

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. Irene Esposito

**Immunologisches Mikromilieu des duktales
Adenokarzinoms des Pankreas und seiner
Vorläuferläsionen im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Carolin Maria Magdalena Müller

(2026)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Irene Esposito

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Für meine Familie

Zusammenfassung (deutsch)

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist derzeit eine der tödlichsten Krebsarten mit steigender Inzidenz. Bisher ist bekannt, dass die Immunmikroumgebung (immune microenvironment, iME) eine zentrale Rolle im biologischen Verhalten vom PDAC spielt. In diesem Zusammenhang ist eine eingehende Charakterisierung des iME des PDAC und seiner Vorläuferläsionen relevant.

Ziel dieser Arbeit war es, frühe Veränderungen zu identifizieren, welche die Tumorgenese der Bauchspeicheldrüse beeinflussen könnten, wozu die iME von normalem Pankreasgewebe, der azinär-duktalen-Metaplasie (ADM), von intraepithelialen Pankreasneoplasien (PanIN) und PDAC im $p48Cre^{tg/+}; LSL-Kras^{G12D/+}$ (KC)- und $p48Cre^{tg/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; p53^{flx/flx}$ (KPC)-Mausmodell ausführlich charakterisiert wurde.

Tissue Microarrays (TMAs) basierend auf einem Kollektiv von 41 transgenen Mäusen wurden konstruiert. Die TMAs umfassten 140 Gewebestanzungen aus normalem Pankreasgewebe, Vorläuferläsionen wie PanIN ($n=31$) und ADM ($n=21$) sowie PDAC ($n=70$). Eine Tyramid-basierte Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung wurde angewendet, um Immunzellen unter Verwendung verschiedener Zellmarker (CD3, CD4, CD8a, FoxP3, PD-1, CD19, F4/80, CD163, Tryptase und Granzym B) gleichzeitig auf einem Objektträger zu identifizieren. Mithilfe der ImageJ/FIJI-Software wurden die verschiedenen Zelltypen quantifiziert und anschließend auf alle DAPI⁺-Zellen (Gesamtzahl aller kernhaltigen Zellen) und die Gesamtfläche des untersuchten Gewebes normalisiert. Dies wurde durch die Entwicklung von Makros automatisiert und standardisiert. Die Daten wurden statistisch analysiert (*Kruskal-Wallis*-Test, gefolgt von *Dunn-Bonferroni*-Post-hoc-Vergleich).

Immunzellen wurden hauptsächlich im Stroma um die Läsionen herum gefunden. Die Menge an Immunzellen war generell höher in PanIN und PDAC im Vergleich zu Normalgewebe und teilweise auch zu ADM. PanIN zeigten im Vergleich zu ADM eine signifikant höhere Anzahl von CD19⁺-B-Zellen ($p = 0,026$). Im PDAC waren Zellen der angeborenen Immunantwort, wie F4/80⁺-Makrophagen ($p = 0,012$) und Tryptase⁺-Mastzellen ($p = 0,001$), in signifikant höherer Menge vorhanden als in ADM, insbesondere in der Tumorperipherie. Darüber hinaus zeigten PDAC-Proben eine immunsuppressive Mikroumgebung, die durch eine Tendenz zu einer erhöhten Anzahl regulatorischer T-Zellen gekennzeichnet war.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das iME während der Pankreastumorgenese bei Mäusen ein dynamischer und heterogener Prozess zwischen verschiedenen Vorläuferläsionen ist, was auf eine aktive Rolle des iME bei der PDAC-Progression hindeutet.

Abstract (englisch)

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is currently one of the deadliest cancers with a rising incidence. So far it is known that the immune microenvironment (iME) plays a pivotal role in the biological behavior of PDAC. In this context, an in-depth characterization of the iME of its precursor lesions is relevant.

We aimed to identify early changes that could influence pancreatic tumorigenesis by characterizing the iME of normal pancreas tissue, acinar-to-ductal metaplasia (ADM), pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and PDAC in the p48Cre^{tg/+}; LSL-Kras^{G12D/+} (KC) und p48Cre^{tg/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; p53^{flox/flox} (KPC) mouse models.

Tissue Microarrays (TMAs) based on a collective of 41 transgenic mice were constructed. The TMAs included 140 tissue cores of normal pancreas tissue, precursor lesions such as PanIN (n=31) and ADM (n=21), as well as PDAC (n=70). Tyramide-based multiplex immunofluorescence staining was applied to identify immune cells using different cell markers (CD3, CD4, CD8a, FoxP3, PD-1, CD19, F4/80, CD163, Tryptase and Granzyme B) simultaneously on one slide. By using ImageJ/FIJI software, we counted positive cells, normalized to DAPI+ cells (all cells) and the total area of the lesion. We automatized and standardized cell counting as well as area calculation by developing macros. Data were analyzed statistically (Kruskal-Wallis test followed by Dunn-Bonferroni post-hoc comparison).

Immune cells were mostly found in the stroma around the lesions. The number of immune cells was generally higher in PanIN and PDAC tissue compared to normal tissue and also partially to ADM. PanIN displayed significantly higher numbers of CD19⁺ B cells compared to ADM ($p = 0.026$). In PDAC, cells of the innate immune response, such as F4/80⁺ macrophages ($p = 0.012$) and tryptase⁺ mast cells ($p = 0.001$), were present in significantly higher amount than in ADM, especially in the tumor periphery. In addition, PDAC samples displayed an immunosuppressive microenvironment, characterized by a tendency towards increased numbers of regulatory T cells.

To summarize, our results show that the iME during pancreatic tumorigenesis in mice is a dynamic and heterogeneous process among different precursor lesions, suggesting an active role of the iME in PDAC progression.

Abkürzungsverzeichnis

A

ADM Azinär-duktales Metaplasie
Asp Aspartat

B

BRAF *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

C

CAF *Cancer-associated fibroblasts*
CAi *Center for Advanced Imaging*
CDKN2A *Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A*
CTL *Cytotoxic T lymphocytes*

D

DAB 3,3'-Diaminobenzidin
DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC *Dendritic cell*

E

ERCP Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EZM Extrazellulärmatrix, *Extrazelluläre Matrix*

F

FAMMM Familiäres atypische multiple Muttermal- und Melanom Syndrom
FFPE Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FoxP3 *Forkhead Box P3*
FPALM *Photoactivated Localization Microscopy*

G

GEMM *Genetically engineered mouse model*
Gly Glycin

H

HE Hämatoxylin-Eosin
HRP *Horseradish peroxidase*
HyD Hybriddetektor

I

IHC Immunhistochemie
iME *Immune Microenvironment*
IRF4 Interferon-Regulationsfaktor 4

K

KRAS *Kirsten rat sarcoma virus*

L

LANUV Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz

M

MC Mastzellen
MHC *Major Histocompatibility Complex*
MRT Magnetresonanztomographie

P

PanIN Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PD-1 Programmierter-Zelltod-1
PDAC Duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse
PD-L Programmierter Todesligand
POSTN Periostin
PSC *Pancreatic stellate cells*

S

SMAD4 *Mothers against decapentaplgic homolog 4*
STED *Stimulated Emission Depletion*

T

TH-Zellen Helfer-T-Zellen
TIL Tumorerinfiltrierende Lymphozyten
TLS Tertiär lymphoide Strukturen
TMA *Tissue Microarray*
TME *Tumor microenvironment*
TNC Tenascin C
TP53 Tumorsuppressorprotein 53
Tregs Regulatorische T Zellen
TSA *Tyramide signaling amplification*

V

Val Valin

W

WLL Weißlichtlaser

Z

ZETT Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	11
1.1	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	11
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie des Pankreaskarzinoms	11
1.1.2	Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms	11
1.2	Pathologie.....	13
1.2.1	Duktales Adenokarzinom	13
1.2.2	Vorläuferläsionen des PDAC.....	15
1.2.3	Pathogenese und Molekulargenetik der Tumorgenese	19
1.2.4	Tumormikromilieu	20
1.3	Fragestellung und Ziele	27
2	Mausmodelle, Material und Methoden	28
2.1	Mausmodell und Kollektiv	28
2.2	Material	29
2.2.1	Laborequipment.....	29
2.2.2	Reagenzien	29
2.2.3	Puffer	30
2.2.4	Antikörper.....	30
2.2.5	IHC Detektions-Kits.....	30
2.2.6	Multiplex IHC Kit	31
2.2.7	Mikroskop.....	31
2.2.8	Software	31
2.3	Methoden	32
2.3.1	Gewebeblöcke und Biobank.....	32
2.3.2	Histologie	32
2.3.3	Pathologische Beurteilung.....	33
2.3.4	Tissue Microarray	33
2.3.5	Immunhistochemie und Etablierung der Primär-Antikörper.....	34
2.3.6	Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung	35
2.3.7	Leica TCS SP8 STED 3X Mikroskop	37
2.3.8	Quantifizierung.....	38
2.3.9	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Etablierung der Antikörper	40
3.2	Deskriptive Analyse des Kollektivs	41
3.2.1	Immunzellen des angeborenen Immunsystems	43

3.2.2	Erworbenes Immunsystem	45
3.3	Einflussfaktoren auf Zusammensetzung des iME	49
4	Diskussion	53
4.1	Die Rolle des Immun-Mikromilieus im Laufe der Tumorgenese	53
4.1.1	Verteilung der B- und T-Zellen in Vorläuferläsionen des dukta- Pankreaskarzinoms	54
4.1.2	Verteilung der Makrophagen in Vorläuferläsionen des dukta- Pankreaskarzinoms	55
4.1.3	Einfluss des genetischen Hintergrundes auf das Immunmikromilieu der Vorläuferläsionen des dukta- Pankreaskarzinoms	56
4.2	Übertragbarkeit auf humane Pankreaskarzinome und Anwendbarkeit im Klinikalltag	57
4.3	Limitationen und Herausforderungen der Studie	59
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	62
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	64
6	Tabellenverzeichnis	77
7	Abbildungsverzeichnis	78
8	Anhang	81
8.1	Opal Multiplex-Immunfluoreszenz Protokoll	81
8.2	Repräsentativer Auszug der Macro-Auswertung mit ImageJ für den Marker FoxP3	82

1 Einleitung

1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Pankreaskarzinoms

Das duktale Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (Engl.: *pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) zählt zu den hochletalen malignen Tumoren. Aufgrund seiner späten Diagnosestellung und limitierten therapeutischen Optionen liegt das 5-Jahresüberleben bei ca. 13 % [1, 2]. Damit zählt das PDAC zu den 4 tödlichsten Tumorarten weltweit [3].

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 15.000 Menschen am PDAC. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen, obwohl es geographische Unterschiede in Europa zu verzeichnen gibt. Die meisten Betroffenen erkranken im höheren Lebensalter: Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 72, für Frauen bei 75 Jahren. Die Inzidenz ist steigend. Nach dem Kolon- und Magenkarzinomen zählt das PDAC zu den dritthäufigsten Tumoren des Verdauungstraktes [1, 4, 5].

Obwohl es zahlreiche Studien zur Ätiologie des PDACs gibt, bleibt die Ursache häufig unbekannt. Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines PDACs zählen Rauchen (30 %), Adipositas ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$), hoher Alkoholkonsum, chronische Pankreatitis, zystische Neoplasien des Pankreas, langjähriger Diabetes Mellitus Typ 2 sowie die berufliche Exposition gegenüber Insektiziden, Herbiziden und Fungiziden (Pestiziden). Rauchen ist der epidemiologisch am besten belegte Risikofaktor [6-13]. Hereditäre Syndrome führen zu einem erhöhten Risiko für Pankreaskarzinome. Dazu zählen unter anderem das Peutz-Jeghers-Syndrom mit einem Lebenszeitrisko für Pankreaskarzinom von ca. 40 %, die hereditäre Pankreatitis, das familiäre Pankreaskarzinom, das FAMMM- und Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom sowie das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom [14].

1.1.2 Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms

Das klinische Bild ist vielfältig und oft unspezifisch. Zu den möglichen Symptomen zählen unter anderem Oberbauchschmerzen, ein schmerzloser Ikterus, Übelkeit, Gewichtsverlust und Schwäche. Da es keine Frühsymptome gibt, erfolgt die Diagnosestellung spät.

Zu den klassischen, primär durchzuführenden bildgebenden Verfahren zur Diagnostik zählen die Abdomensonographie, das Multidetektor-Computertomographie sowie die Endosonographie. Zusätzlich hilfreich ist die Magnetresonanztomographie (MRT), endoskopisch-retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) zur präoperativen Ausbreitungsdiagnostik. Die Resektabilität sowie die Fernmetastasierung des Tumors gilt es vor Durchführung einer Tumorkonferenz zu klären. Im Blut können Tumormarker als Verlaufskontrolle herangezogen werden. Zu den bedeutsamsten Tumormarkern zählen CA19-9 und CEA. Fakultativ kann zusätzlich eine Lipase-Erhöhung bei Begleitpankreatitis vorliegen. Die endosonographisch gesteuerte Feinnadelpunktion zur Biopsieentnahme muss dann durchgeführt werden, wenn es differentialdiagnostische Hinweise gibt, die das Vorgehen ändern würden, wie z. B. Metastasenverdacht bei einem anderen Malignom in der Vorgeschichte [15].

