheliale-
 Mesenchymale-Transition (EMT) von Pankreasgangepithelzellen"
 Christian-Albrecht Universität, Kiel, Prof. Dr. Susanne Sebens

Auszeichnung:

11.07.2015 Förderpreis der Stiftung zur Förderung der Medizinischen Forschung,
 Christian-Albrecht Universität, Kiel

Publikationsverzeichnis

Publikationen:

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

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" *OncolImmunology* 04/2015; 4(4):e1000083-1.

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

"L1CAM promotes enrichment of immunosuppressive T cells in human pancreatic cancer correlating with malignant progression" *Molecular Oncology* 07/2014; 8(5).

Helm O, Mennrich R, Petrick D, **Goebel L**, Freitag-Wolf S, Röder C, Kalthoff H, Röcken C, Sipos B, Kabelitz D, Schäfer H, Oberg HH, Wesch D, Sebens S

"Comparative characterization of stroma cells and ductal epithelium in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma" *PLoS ONE* 05/2014; 9(5):e94357.

Zitabler Abstract:

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

Vorgestellt auf dem 31. Deutschen Krebskongress 2014 in Berlin.

Tagungsbeitrag:

Grage-Griebenow E, **Goebel L**, Gorys A, Helm O, Mennrich R, Freitag-Wolf S, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S

Kongressteilnahme und –Vortrag: "Regulatory T-cells as well as CD4+ effector cells mediate epithelial-mesenchymal-transition in pancreatic ductal epithelial cells"

36th Symposium of the North German Immunologists 2013 in Borstel