Eine Screening-Methode für das Pankreaskarzinom steht derzeit nicht zur Verfügung. Bisher eingesetzte Methoden wie CA19-9-Messungen im Serum oder andere diagnostische Mittel wie die Abdomensonographie konnten bisher die krebsspezifische Mortalität nicht senken [16]. Aufgrund des vermehrten Einsatzes bildgebender Diagnostik insgesamt nimmt die Anzahl inzidentell entdeckter Pankreastumoren zu. Dabei handelt es sich vor allem um prinzipiell gutartige zystische Befunde wie das seröses Zystadenom und Pseudozysten. Die Abgrenzung dieser von präkanzerösen zystischen Läsionen ist von entscheidender prognostischer Bedeutung in der Diagnostik [17]. Die Nationale Fallsammlung Familiäres Pankreaskarzinom empfiehlt jährliche Untersuchungen für genetisch vorbelastete Personen. Es wurde dafür jedoch bisher keine spezifische Untersuchungsmethode festgelegt [18, 19].

Die einzige kurative Option stellt eine radikale Operation mit dem Ziel der R0-Resektion dar. Die partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pyloruserhalt nach *Traverso-Longmire* stellt bei Patienten mit Pankreaskopftumoren die Methode der Wahl dar. Ist es bereits zu einer Infiltration des Bulbus duodeni bzw. zu einem Wachstum Richtung Pylorus gekommen, wird eine partielle Duodenopankreatektomie („*Whipple-OP*“) empfohlen.

Karzinome des Pankreasschwanzes werden operativ mittels Pankreaslinksresektion mit Splenektomie, Pankreaskorpuskarzinome ggf. durch eine totale Duodenopankreatektomie in kurativem Ansatz versorgt [15].

Zur Vermeidung von Rezidiven oder einer Fernmetastasierung wird in der aktuellen S3-Leitlinie [15] eine adjuvante Therapie empfohlen. In der Erstlinientherapie des

fortgeschrittenen oder metastasierten Pankreaskarzinoms können verschiedene Chemotherapieregime eingesetzt werden. Dazu gehören Kombinationsregime wie mFOLFIRINOX, eine Monotherapie mit Gemcitabin, Gemcitabin + Capecitabin oder Gemcitabin + nab-Paclitaxel (Engl.: *nanoparticle albumin bound paclitaxel*) [20]. mFOLFIRINOX zählt zu den Polychemotherapieregimen bestehend aus Folinsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin. Im palliativen Setting ist der frühzeitige Zugang zu supportiven Behandlungsoptionen von Bedeutung [21]. In Studien wie bspw. von *Conroy et al.* konnte gezeigt werden, dass Kombinationschemotherapieregime das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit metastasiertem PDAC nahezu verdoppeln verglichen mit der Gemcitabin-Monotherapie [22]. Bisher konnte keine eindeutige Wirkung der Immuntherapien bei Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden, während diese neuartigen Immuntherapien einen großen Wandel des Therapieregimes bei Malignem Melanom oder Bronchialkarzinomen erbringen konnten [23]. Lediglich bei der sehr kleinen Gruppe der PDAC mit einer Mismatch-Reparatur-Defizienz bzw. hoher Mikrosatelliteninstabilität (1 – 2 % der Pankreaskarzinome) finden Checkpoint-Inhibitoren Anwendung [24, 25]. Die Bestimmung dieser Parameter ist daher obligat zur Therapieinitiierung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren.

Das PDAC ist mit einer hohen Letalität assoziiert und belegt den vierten Platz der Krebstodesursachen [4]. Nur bei ca. 15 % der Patienten kann das PDAC radikal (R0) reseziert werden. Aktuell beträgt die 5-Jahresüberlebensrate ca. 13 % und bis 40 % bei Resektion im Stadium IA. Bei Lymphknotenbefall sinkt die Prognose. Somit ist ein Langzeitüberleben äußerst selten. Bei hereditären Syndromen sind regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen und Familienuntersuchungen wichtig. Auch die Überwachung und ggf. Resektion zystischer Neoplasien hat einen hohen Stellenwert [15].

1.2 Pathologie

1.2.1 Duktales Adenokarzinom

Das PDAC ist zumeist im Pankreaskopf lokalisiert (70 %); es entspringt dem exokrinen Kompartiment des Organs (siehe Abbildung 1). Er stenosierte durch seine Lage häufig den intrapankreatischen Gallengang sowie den distalen Pankreasgang. Der Tumor

wächst früh in das dorsale peripankreatische Fettgewebe entlang der Nerven ein, ummauert die Mesenterialgefäße und bricht häufig in diese ein. Der Tumor wird von einer Stromareaktion begleitet, die als Desmoplasie bezeichnet wird. Das prominente Stroma kann bis zu 90 % des Tumorgewebes ausmachen und wird charakterisiert durch Vermehrung von Proteinen der extrazellulären Matrix (Typ-I-Kollagen und Glykoproteine), Proliferation tumor-assoziiierter fibroblastärer Zellen, Neoangiogenese, und Immunzellinfiltration [26]. Im Verlauf breiten sich die Tumorzellen durch direkte Infiltration aus, jedoch ebenso frühzeitig lymphogen und perineural im retroperitonealen Fettgewebe. Die ersten Metastasen finden sich meist in den drainierenden Lymphknoten. Betroffen sind auch die anderen Organe zum Teil durch direkte Infiltration (z.B. Magen, Darm, Nebennieren bei Pankreascorpus-/schwanzkarziomen), zum Teil durch Metastasierung des Tumors (Leber, Lunge, Peritoneum und Wirbelsäule).

GEMM (Engl.: *Genetically engineered mouse models*) können zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der PDAC-Tumorentstehung genutzt werden. Im Mausmodell von *Hingorani et al.* (LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre) [27] können häufig im Alter von 10 Wochen lokal invasive PDAC nachgewiesen werden. Im sehr frühen Alter (4 – 6 Wochen) seien nur vereinzelt PanIN-Läsionen im Frühstadium beobachtet worden. Das murine PDAC ist wie das humane PDAC von einer dichten desmoplastischen Reaktion begleitet. Zu diesem Zeitpunkt zeigt die Mehrheit der Mäuse Anzeichen für eine Tumorentwicklung und eine Gallengangsobstruktion, die durch abdominale Ultraschalluntersuchungen festgestellt werden können. Mit dem Fortschreiten der Krankheit können die Mäuse auch Kachexie mit Gewichtsverlust, Ikterus, und malignen Aszites aufgrund der peritonealen Ausbreitung der Krankheit entwickeln. Darüber hinaus können PDAC, die in GEMM entstehen, in mehrere Organe metastasieren, darunter Lymphknoten, Leber, Lunge, Zwerchfell und Nebennieren [27].

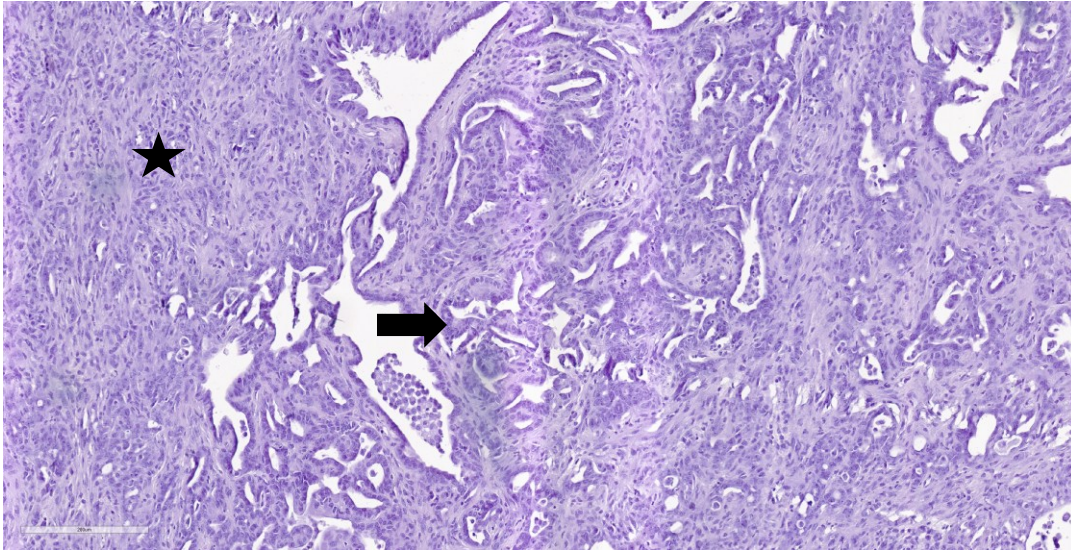


Abbildung 1: Histologie des PDAC mit ausgeprägter desmoplastischer Stromareaktion einer KPC-Maus: Das Tumorgewebe zeigt irreguläre drüsig wachsende epitheliale Strukturen (exemplarisch: Pfeil), die vergrößerte pleomorphe Zellkerne aufweisen. Die atypischen Drüsenkomplexe sind eingebettet in ein zellreiches desmoplastisches Stroma (exemplarisch: Stern), teilweise mit Immunzellinfiltrat. HE-Färbung, Vergrößerung 20x.

1.2.2 Vorläuferläsionen des PDAC

Das exokrine Pankreaskarzinom entsteht mehrheitlich aus pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN, Pancreatic Intraepithelial Neoplasia). Basierend auf der Adenom-Karzinom-Sequenz geht man von einer fortschreitenden Entwicklung und Kanzerogenese aus. Eine Sonderform bilden die *Acinar-to-Ductal* Metaplasien (ADM). Neben den in dieser Arbeit untersuchten Läsionen seien zur Vollständigkeit auch die intraductalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) sowie die muzinösen zystischen Neoplasien (MCN) erwähnt [28], die klinisch relevante zystische Pankreasneoplasien darstellen, jedoch nicht Gegenstand der weiteren Analysen dieser Dissertation sind.

1.2.2.1 Azinär-duktales Metaplasie

Die Transdifferenzierung der Azinuszellen in duktales Pankreaszellen stellt eine Anpassung an die sich verändernde Umgebung dar. Stimuli für diese Umwandlung können Gewebsschäden, Inflammation oder Zellstress der Makro- und Mikroumgebung sein [29, 30]. ADM sind potenziell in der Lage bei eben diesem Zellstress und onkogenen *KRAS*-Aktivierungen (Eng.: *Kirsten rat sarcoma virus*) weiter in PanIN überzugehen. Diese Aussage bleibt bisher hypothetisch und konnte in GEMM und in vitro 3D-Zellkulturen mit primären Azinuszellen von Mäusen und Menschen

beobachtet werden. Dies wird als ein möglicher initialer Schritt der PDAC-Entwicklung angesehen [31]. ADM stellen somit eine mögliche Präkanzerose dar und werden häufig bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und Pankreasneoplasien beobachtet. Sie sind rein mikroskopische Läsionen, die mit makroskopisch erkennbarer Fibrose assoziiert sein können [32]. Im Mausmodell für Pankreaskarzinome konnte gezeigt werden, dass azinäre Zellen der Ursprung der Pankreasneoplasien sein können [33]. Abbildung 2 zeigt exemplarische ADM-Läsionen.

Mikroskopisch kann eine Abflachung der Azinuszellen beobachtet werden. Im Verlauf entwickeln sich tubuläre Strukturen mit atrophischem, fibrotischem und entzündlichem Gewebe in der Umgebung.

ADM sind asymptomatisch. Zugrundeliegende chronisch-entzündliche Veränderungen können jedoch potenziell Symptome hervorrufen. Aktuell gibt es keine Hinweise, dass ADM Einfluss nehmen auf das Outcome der Patienten [34].

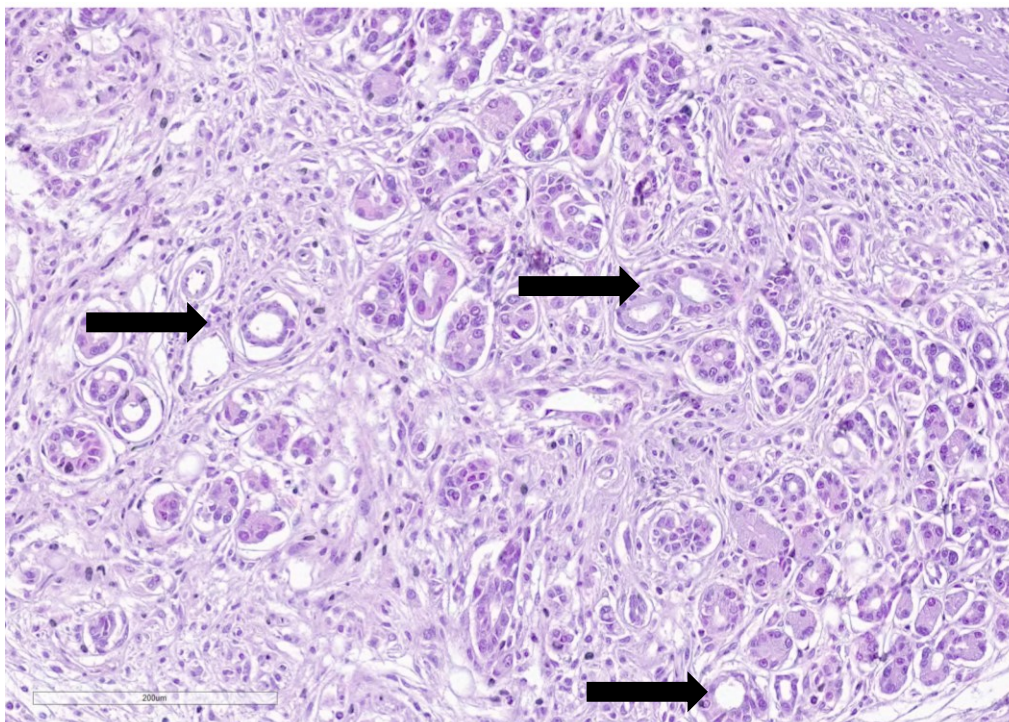


Abbildung 2: Histologie einer ADM-Läsion einer KPC-Maus: Das azinäre Pankreasparenchym zeigt eine deutliche Atrophie mit Übergang der typischen azinären Morphologie hin zur Ausbildung tubulärer Strukturen mit Auskleidung durch ein duktal imponierendes Epithel (exemplarisch: Pfeile). Umgebend aktiviertes Stroma mit vereinzelt Immunzellen. HE-Färbung, Vergrößerung 20x.

1.2.2.2 Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien (PanIN)

Definitionsgemäß sind PanIN mikroskopisch flache oder papilläre, nichtinvasive epitheliale Neoplasien mit einem dukalen Phänotyp (siehe Abbildung 3). Die Zellen der PanIN sind kubisch bis zylindrisch und weisen unterschiedliche Mengen an Muzin sowie eine unterschiedliche Ausprägung an zytologischen und architektonischen Atypien auf. PanIN haben definitionsgemäß einen Durchmesser von < 5 mm. Zu den möglichen Zellatypien zählen polymorphe Zellkerne, ein erhöhtes Kern-Plasma Verhältnis, Verlust der Zellpolarität sowie atypische oder gehäufte Mitosen [28]. Die Ursprungszelle der PanIN-Läsionen konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, jedoch sind Zusammenhänge mit ADM beschrieben in Mausmodellen [35] sowie beim Menschen [36-38]. PanIN werden auf Basis ihres Dysplasie-Grades in Low- und High-grade-Läsionen unterteilt. Die präneoplastischen Gangläsionen wurden initial mit jeweils steigendem Dysplasiegrad in drei Stufen eingeteilt (PanIN-1A, -1B, -2 und -3), die laut Progressionsmodell ineinander übergehen können; dieses dreigliedrige System für die Einteilung der PanIN wurde jedoch zugunsten des zweigliedrigen Systems mit Einteilung in low-grade und high-grade PanIN verlassen. Low-Grade-PanIN werden häufig auch in Pankreasgewebe von Menschen ohne Vorliegen eines PDAC detektiert. High-Grade-PanIN werden dahingegen hauptsächlich in Pankreasgewebe von Patienten mit PDAC nachgewiesen [39, 40].

Klinisch können keine spezifischen Symptome mit PanIN assoziiert werden. Aufgrund der Größe der Läsionen ist eine Detektion durch bildgebende Verfahren nicht möglich [41]. Aufgrund der fehlenden Biopsiemöglichkeiten sind Aussagen über den Progress im Menschen schwierig und limitiert. Höhergradige PanIN werden vermehrt im Pankreaskopf lokalisiert [42]. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter [42].

Genetisch unterscheiden sich Low-Grade-PanIN von High-Grade-PanIN. Während in Low-Grade-PanIN vorzugsweise (> 90 %) *KRAS*-Mutationen nachgewiesen werden können, weisen High-Grade-PanIN in seltenen Fällen auch Alterationen des *CDKN2A* Gens auf. In sehr seltenen Fällen können auch Mutationen im *TP53* auftreten [31, 43, 44].

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und Tumprogression haben sich GEMM als besonders wertvoll erwiesen. Insbesondere die Einführung aktivierender Mutationen im *Kras*-Onkogen in pankreasspezifischen Cre-Driver-Linien wie Pdx1-Cre oder Ptf1a-Cre führt in Mäusen reproduzierbar zur

Ausbildung von PanIN-Läsionen. Durch die zusätzliche Kombination mit Mutationen in Tumorsuppressorgenen konnte gezeigt werden, dass PanIN-Läsionen im Mausmodell in invasive Karzinome übergehen. Im Mausmodell von *Hingorani et al.* (LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre) können neben ADM ebenfalls auch PanIN-Vorläuferläsionen nachgewiesen werden. Im Alter von 4 – 6 Wochen weisen die untersuchten KC-Mausmodelle dieser Studie PanIN im Pankreas auf [27]. In diesem frühen Stadium der PDAC-Entwicklung ist eine starke Entzündungsreaktion zu beobachten, die durch eine Infiltration von Immunzellen gekennzeichnet ist.

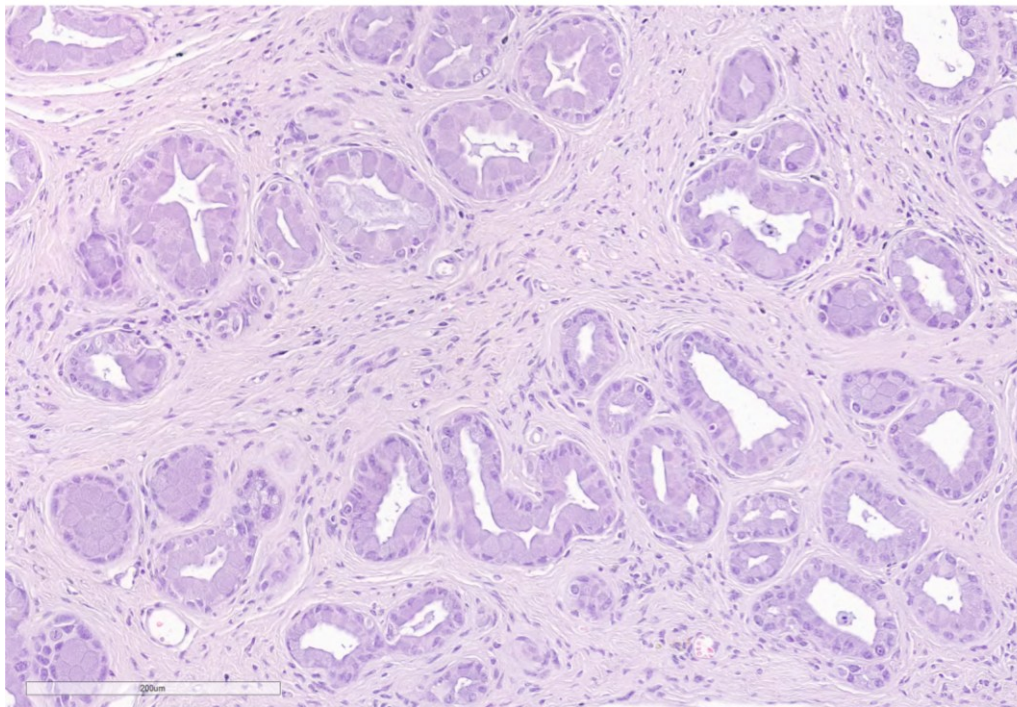


Abbildung 3: Histologie von PanIN-Läsionen einer KC-Maus: Zylindrisches Epithel mit basaler Kernlage. Mehrkernige Nukleolen. Um die PanIN herum ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion mit Infiltration von Immunzellen. HE-Färbung, Vergrößerung 20x

1.2.2.3 Intraduktale Papillär-Muzinöse Neoplasie (IPMN)

Seit 1996 sind IPMN ein Teil der WHO-Klassifikation [45]. Sie zählen zu den häufigsten zystischen Raumforderungen des Pankreas [46]. Ihr Wachstum findet im Haupt- und den Seitengängen des Pankreas statt. Von den Hauptgangs-IPMN geht ein höheres Entartungspotential aus. IPMN produzieren Muzin und zeichnen sich durch eine intraduktale Proliferation aus [45]. IPMN sind neben PanIN die wichtigsten Vorläuferläsionen des PDAC. IPMN können histopathologisch in gastrale, intestinale und pankreatobiliäre Subtypen eingeteilt werden.

Molekulargenetisch werden in IPMN die pathogenen Mutationen *Kras* und *GNAS* nachgewiesen [47]. In high-grade IPMN können zusätzlich bspw. Mutationen von *CDKN2A*, *TP53* oder *SMAD4* nachgewiesen werden.

Im Mausmodell sind alleinige *Kras*-Mutationen nicht ausreichend für die IPMN-Entstehung. Zu den wichtigsten Signalwegen oder -komplexe gehören GPCR, TGF, SWI/SNF, WNT und PI3K [48].

1.2.2.4 Muzinös-zystische Neoplasie (MCN)

MCN gehören mit ca. 10 % zu den selteneren zystischen Tumoren des Pankreas und treten typischerweise bei Frauen in der 4. – 6. Lebensdekade auf [49]. MCN stellen sich als runde schleimbildende zystische Raumforderungen dar mit einem charakteristischen ovariellen Stroma. Sie weisen keine Verbindung zum Pankreasgang auf [50]. MCN bleiben häufig asymptomatisch, besitzen jedoch ein relevantes Entartungsrisiko. Molekulare Veränderungen ähneln denen eines PDAC (*Kras*-, *CDKN2A/p16*-, *TP53*- und *SMAD4*-Mutationen sowie *RNF43*- und *PIK3CA*-Mutationen) [51]. Die chirurgische Entfernung des Tumors ist die einzige kurative Therapie und wird für alle MCN empfohlen. Eine gute Prognose ist dabei zu erwarten [52]. MCN gelten bisher als human-spezifische Entität. Es existieren bisher nur wenige etablierte GEMM für MCN. Ursächlich könnte das hormonabhängige ovariale Stroma sein [53, 54].

1.2.3 Pathogenese und Molekulargenetik der Tumorgenese

Grundlage für die Entstehung eines PDAC sind Akkumulationen genetischer und epigenetischer Veränderungen (siehe Abbildung 4). Als häufigste genetische Aberrationen finden sich Varianten im *KRAS*-Onkogen, die bei > 90 % der Patienten¹ nachgewiesen werden [55]. Meist handelt es sich dabei um Gly12Asp oder Gly12Val Mutationen im Exon 2, die auch als initiale onkogene Veränderungen angesehen werden [56] und daher im Lauf der Tumorgenese früh auftreten [57, 58]. Im Verlauf können Varianten in den Tumorsuppressorgenen des *cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors 2A* (p16/*CDKN2A*), *Tumorsuppressorprotein 53* (*TP53*) in > 80 % der

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit die Sprachform des generischen Maskulinums angewandt. Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die ausschließliche Verwendung der männlichen Form geschlechtsunabhängig verstanden werden soll.

Fälle und *mothers against decapentaplegic homolog 4* (*SMAD4*) in 40 – 50 % der Fälle hinzutreten [31, 59]. In seltenen Fällen finden sich Mutationen im *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (*BRAF*) Gen [31]. *KRAS*-Mutationen scheinen weiterhin, trotz der Detektion zusätzlicher genetischer Alterationen, den größten Einfluss auf den Tumor, dessen Malignität und Metastasierung zu haben [56].

Auch epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierungen oder postrtranslationale Histonmodifikationen wurden beschrieben [60-62]. Das PDAC ist eine sehr heterogene Erkrankung. Eine einheitliche Definition für verschiedene molekulargenetische Subtypen gestaltet sich schwierig [63]

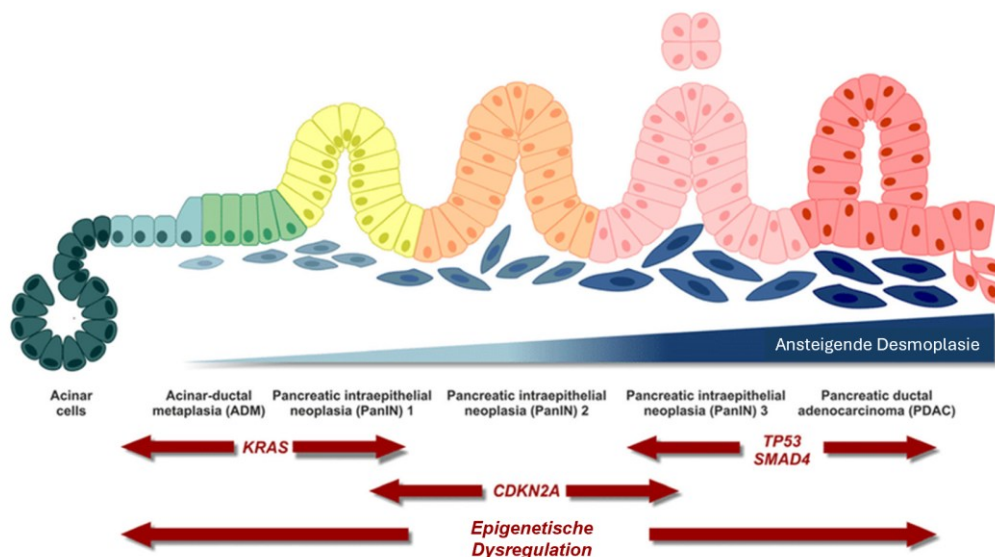


Abbildung 4: Mehrschrittige molekulargenetische und zelluläre Ereignisse während der Karzinogenese des PDAC. Modifiziert nach [10, 64]

1.2.4 Tumormikromilieu

1.2.4.1 Zusammensetzung des Tumormikromilieus

Das Mikromilieu von Tumoren (TME) ist aus Stromazellen, Immunzellen, Endothelien und weiteren Elementen wie beispielsweise Proteinen der extrazellulären Matrix (s.u.) zusammengesetzt. Es ist u.a. entscheidend für das destruktive Wachstum und die Metastasierung des Tumors. Als Gegenstand aktueller Forschungen sehen viele Wissenschaftler im Mikromilieu eine potenzielle Quelle für Biomarker und therapeutische Ziele in der Krebsbekämpfung. Insbesondere das prominente

desmoplastische Stroma imponiert mit seiner heterogenen Zusammensetzung. Das dichte Stroma fungiert zum einen als physikalische zum anderen auch als biologische Barriere. Die biologische Barriere limitiert die Infiltration des Tumors durch Immunzellen und die antitumorale Immunantwort. Ebenso limitiert sie aber auch die Diffusion therapeutischer Mittel [65]. Tumor-assoziierte Fibroblasten (Engl.: *cancer associated fibroblasts*, CAF) scheinen einen besonderen Einfluss innerhalb des TME zu haben [66, 67]. Sie stellen eine heterogene Zellpopulation dar und stammen von ortsständigen Fibroblasten oder PSC (pankreatischen Stellatumzellen, *pancreatic stellate cells*) ab [68].

1.2.4.2 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein dreidimensionales Netzwerk, welches aus verschiedenen Bestandteilen besteht und Prozesse wie Wachstum, Migration, Differenzierung und Zellhomöostase reguliert [69, 70]. Die verschiedenen Komponenten der EZM interagieren dabei miteinander und erfüllen verschiedene Funktionen [71]. Die EZM des PDAC besteht aus kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen [38]. Dazu zählen unter anderem Fibronectin und andere Glykoproteine [4, 41]. Besondere Bestandteile stellen extrazelluläre Matrixproteine dar. Dazu zählen wiederum Tenascin C (TNC) sowie Periostin (POSTN). Sie spielen eine Rolle bei der Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktion und fördern Zell-Adhäsion und -Migration. Ein Anstieg der Expression unter pathologischen Bedingungen konnte in adultem PDAC-Gewebe beobachtet werden [71]. Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von TNC und POSTN im Tumormikromilieu des PDACs wurden GEMM mit gezieltem Knockout der jeweiligen Gene eingesetzt. Auf diese Weise sollte insbesondere deren Einfluss auf die Zusammensetzung und Regulation des immunologischen Mikromilieus analysiert werden.

1.2.4.2.1 Tenascin C

TNC ist ein hexamerer Glykoprotein der EZM. Die Monomere sind über Disulfidbrückenbindungen verbunden [72, 73]. Das *TNC*-Gen, welches für TNC kodiert, liegt auf Chromosom 9 (9q33.1) [74, 75]. TNC wird während der Embryogenese und der Organogenese exprimiert. In adulten Geweben wie Knochenmark und Bindegewebe kann es ebenfalls nachgewiesen werden. Hauptsächlich wird es jedoch unter pathologischen Bedingungen wie während Wundheilungsprozessen und der Kanzerogenese, exprimiert [76, 77]. TNC hat die

Funktion, Interaktionen mit der EZM eingehen zu können, und kann gemeinsam mit anderen EZM-Proteinen (Matrisom) Einfluss nehmen auf das Metastasierungsverhalten von Karzinomen wie dem kolorektalen Karzinom, Hirn- und Brusttumoren [78-80]. Dabei kann durch die Interaktion über Integrine die Zelladhäsion, Zellmigration und Zellaktivierung beeinflusst werden [81, 82]. Weiter konnte am Beispiel der rheumatoiden Arthritis im Mausmodell gezeigt werden, dass TNC mit Immunzellen interagieren kann und immunmodulatorische Effekte hat [83]. TNC kann zum einen immunaktive Eigenschaften entfalten, jedoch zum anderen auch immunsuppressive Funktionen übernehmen. TNC verhindert beispielsweise durch eine Barrierenbildung die Infiltration von CD8⁺-T-Zellen [84, 85]. Der Einfluss auf den Progress am PDAC wurde in vielfachen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hauptquelle für TNC Pankreasstellatumzellen (PSC) sind [86]. Weiterhin konnte eine vermehrte perineurale TNC-Expression mit einer schlechteren Prognose bei höheren Rezidivraten korreliert werden [87].

1.2.4.2.2 Periostin

Periostin ist ein multimodulares Matrixprotein, welches aus verschiedenen Untereinheiten besteht und vom *POSTN*-Gen auf Chromosom 13 (13q13.3) kodiert wird [88]. Die Untereinheiten haben verschiedene Funktionen wie Sekretionen, Interaktionen mit Integrin oder anderen EZM-Molekülen wie Kollagenen oder TNC [89-91]. Physiologisch wird *POSTN* im Periost, während der Embryonalentwicklung und während körperlichen Wachstums exprimiert [92, 93]. Es konnte gezeigt werden, dass *POSTN* wichtige Aspekte der Tumorbilogie reguliert. Dazu gehören Proliferation, Invasion und Metastasierungsverhalten. Matrixproteine können vom Tumor selbst oder von Tumor-assoziierten Zellen produziert werden. Im PDAC konnte *POSTN* in Tumorepithelzellen, PSC und Tumorstroma nachgewiesen werden. *Ben et al.* konnten eine hohe Expressionsrate mit einer schlechten Prognose korrelieren [94]. *Liu et al.* konnten eine hohe Expressionsrate mit einem höheren Tumorgrading und entsprechender niedrigerer Survivalrate der Patienten korrelieren [95]. Knockdown von *POSTN* in PSC führte in Studien zu einem Rückgang der Proliferationsrate und des Metastasierungsverhaltens von Pankreaskarzinomzellen [96]. Generell kann man feststellen, dass hohe Spiegel an *POSTN* mit einem aggressiveren Tumorverhalten, höheren Tumorstadien und schlechterer Prognose assoziiert sind, was darauf hindeutet, dass der *POSTN*-Spiegel ein nützlicher prognostischer Biomarker sein könnte [97]. *POSTN* wird eine überwiegend immunsuppressive Funktion

zugeschrieben. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Expression mit einer verstärkten Infiltration von M2-Makrophagen assoziiert ist [98].

1.2.4.3 Immun-Mikromilieu

Immunzellen werden durch entzündliche Signale angelockt und ihre physiologische Funktion besteht in der Abwehr von Pathogenen. Die TME kann durch pro- und antitumorale Signale die Funktion und Infiltration von Immunzellen beeinflussen [99]. Immunzellen nehmen eine führende Rolle in der TME ein. Das immunologische Mikromilieu (iME) ist komplex und unterliegt vielen Veränderungen im Laufe der Tumorentwicklung. Abhängig von der Art der Zytokine, die durch Tumorzellen, PSC oder Immunzellen sezerniert werden, können unterschiedliche Arten an Immunzellen angelockt werden [63]. Die Verteilung und Anzahl bestimmter Immunzellen kann prognostisch relevant sein, denn Tumorzellen haben die Fähigkeiten, sich dem Immunsystem zu entziehen [100-105].

1.2.4.3.1 Angeborenes Immunsystem

Zu den Zellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems zählen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (DC). Zellen des angeborenen Immunsystem spielen eine bivalente Rolle in der Tumorabwehr, denn sie initiieren zum einen die antitumorale Immunantwort und zum anderen die lokale Inflammation.

Tumorassoziierte Makrophagen (Engl.: *Tumour associated macrophages*, TAM) stellen die dominanteste Zellpopulation in vielen Tumorarten dar. Auch im PDAC konnte eine erhöhte Anzahl an TAM detektiert und mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert werden [106]. Gewebsmakrophagen haben die Fähigkeit, durch Stimulation in TAM zu differenzieren. Zu den Stimulanzen zählen GM-CSF, IL-3, IL-13, CXCL12, CCL2 [107-109]. Je nach Polarisation der Makrophagen unterscheidet man M1- und M2-Makrophagen. M1-Makrophagen sind pro-inflammatorisch und haben durch Aufrechterhaltung der Inflammation eine zytotoxische Funktion. Sie wirken somit als zellulärer Tumorsuppressor. *Pylayeva-Gupta et al.* konnten eine Verbindung zwischen der onkogenen *KRAS*-Aktivierung und der antitumoralen Immunantwort herstellen durch die Hochregulierung von GM-CSF und somit Rekrutierung myeloischer Immunzellen [110]. Es konnte gezeigt werden, dass M1-Makrophagen die PDAC-Entstehung beeinflussen. *Liou et al.* konnten im Mausmodell nachweisen, dass es durch die Depletion von Makrophagen zu einer verminderten

ADM-Entstehung kommt [109]. Die M1-Makrophagendepletion führte in Studien zu verminderter Entstehung von Vorläuferläsionen wie PanIN und ADM. In Folge der ICAM-1-Hochregulierung durch das onkogene *KRAS* werden vermehrt Makrophagen angelockt [111]. Der M2-Phänotyp existiert u.a. häufig in Tumorgewebe. Durch IL-4 oder andere anti-inflammatorische Zytokine können M2-Makrophagen induziert werden, welche im Kontext der Tumorentwicklung ein eher immunsuppressives Mikromilieu erschaffen und dadurch durch Immunevasion zum Tumorprogress beitragen. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Interferon-Regulationsfaktor 4 (IRF4) induziert beispielsweise Fibrose in PanIN-Läsionen [112]. IRF4 wird in Lymphozyten exprimiert und ist für die Polarisierung der Makrophagen zuständig und bietet somit therapeutische Angriffspunkte.

Auch Mastzellen (MC) gehören zur körpereigenen Immunabwehr. Sie können entweder als Blut- oder Gewebemastzellen vorliegen. Man findet sie häufig in Gewebe mit Barrierefunktion wie der Haut und den Atemwegen [113]. Sie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei Allergien (Typ I). In ihren Granula haben sie Heparin, Histamin, Tryptase und andere Gewebshormone und Proteasen gespeichert. Viele Tumore zeigen eine Vermehrung von MC. MC scheinen einen modulierenden vielfältigen Einfluss auf die Tumorentwicklung zu haben. MC werden durch Tumorzellen und stromale Fibroblasten rekrutiert (z.B. über SCF-c-Kit-Signale) [114]. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass MC, die über Tryptase- und Chymase-Immunfärbungen identifiziert wurden, im Pankreaskarzinom im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht waren. Sie konnten entlang von Pankreasgängen, Blutgefäßen und Nerven sowie im Interstitium zwischen den Läppchen bzw. im Bindegewebe um die neoplastischen Drüsen nachgewiesen werden [114]. Hier weisen die MCs tumorfördernde Mechanismen auf über die Freisetzung proangiogener Faktoren wie VEGF-A, VEGF-C und bFGF und ihre Wirkung auf die EZM durch eine Erhöhung der Mikrogefäßdichte [115]. MC haben die Fähigkeit mit anderen Immunzellen des iME zu interagieren. Sie hemmen beispielsweise die Aktivität von CD-8⁺-T-Zellen und hemmen die Differenzierung immunsuppressiver Zelltypen [116, 117]. Sie fördern die Aktivierung von CAF und die weitere Ausbildung des desmoplastischen Stromas sowie die epitheliale-mesenchymale Transition. Ebenso korrelierte in Studien die Anzahl der Mastzellen mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen [115]. In Studien konnte gezeigt werden, dass hohe Zahlen der Mastzellinfiltration mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind [116, 118]. Sie

wurden lange Zeit stiefmütterlich behandelt, werden nun aber als kritische Komponente angesehen und könnten eine potenzielle Therapiequelle darstellen [119].

1.2.4.3.2 Erworbenes Immunsystem

Die erworbene Immunantwort beruht auf antigenspezifischen Zellen (Lymphozyten), die eine Aktivierung benötigen, bevor sie selbst in Aktion treten können. Aktivierungen finden häufig über das angeborene Immunsystem statt. Aufgrund des hohen Spezialisierungsgrades ist das erworbene Immunsystem langsamer, jedoch effektiver.

CD8⁺- und CD4⁺-T Lymphozyten zählen zu den Effektor-T-Lymphozyten. Helfer-T-Zellen (TH-Zellen) exprimieren CD4 und zytotoxische T-Zellen (CTLs) exprimieren CD8 an ihrer Oberfläche. Sie sind potenziell in der Lage, tumorassoziierte Antigene zu erkennen [120, 121]. Nach ihrer Stimulierung können sie IFN- γ sezernieren [122]. Die T-Zell-abhängige Immunantwort wird durch DCs reguliert, die für die Antigenpräsentation zuständig sind. Antigenbeladene DCs stimulieren in lymphatischen Organen naive T-Zellen. Studien von *Schmitz-Winnenthal et al.* konnten zeigen, dass die Produktion funktionstüchtiger CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bei PDAC-Patienten im Knochenmark induziert werden kann [121]. Die Antigenpräsentation durch DCs wird induziert durch Interferon-1, Hitzeschockproteine und EZM-Proteine. Immunsuppressive Zytokine inhibieren jedoch die DC-Aktivierung. Makrophagen, Mastzellen [115], regulatorische T-Zellen [123] und PSC produzieren eben diese Signalproteine und generieren dadurch ein immunsuppressives Mikromilieu [124, 125]. Unter den Untergruppen der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) haben aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten (Granzym B⁺) eine antitumorale Wirkung, während regulatorische T-Lymphozyten (*Forkhead Box P3*, FoxP3⁺) die antitumorale Immunantwort unterdrücken [126].

Regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) sind eine besondere Untergruppe der CD4⁺-T-Zellen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung von Autoimmunität und Allergien bzw. Selbsttoleranz [127, 128]. Weiter spielen sie eine entscheidende Rolle bei Organtransplantationen [129] oder Abstoßungen des Fetus durch die Mutter [130]. Sie werden über den Transkriptionsfaktor FoxP3 nachgewiesen. Ihre Funktion ist es, im iME von Tumoren über die Ausschüttung bestimmter Zytokine wie IL-10 oder TGF- β CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen zu supprimieren und eine antiinflammatorische Wirkung zu erzielen [131-133]. Studien von *Tang et al.* und *Shou et al.* konnten zeigen, dass die Anzahl der Tregs in Pankreastumoren und Brusttumoren mit Tumorprogress

korreliert [134, 135]. Durch die Depletion von Tregs konnten in *in-vivo*-Modellen für PDAC Tumorremissionen erreicht werden [136]. *Budhu et al.* konnten speziell für das Maligne Melanom im Mausmodell nachweisen, dass eine Depletion der Tregs oder eine Inhibierung des TGF- β -Signalweges eine Tumorerkrankung mit CD8⁺-T-Zellen bewirkt [137]. Dies wirkt sich auch auf die Entstehung von Tumoren aus: *Keenan et al.* konnten bei KPC-Mäusen nachweisen, dass die Depletion von Tregs zu weniger PanIN-Läsionen führt [138]. Es konnte in mehrfachen Studien belegt werden, dass Tregs eine bedeutende Rolle in PanIN-Vorläuferläsionen spielen und zum Tumorprogress beitragen [139].

CD19⁺-B-Zellen gehören ebenso zu der Gruppe der Lymphozyten, welche ebenfalls Teil des spezifischen humoralen Immunsystems sind. Sie bilden Antikörper auf spezifische Antigenreize hin. Ihre Rolle bei Tumorerkrankungen ist umstritten [140]. In mehreren Mausmodellen konnte eine tumorfördernde Rolle von B-Zellen nachgewiesen werden [141-146]. Jedoch existieren auch gegenteilige Studien, die belegen, dass B-Zellen Tumore infiltrieren und die Proliferation und Effektivität von T-Zellen und deren Zytokinproduktion fördern [147-149]. Die humane antitumorale Funktion von B-Zellen wird weitgehend auf ihre Fähigkeit zurückgeführt, sich in Plasmazellen zu differenzieren [150], antitumorale Immunglobuline zu produzieren [151] und mit T-Zellen in tertiären lymphoiden Strukturen (TLS) zu interagieren [152-154].

Programmierter Zelltod-1 (PD-1) ist ein Immun-Checkpoint-Oberflächenprotein, welches auch als Rezeptor fungiert und an der Hemmung der Immunantwort beteiligt ist. Man unterscheidet generell positive und negative kostimulatorische Moleküle. Positive Immun-Checkpoints wie CD28 können ein positives Signal erzeugen und die Proliferation, Differenzierung und Funktion der Lymphozyten fördern, während negative Immun-Checkpoints wie PD-1 (Engl.: *Programmed cell death protein 1*) ein negatives Signal erzeugen und die Funktion der Lymphozyten unterdrücken können, was zu Immunsuppression führt [155, 156]. Die Expression von PD-1 auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen ist weit verbreitet, während sich die programmierten Todesliganden (PD-Ls) vor allem auf soliden Tumoren, tumorinfiltrierenden dendritischen Zellen und Makrophagen befinden [157-159]. Es gibt immer mehr Belege dafür, dass Tumoren die PD-1-abhängige Immunsuppression zur Immunumgehung ausnutzen. PD-1 ist ein Mitglied der CD28-Superfamilie, das mit seinen Liganden PD-L1 oder PD-L2 interagiert, um negative

Signale zu senden. PD-1 und seine beiden Liganden sind weit verbreitet und üben bei der Aktivierung von T-Zellen eine breitere Palette von Funktionen der Immunsuppression aus. Studien zeigten, dass ihre Interaktion Gewebe vor Autoimmunangriffen schützt und die Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz reguliert. Die PD-1-Rezeptor-Liganden-Bindung ist auch an der Abschwächung der Tumormunität und der infektiösen Immunität sowie an der Erleichterung der Tumorprogression und der chronischen Infektion beteiligt [160-162]. Die PD-L1/2-Expression auf Tumorzellen korreliert stark mit einer ungünstigen Prognose, die sich bei einer Reihe von Krebsarten wie Bauchspeicheldrüsen-, Blasen-, Magen-, Nieren-, Speiseröhren- und Eierstockkrebs sowie Melanomen gezeigt hat [163-166]. Die gezielte Hemmung der lokalen Immunreaktion kann die Ausbreitung, Ausdehnung und Metastasierung des Tumors beeinflussen und stellt eine Herausforderung für die künftige Krebstherapie dar [167].

1.3 Fragestellung und Ziele

Das Pankreaskarzinom stellt nach wie vor trotz vieler Bemühungen, die Prognose und Therapieoptionen zu verbessern, ein wachsendes Problem der Weltbevölkerung dar. Zelluläre, molekulargenetische und immunologische Einflüsse regulieren den Progress der Karzinogenese.

Ziel dieser Arbeit ist vor diesem Hintergrund eine Charakterisierung des immunologischen Mikromilieus im Laufe der pankreatischen Tumorgenese im Mausmodell, um frühzeitige Veränderungen der Zusammensetzung und Lokalisation der Immunzelle zu detektieren. Aufgrund der häufig sehr späten Diagnosestellung humaner Pankreaskarzinome, stellen genetisch modifizierte Mausmodelle (GEMM) eine gute Option dar, die frühe Entwicklung des PDAC zu studieren. Im Fokus steht dabei die Untersuchung der immunologischen Tumorantwort des angeborenen und des erworbenen Immunsystems in den präinvasiven Vorstufen, ADM und PanIN, sowie im PDAC unter Nutzung der Multiplex-Immunhistochemie.

In Zukunft erhofft man sich so, die körpereigene Immunantwort während der Karzinogenese besser verstehen zu können und ggfs. therapeutische Angriffspunkte zu entdecken und somit auch die Prognose der Erkrankung verbessern zu können.

2 Mausmodelle, Material und Methoden

2.1 Mausmodell und Kollektiv

Die Zucht der genetisch veränderten Mäuse zur Generierung von Pankreastumoren wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalens genehmigt. Eine Tierversuchsgenehmigung lag vor mit folgender Referenznummer: 84-02.04.2016A060. Die Züchtung und Haltung der Mäuse fand in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität statt. Die Organentnahmen aus den Mäusen waren bereits im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt worden.

Für das Projekt stand ein Kollektiv aus 41 transgenen Mäusen verschiedener Linien zur Verfügung. Die Mäuse gehören den KC- und KPC-Linien an, die sich in ihrem Genotyp unterscheiden: $p48^{Cre^{tg/+}}; LSL-Kras^{G12D/+}$ (KC) und $p48^{Cre^{tg/+}}; LSL-Kras^{G12D/+}; p53^{flox/flox}$ (KPC). Mit Hilfe des sequenzspezifischen Rekombinationssystems können in bestimmten Geweben Tumore erzeugt werden und so Krankheiten des Menschen simuliert werden. Das CreLoxP-System findet eine breite Anwendung in der Biotechnologie bei der Erzeugung von Knockout-Mäusen. Zur pankreasspezifischen Tumorinduktion wird das Protein p48 (Syn. PTFA1, *Pankreas transcription factor 1 subunit alpha*) als Promotor genutzt. Die KC-Mauslinie wurde unter Zuhilfenahme dieses CreLoxP-Systems gezüchtet, wobei das endogene onkogene *KRAS* unter dem pankreasspezifischen Promotor p48 aktiv werden kann, was zur Entwicklung von Tumorstadien führt. Zusätzlich fehlt in der KPC-Linie durch Inaktivierung die tumorsuppressive Wirkung des *Tp53*-Gens. Weiterhin wurden in den KPC-Linien Genabschnitte für die Bildung der extrazellulären Matrixproteine TNC und POSTN inaktiviert. Die Begnadigung und Organentnahme der Mäuse erfolgte bei schlechtem Allgemeinzustand oder deutlich vergrößertem Pankreas.

2.2 Material

2.2.1 Laborequipment

Laborequipment	Hersteller
Embedding cassettes	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
FEATHER® Microtome Blade A35	Pfm medical AG, Köln
Glass Cover Slips k12432	Engelbrecht GmbH, Edermünde
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen H-4000	Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA)
Manual Tissue Arrayer Punches MP10 – 1.0 mm Diameter	AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark
Mikrotom CUT 5062	SLEE medical GmbH, Nieder-Olm
Mikrowelle HMT842C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
MTA1 – Manual Tissue Arrayer 2003491	AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark
Paraffinstreckbad für Mikrotom Schnitte	MEDAX 24900, Kiel
Slide staining set kat 47-2112-00	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf
StarFrost Advanced Adhesive microscope slides	Engelbrecht GmbH, Edermünde
TipOne® 10µL, 100µL, 1000µL	STARLAB International GmbH, Hamburg
Vitaquick® pressure cooker	Fissler GmbH, Idar-Oberstein
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

2.2.2 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DAB Substrat Kit	Abcam plc, Cambridge, England
Dulcecco's PBS	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin Y	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70 %	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol 99,5 % denaturiert mit 1 % MEK	VWR International GmbH, Darmstadt
Eukitt® Quick-hardening mounting medium	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd Lösung 4 % Phosphat gepuffert	neoFroxx GmbH, Einhausen
TRIS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tween®	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Xylene	VWR International GmbH, Darmstadt
Ziegenserum	Abcam plc, Cambridge, England

2.2.3 Puffer

Puffer und Fixierungsmittel	Zusammensetzung
Blockierungslösung	• BSA 1% in PBS • Goat serum 10% • Triton-X 0.1%
Citrat-Puffer	• Citric acid 10 mM pH 6.0
Neutral gepuffertes Formalin (NBF)	• Formaldehyd 10% • Aqua dest. • NaH₂PO₄ 4g/L pH 7.0
TBS-T	• TRIS-HCl 25 mM • NaCl 150 mM • 0.1% Tween20 pH 7.5
TE-Puffer	• Tris 10 mM • EDTA 1 mM pH 9.0

2.2.4 Antikörper

Antikörper	Referenz Nummer	Hersteller
Anti-Mast Cell Tryptase (AA1)	ab2378	abcam
CD163 (EPR19518)	ab182422	abcam
CD19 (D4V4B)	#90176S	Cell Signaling Technology
CD3 (SP7)	CI597C01	DCS
CD4 (EPR19514)	ab183685	abcam
CD8α (D4W2Z)	#98941	Cell Signaling Technology
F4/80 (D2S9R)	#70076	Cell Signaling Technology
FoxP3 (D608R)	#12653	Cell Signaling Technology
Granzym B (GrB-7)	M7235	DAKO
PD-1 (D7D5W)	#84651	Cell Signaling Technology

2.2.5 IHC Detektions-Kits

Detektions-Kit	Hersteller
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Kaninchen IgG)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
VECTASTAIN® ABC HRP Kit (Peroxidase, Maus IgG)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

2.2.6 Multiplex IHC Kit

Multiplex Kit	Hersteller
Opal™ 7-Color Manual ICH Kit 50 Slides:	Perkin Elmer, Waltham, USA
• Amplification Diluent	
• Opal 520 Fluorophor	
• Opal 540 Fluorophor	
• Opal 570 Fluorophor	
• Opal 620 Fluorophor	
• Opal 650 Fluorophor	
• Opal 690 Fluorophor	
• DMSO	
• Spectral DAPI solution	
• Opal polymer HRP Ms+Rb	
• Blocking/Ab Diluent	
• 10X AR6 buffer	

2.2.7 Mikroskop

Mikroskop	Hersteller
Aperio® AT 2 Objektträger-Scanner	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Leica TCS SP8 STED 3X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Zeiss Axioskop 2 plus	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

2.2.8 Software

Software	Hersteller
Aperio ImageScope 12.4.6. x64	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
EndNote X9	Clarivate Analytics
GraphPad Prism 7	GradPad Software Inc., San Diego (USA)
IBM SPSS Statistics 28	Norman u. Nie, 1983
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin)
Leica Application Suite X (LAS X, LASX)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond (USA)
ZEISS ZEN	Zeiss Microscopy GmbH, Jena

2.3 Methoden

2.3.1 Gewebeblöcke und Biobank

Murine Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeblöcke (*formalin-fixed, paraffin-embedded*, FFPE) mit Pankreasgewebe konnten aus dem Forschungs-Archiv des Instituts für Pathologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf entnommen werden. In einer Datenbank waren zugehörige klinische und genetische Daten des jeweiligen Falles hinterlegt. Das Kollektiv wurde, bestehend aus KC- und KPC-Mäusen, möglichst vielfältig in Bezug auf die Geschlechterverteilung, das Alter und Genotypen ausgewählt. Die FFPE-Blöcke wurden für ca. 40 Minuten in den Gefrierschrank gelegt, bevor sie am Mikrotom angeschnitten wurden. Für Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) wurden Schnittdicken von 1,5 – 2 µm verwendet, für die Multipleximmunfluoreszenzfärbung wurden Schnittdicken von 0,5 µm gewählt. Zur Erstellung einer Schnittsammlung der jeweiligen Blöcke wurden zu jedem FFPE-Block zehn serielle Schnitte angefertigt. Die FFPE-Schnitte wurden auf ein 48 °C warmes Wasserbad übertragen. Dort konnte sich das Gewebe ausbreiten und anschließend mit Objektträgern aufgezogen werden. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt.

2.3.2 Histologie

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) gelten als Routinefärbungen von histologischen Schnitten zur Übersichtsgewinnung vor der Anfertigung von immunhistochemischen Färbungen. Die Färbungen wurden an sog. *Whole-slide*-Objektträgerschnitten sowie TMAs manuell durchgeführt, um einen Überblick über die möglichen Läsionen im Pankreas der jeweiligen Maus zu erlangen. Die Vorbereitung erfolgte bei 60 °C im Heizofen für 30 – 45 Minuten. Anschließend wurden die FFPE-Schnitte in Xylol für 15 Minuten deparaffinisiert, rehydriert in absteigenden Alkoholreihen (100 % → 96 % → 70 %) für jeweils 1 Minute und hydriert in *Aqua destillata* für 2 Minuten. Für die Zytoplasmafärbung wurden die Schnitte in Eosin für 10 Minuten getränkt und danach in Leitungswasser ausgewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin für die Kernfärbung wenige Sekunden in Hämatoxylin getunkt und unter fließendem Wasser ebenfalls ausgewaschen. Die Dehydrierung erfolgte in aufsteigenden Alkoholreihen (70 % → 96 % → 100 %) ebenfalls für jeweils 1 Minute und zuletzt in Xylol für 2 Minuten.

Abschließend erfolgte die Eindeckung der angefärbten HE-Gewebeschnitte mit Deckgläschen und Eindeckmedium (1 Tropfen).

2.3.3 Pathologische Beurteilung

Die Typisierung der *Whole-slide*-Schnitte aller Mausfälle wurde durch erfahrene Pathologen des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf anhand der *World Health Organization classification* nach *Hruban et al.* durchgeführt. Fälle mit ausgedehnten Tumornekrosen wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.3.4 Tissue Microarray

Die Konstruktion der TMAs (Engl.: *Tissue Microarrays*) erfolgte manuell am *MTA1 Manual Tissue Arrayer* in vorgefertigte Paraffin-Leerblöcke. Stanzzyylinder wurden aus der Zielregion des FFPE-Blocks in einen Paraffin-Leerblock überführt. Anschließend wurden serielle Schnitte der TMAs angefertigt und repräsentative Schnitte für die HE-Färbungen und für die Multiplex-Immunfluoreszenzfärbungen ausgewählt. Eine erneute histopathologische Beurteilung und Typisierung der Gewebestanken wurden ebenfalls durchgeführt. Insgesamt 140 Gewebestanken des Mauskollektives konnten auf zwei TMAs aufgeteilt werden (siehe Abbildung 5). Die Gewebestanken bestehen, sofern vorhanden, aus Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumorgewebe jedes Falles. Das Tumorgewebe wurde möglichst aus jeweils einer peripheren und einer zentralen Zone entnommen. Der Durchmesser einer jeweiligen Stanze betrug 1,0 mm (Stanzzyylinder). Zur internen Kontrolle wurden ebenfalls Stanzen von Lymphknotengewebe und Hautgewebe bei der Konstruktion der TMAs berücksichtigt

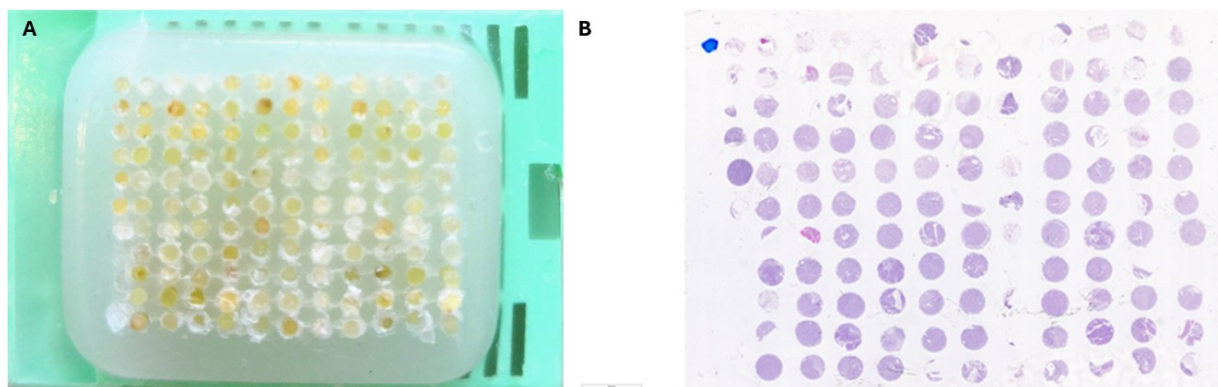


Abbildung 5: Tissue Microarray. TMA1-Paraffinblock (A); HE-Färbung TMA1 (B)

2.3.5 Immunhistochemie und Etablierung der Primär-Antikörper

Die u.g. Antikörper wurden zunächst an Maus-Lymphknoten und -Milzgewebe in der klassischen indirekten Immunhistochemie (IHC) mittels Avidin/Biotin-System und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Chromogen etabliert (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Etablierung der Primärantikörper

Antikörper	IgG	Verdünnung	Puffer	Marker für	Färbung
Anti-Mast Cell Tryptase (AA1)	Maus	0,1 µg/ml	Citrat/pH6	Mastzellen	Zytoplasma
CD163 (EPR19518)	Kaninchen	1:500	TE/pH9	M2-Makrophagen und Monozyten	Zytoplasma
CD19 (D4V4B)	Kaninchen	1:400	TE/pH9	B-Zellen	Membran
CD3 (SP7)	Kaninchen	1:100	Citrat/pH6	T-Zellen	Membran
CD4 (EPR19514)	Kaninchen	1:2000	TE/pH9	Helfer T-Zellen	Membran
CD8α (D4W2Z)	Kaninchen	1:800	Citrat/pH6	Zytotoxische T-Zellen	Membran
F4/80 (D2S9R)	Kaninchen	1:1000	Citrat/pH6	Makrophagen	Membran
FoxP3 (D608R)	Kaninchen	1:100	Citrat/pH6	Regulatorische T-Zellen	Zellkern
Granzym B (GrB-7)	Maus	1:20	Citrat/pH6	Zytotoxische T-Zellen	Zytoplasma
PD-1 (D7D5W)	Kaninchen	1:100 - 1:50	Citrat/pH6	Immun-Checkpoint	Membran

Immunhistochemische Methoden wurden für eine Detektion der einzelnen Marker im murinen Pankreasgewebe genutzt. Zu den Immunbiomarkern gehören T-Zell-Marker wie anti- CD3, CD4, CD8α, Granzym B, FoxP3 sowie PD-1. Diese bilden verschiedene Subtypen an T-Zellen ab. B-Zellen wurden mittels CD19 angefärbt. Als Makrophagen- und Monozytenmarker wurden anti-F4/80 und anti-CD163 Antikörper genutzt. Anti-CD163 dient speziell als M2-Makrophagenmarker. Mastzellen wurden über Tryptase nachgewiesen (siehe Tabelle 1: Etablierung der Primärantikörper).

Es wurden FFPE-Schnitte auf Objektträgern übertragen, in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und anschließend in destilliertem Wasser hydriert. Daraufhin folgte die Freilegung der Epitope. Dazu wurde eine handelsübliche Mikrowelle genutzt, wobei sich die Schnitte in einer Pufferlösung befanden. Nachdem die Schnitte wieder abgekühlt waren, schlossen sich Waschschriffe in TBS-T-Lösung an. Dreiprozentiges H₂O₂ wurde zur Blockierung der endogenen Peroxidase verwendet. Anschließend folgte erneut ein Waschschriff mit TBS-T. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, schloss sich ein Proteinblock an. Das Gewebe wurde außerdem mit einem hydrophoben Stift umkreist. Nach erneuter Waschung in

TBS-T folgte die Zugabe des jeweiligen Primärantikörpers in dessen etablierter Verdünnung. Die Verdünnung fand ebenfalls mit Blockierungslösung statt. Der Primärantikörper wurde für 30 Minuten – 1 Stunde inkubiert und anschließend mit TBS-T erneut abgewaschen. Es folgte der Sekundärantikörper für ca. 30 Minuten Inkubationszeit, nach erneuter Waschung in TBS-T. Je nach Primärantikörper wurden verschiedene Detektionssysteme genutzt (s.o.). Anschließend konnte DAB hinzugegeben werden für ca. 3 Minuten Inkubationszeit. Die Reaktionszeit konnte mit Leitungswasser unterbrochen werden. Es folgte die Hintergrundfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin für wenige Sekunden. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die Abdeckung erfolgte durch das Auftragen von Eindeckmedium und Deckgläsern.

2.3.6 Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung

Die Opal-Methode der Firma *PerkinElmer* erlaubt die simultane Färbung und Detektion multipler Biomarker in Gewebeschnitten. Sie beruht auf der sog. TSA-Methode (Engl.: *Tyramide Signaling Amplification*). Zunächst erfolgt die Vorbereitung der FFPE-Schnitte sowie die Freilegung der Epitope. Anschließend erfolgt der Proteinblock und der Primärantikörper wird auf den Schnitt gegeben. Darauf folgt die Zugabe des Sekundärantikörpers und der Meerrettichperoxidase (Engl.: *Horseradish peroxidase*, HRP). Nach dessen Bindung erfolgt die Signalamplifikation durch Zugabe des jeweiligen Opal-Fluorophors. Die Hitzeinduktion der Mikrowelle führt zur Ablösung des Primär-Sekundärantikörper-HRP-Komplexes, was die Zugabe eines weiteren Primärantikörpers erlaubt. Der Sekundärantikörper bindet dabei zunächst an den mit dem Antigen verbundenen Primärantikörper. Anschließend erfolgt die Aktivierung und kovalente Bindung des Tyramide-Fluorophors an die Tyrosinbindungsstellen des Antigens. Unter Hitzeinduktion wird der Primär- und Sekundärantikörper-HRP-Komplex abgelöst, das Fluoreszenzsignal verbleibt jedoch am Antigen. An dieser Stelle kann der Workflow beliebig häufig wiederholt werden, bis alle interessanten Zielstrukturen detektiert wurden. Zum Schluss erfolgt die Färbung des Hintergrundes bzw. die Kernfärbung mittels DAPI (Engl.: 4',6-Diamidino-2-phenylindol). Als Eindeckmedium wurde *Vectashield Antifade* der Firma Vector Labs (Ref. H1000, Lot: ZF0221) verwendet. Die Verdünnung der Antikörper sowie auch die gewählte Färbemethode spielen eine entscheidende Rolle, wie *Gorris et al.* [168] in ihrer Studie zeigen konnten. Sie konnten nachweisen, dass gleiche Konzentrationen des Primärantikörpers in der klassischen IHC (DAB-Methode) zu höheren angefärbten und

somit positiven Zellen in der TSA-Methode führten. Somit wurde die Rolle der Etablierung von Antikörpern und ihren optimalen Verdünnungen unterstrichen. Ebenfalls untersuchten *Gorris et al.* den Einfluss der Antikörper-Reihenfolge. Die Optimierung der Antikörperreihenfolge sollte durch visuelles Scoring erfolgen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass hoch exprimierte Moleküle auf früheren Positionen als niedrig exprimierte Moleküle stehen sollten, da die Fluoreszenzintensität durch wiederholte Mikrowellenschritte verringert würde. Auch in dieser Promotionsarbeit wurden diese Erkenntnisse berücksichtigt. So wurden in Panel 2 die Marker mit der niedrigsten Färbeintensität während der Etablierung auf späte Stellen der Färbereihenfolge gesetzt, um weitere Mikrowellenschritte, die die Intensität weiter verringern würde, zu vermindern. Zu den Markern mit niedriger Färbeintensität zählten FoxP3, Granzym B, PD-1, Tryptase, CD4 und CD3 zählten zu den Markern mit höheren Färbeintensitäten.

Tabelle 2: Opal Fluorophore und ihre Wellenlängen

Fluorophor	Exzitation (nm)	Emission (nm)	Kappenfarbe
Spectral DAPI	358	461	Blau
Opal 520	494	525	Grün
Opal 540	523	536	Gelb
Opal 570	550	570	Rot
Opal 620	588	616	Bernstein
Opal 650	627	650	Orange
Opal 690	676	694	Transparent

Im Folgenden ist die Aufteilung der Marker inklusive Zuordnung der Fluorophore aufgeführt und in der Färbungsreihenfolge dargestellt. Die Verdünnungen entsprechen denen aus Tabelle 1:

Panel 1:

1. CD19 + Opal 520
2. CD3 + Opal 620
3. Tryptase + Opal 540
4. F4/80 + Opal 570
5. CD163 + Opal 690
6. Spectral DAPI

Panel 2:

1. CD3 + Opal 650
2. CD4 + Opal 620
3. CD8 α + Opal 570
4. Granzym B + Opal 690
5. FoxP3 + Opal 540
6. PD-1 + Opal 520
7. Spectral DAPI

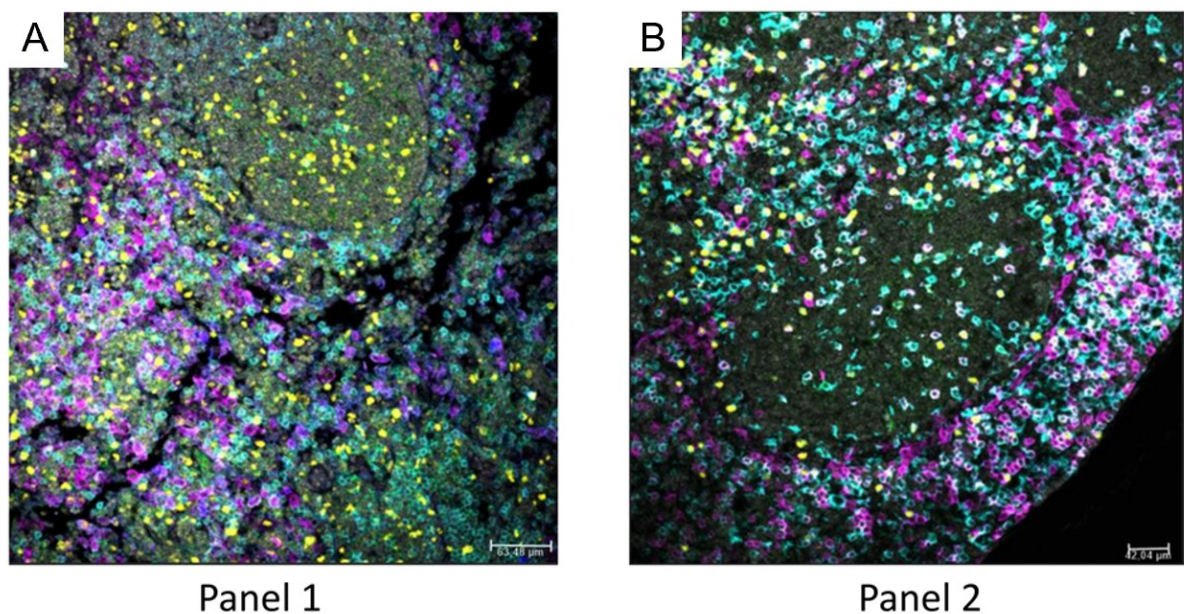


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der Multiplex-Immunfluoreszenz Färbung.
A: Darstellung von Panel 1 in der Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung an murinem Lymphknotengewebe. B: Darstellung von Panel 2 in der Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung an murinem Lymphknotengewebe. Leica TCS SP8 STED 3X Mikroskop.

2.3.7 Leica TCS SP8 STED 3X Mikroskop

Im *Center for Advanced Imaging* (CAi) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden Aufnahmen der TMAs mit Hilfe des *Leica TCS SP8 STED 3X* Mikroskops durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein konfokales Mikroskop, welches mehrere Fluoreszenzmarker simultan und hoch aufgelöst mit schnellen Bildraten in vivo zu erfassen ermöglicht. Es eignet sich besonders für die Superauflösungsmikroskopie. Zur Anregung steht ein Weißlichtlaser (WLL) zur Verfügung, der Anregungswellenlängen zwischen 470 und 670 nm ermöglicht. Zusätzlich sind eine

UV-Diode und ein Argon-Laser installiert. Hybriddetektoren (HyD) dienen zur Detektion der emittierten Wellenlängen, welche auch in der Lage sind, durch Filterungen Verunreinigungen des Signals zu erkennen. Die folgenden Objektive wurden für diese Promotionsarbeit verwendet: 20x (NA 0,75) und 40x (NA 1,10) [169, 170]. Die Bildgröße (Engl. *Frame Size*) wurde auf 512 x 512 Pixels eingestellt und die Bildtiefe betrug 8 Bit. Zur Erfassung eines gesamten TMA-Spots wurden standardmäßig 9 Bilder aufgenommen.

2.3.8 Quantifizierung

Eine semi-automatisierte Methode wurde entwickelt, um die aufgenommenen Bilder quantitativ auszuwerten. Mit Hilfe des *Open Source* Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogrammes *ImageJ* (Wayne Rasband, 1997) wurden Zellen detektiert, ausgezählt und anschließend weiter prozessiert. Jeder einzelne Marker bzw. Channel wurde über geschriebene *Macros* ausgewertet und anschließend in Excel zusammengeführt. Die Ergebnisse wurden pro DAPI-positive Zellen pro Fläche normiert. So ergab sich eine gute Vergleichbarkeit der gezählten Immunzellen in verschiedenen Arten von Gewebe (Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumorgewebe). Im Anhang ist ein exemplarischer Auszug eines FoxP3-Macros dargestellt. Die Macros beinhalten weitere Bildmodifikationen und -optimierungen zur Hintergrundreduktion durch schwellenwertbasierte Segmentierungen (Engl.: *Thresholding*), Glättungen sowie die Bestimmung der Minima und Maxima der zu zählenden Partikel.

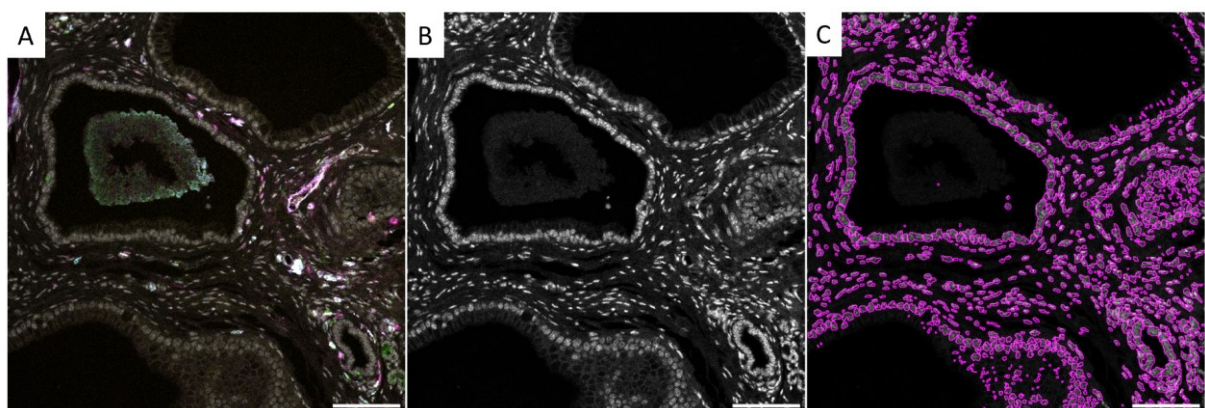


Abbildung 7: Arbeitsablauf der Quantifizierung mittels ImageJ. Multiplex-Originalbild einer PanIN-Läsion (A), Monoplex-DAPI*-Zellen der PanIN-Läsion (B), pink umrandet detektierte DAPI*-Zellen durch Bildanalyse in ImageJ (C)

2.3.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Computerprogramm *IBM SPSS* (Norman u. Nie, 1983, Version 28) verwendet. Die Ergebnisse wurden als Median $\pm$ Standardabweichung des Medians angegeben. *P*-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant anerkannt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Bei nicht-normalverteilten Datensätzen wurden Medianvergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen mit Hilfe des nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis-H-Tests* (Kruskal and Wallis, 1952) und anschließender post-hoc Analyse (*Dunn-Bonferroni-Korrektur*) durchgeführt.

Die Wahrscheinlichkeit des Gesamtüberlebens wurde anhand der *Kaplan-Meier-Methode* (Kaplan et al., 1958) bestimmt und graphisch dargestellt. Die Signifikanz wurde anschließend mittels des *Log-Rank-Tests* analysiert. Das Gesamtüberleben wurde definiert als die Zeitspanne, zwischen dem Erstdiagnosedatum und dem iatrogenen Todesdatum. Der Endpunkt war das Eintreten des Todes.

Weiter wurden *Spearman-Korrelationsanalysen* zwischen Alter, Geschlecht, genetischem Hintergrund der Mäuse sowie dem prozentualen Anteil des Pankreasgewichtes am Gesamtgewicht der Maus durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Antikörper

Initial erfolgte die Etablierung der Immunmarker in der klassischen indirekten IHC mittels Avidin/Biotin System und DAB-Chromogen. Als Gewebe dienten murine Lymphknoten oder murines Milzgewebe, da sie eine hohe Dichte an Immunzellen aufweisen. Die Resultate sind in Abbildung 8 abgebildet. Am *Zeiss Axioskop 2 plus* des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf fand die Aufnahme der Bilder statt.

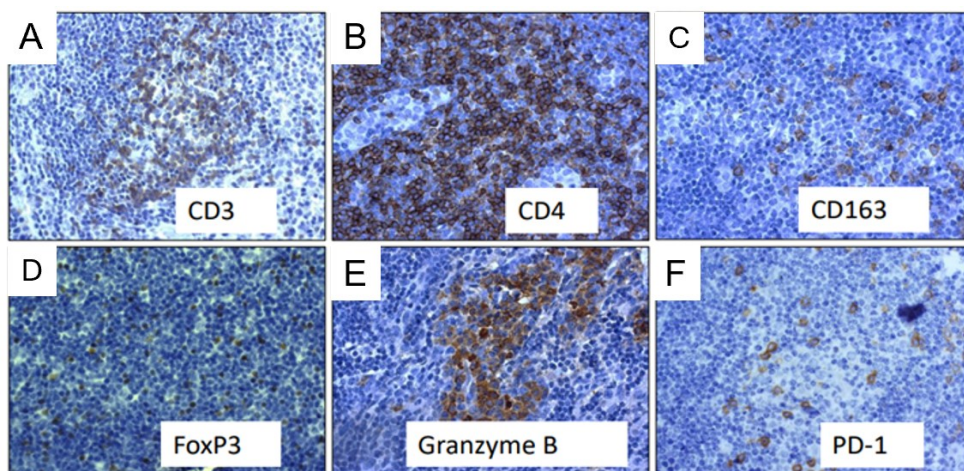


Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Etablierung der Immunmarker in lymphatischem Mausgewebe in der klassischen Immunhistochemie. A: CD3⁺-T-Zellen. B: CD4⁺-TH-Zellen. C: CD163⁺-Makrophagen. D: FoxP3⁺-Tregs. E: Granzym B⁺-T-Zellen, PD1⁺- Immunzellen. Zeiss Axioskop 2 plus. Vergrößerung 20x.

Anschließend wurden die Immunmarker in der Zielform, der Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung, etabliert und im CAi am *Leica TCS SP8 STED 3X* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgenommen. Die Etablierung erfolgte an lymphatischem Mausgewebe. Im Folgenden sind die einzelnen Marker dargestellt. Abbildung 9 bildet Panel 1 und Abbildung 10 bildet Panel 2 ab.

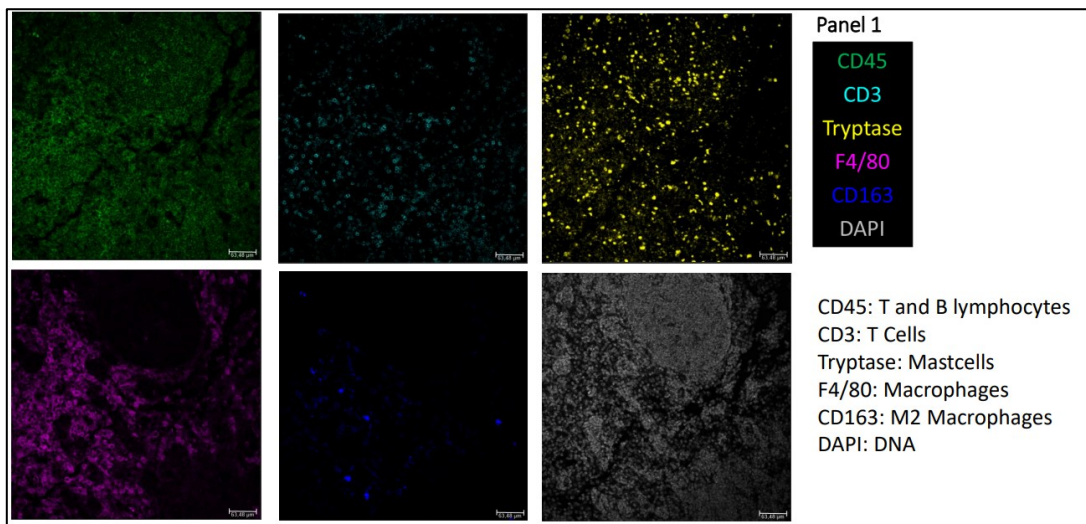


Abbildung 9: Darstellung der Immunmarker aus Panel 1 in der Multiplex-Immunfluoreszenz an Maus-Lymphknotengewebe. Leica TCS SP8 Mikroskop, Vergrößerung: 20x

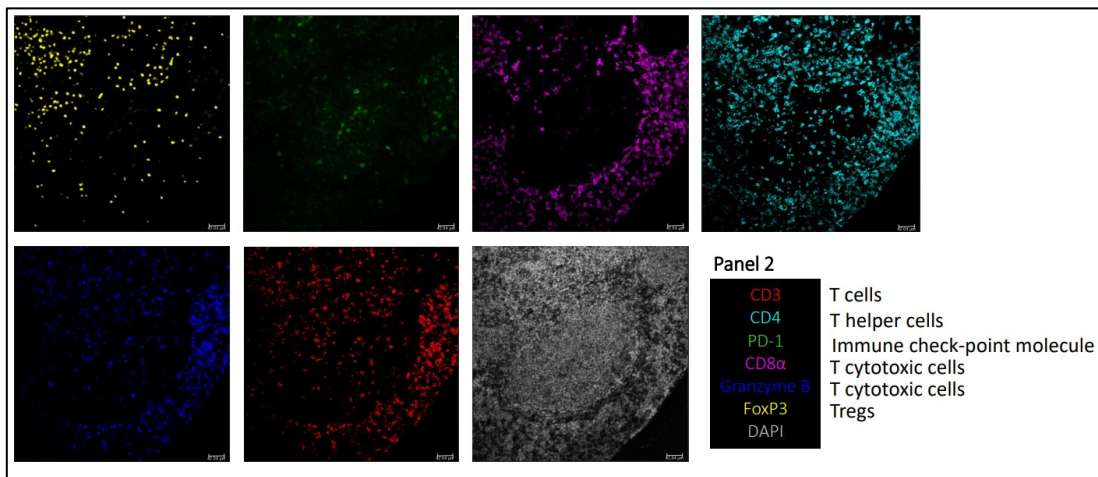


Abbildung 10: Darstellung der Immunmarker aus Panel 2 in der Multiplex-Immunfluoreszenz an Maus-Lymphknotengewebe. Leica TCS SP8 Mikroskop, Vergrößerung: 20x

3.2 Deskriptive Analyse des Kollektivs

In dieser Promotionsarbeit wurde ein Kollektiv bestehend aus 41 Mäusen untersucht. Wie in Tabelle 3 als Überblick dargestellt, wurden 7 KC-Mäuse ($Ptf1aCre^{tg/+};LSL-Kras^{G12D}$) und 34 KPC-Mäuse ($Ptf1aCre^{tg/+};LSL-Kras^{G12D/+};p53^{lox/lox}$ oder $Ptf1aCre^{tg/+};LSL-Kras^{G12D/+};p53^{lox/+}$) in das Kollektiv inkludiert. 13 der Mäuse waren zusätzlich TNC-Knockout Mäuse und 10 POST-Knockout Mäuse. Insgesamt verteilen sich 17 weibliche und 24 männliche Mäuse innerhalb des Kollektivs.

Tabelle 3: Überblick der Zusammensetzung der TMA-Gewebestanzen des transgenen Mauskollektives (n=41)

Genotyp	Anzahl (%)
KRAS+/-, TP53+/+, TNC+/+, POSTN+/+	6 (15%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+})	
KRAS+/-, TP53-/-, TNC+/+, POSTN+/+	12 (29%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{flox/flox})	
KRAS+/-, TP53+/-, TNC-/-, POSTN+/+	4 (10%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{flox/+} ;TNC ^{-/-})	
KRAS+/-, TP53-/-, TNC-/-, POSTN+/+	9 (22%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{flox/flox} ;POSTN ^{+/-} ;TNC ^{-/-})	
KRAS+/-, TP53+/+, TNC+/+, POSTN-/-	1 (2%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;POSTN ^{-/-})	
KRAS+/-, TP53+/-, TNC+/+, POSTN-/-	5 (10%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{flox/+} ;POSTN ^{-/-})	
KRAS+/-, TP53-/-, TNC+/+, POSTN-/-	4 (10%)
(Ptf1aCre ^{tg/+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} ;p53 ^{flox/flox} ;POSTN ^{-/-})	
140 TMA Gewebespots	
Normalgewebe	18
ADM	21
PanIN low grade	31
PDAC (zentrale Tumorregion)	35
PDAC (periphere Tumorregion)	35

Tabelle 4 stellt die Kollektivgröße nach Fällen der einzelnen Läsionen dar. Zusätzlich aufgeführt ist die Altersverteilung in Tagen und das Geschlecht der Mäuse. 140 Gewebestanzten wurden analysiert. Dazu gehören Normalgewebe (n=18), ADM (n=21), PanIN (n=31), PDAC peripher (n=35) und PDAC zentral (n=35).

Tabelle 4: Übersicht Kollektivgröße und Altersverteilung in Tagen (d) der Gewebetypen. Aufgeführt wird die Kollektivgröße nach Normalgewebe (n=18), ADM (n=21), PanIN low grade (n=31), PDAC peripher (n=35) und PDAC zentral (n=35)

		Geschlecht							
		weiblich			Gesamtzahl	männlich			Gesamtzahl
		Maximum	Minimum	Median		Maximum	Minimum	Median	
Diagnose Läsionen	Normalgewebe	195	46	67	5	201	37	140	13
	ADM	467	67	198	11	201	53	105	10
	PanIN low grade	467	46	198	17	466	37	157	14
	PDAC (peripher)	205	46	76	14	466	37	68	21
	PDAC (zentral)	440	46	154	17	174	37	61	18

3.2.1 Immunzellen des angeborenen Immunsystems

Zum angeborenen Immunsystem zählend, wurden Makrophagen und Mastzellen vergleichend für die unterschiedlichen Gewebe im Laufe der Tumorgenese untersucht. Als Mastzellmarker wurde Tryptase genutzt. Als Makrophagenmarker wurde F4/80 sowie CD163 genutzt. Makrophagen machen einen Großteil der Zellen des iME aus. Man spricht in dem Sinne auch von tumor-assoziierten Makrophagen. Sie haben die Funktion der Phagozytose und der Verdauung von körperfremden Stoffen, um schädliche Substanzen zu entfernen [171].

Für Mastzellen wurden paarweise Vergleiche vorgenommen (*Kruskal-Wallis-Test*), die nach anschließender *Dunn-Bonferroni-Korrektur* signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) für ADM – PDAC (zentral) sowie für ADM – PDAC (peripher) als auch für Normalgewebe – PDAC (peripher) feststellen konnten (siehe Abbildung 11). Im Vergleich konnten signifikant erhöhte Zahlen an Mastzellen in PDAC gefunden werden im Vergleich zu ADM ($p < 0,01$) und teilweise auch Normalgewebe. Abbildung 11 stellt diese Ergebnisse als Boxplots mit Median, Minimal- und Maximalwerten unter Kennzeichnung signifikanter Ergebnisse dar.

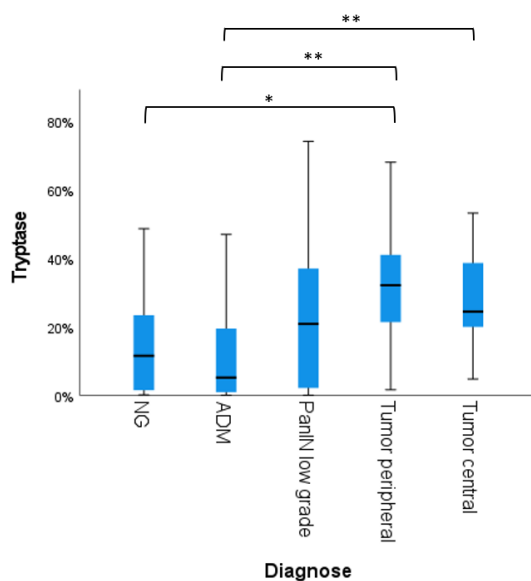


Abbildung 11: Vergleich der Tryptase⁺ Zellen zwischen Normalgewebe (NG), Vorläuferläsionen und Tumorgewebe. Berechnung mittels *Kruskal-Wallis-Test* ($n=131$; $p = 0,05$). Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Für F4/80⁺-Makrophagen konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg ($p = 0,010$) in PDAC-zentral und -peripher im Vergleich zu ADM festgestellt werden. M2-

Makrophagen nehmen dabei einen hohen Anteil ein, jedoch ohne signifikante Zu- oder Abnahme im Verlauf der Tumorgenese (siehe Abbildung 12).

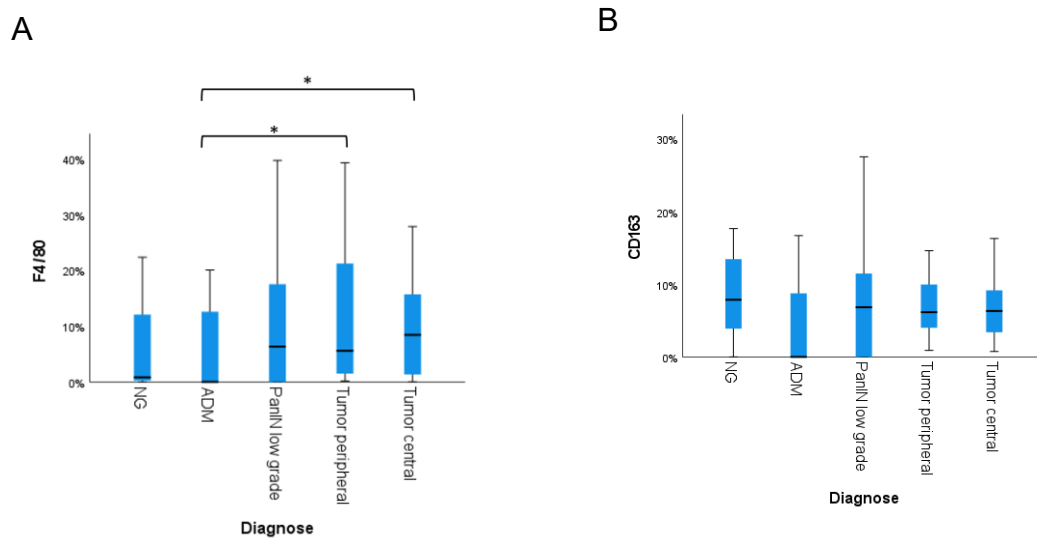


Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der F4/80⁺-Zellen und der CD163⁺-Zellen in Normalgewebe (NG), ADM, PanIN low grade sowie PDAC peripher und zentral. Berechnung mittels *Kruskal-Wallis*-Test. A: F4/80⁺-Makrophagen im Vergleich (n=130; $p < 0,05$). B: CD163⁺-M2-Makrophagen im Vergleich (n = 132; $p > 0,05$). Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Abbildung 13 unterstreicht anhand exemplarischer Multiplexfluoreszenzbilder die zuvor beschriebenen Ergebnisse der statistischen Auswertung der Gewebsmakrophagen im iME. Vor allem zu sehen ist eine Prädominanz der Makrophagen (pink) sowie M2-Makrophagen in PDAC (blau) sowie in Tendenzen in PanIN.

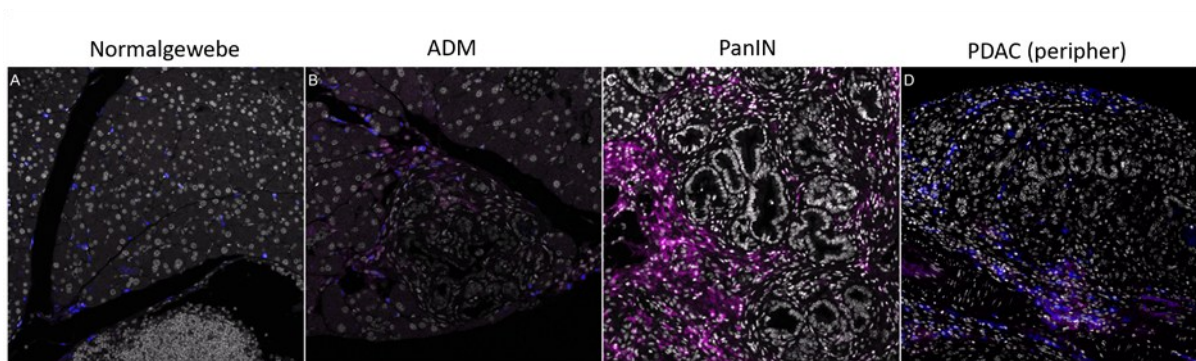


Abbildung 13: Verteilung der M1- und M2-Makrophagen (pink)- und M2-Makrophagen (blau) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie in Normalgewebe (A), ADM (B), PanIN (C) und PDAC peripher (D). Es finden sich mehr F4/80⁺ und CD163⁺-Zellen im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Repräsentative Abbildung. CD163 = blau, F4/80 = pink, DAPI = grau

Abbildung 14 stellt den Anteil der CD163⁺-M2-Makrophagen an den F4/80⁺-Makrophagen (M1 und M2) in Boxplots sowie gestapelten Balkendiagrammen gegenüber. Es finden sich signifikant mehr F4/80⁺- Zellen im PDAC-Gewebe als in ADM ($p < 0,05$).

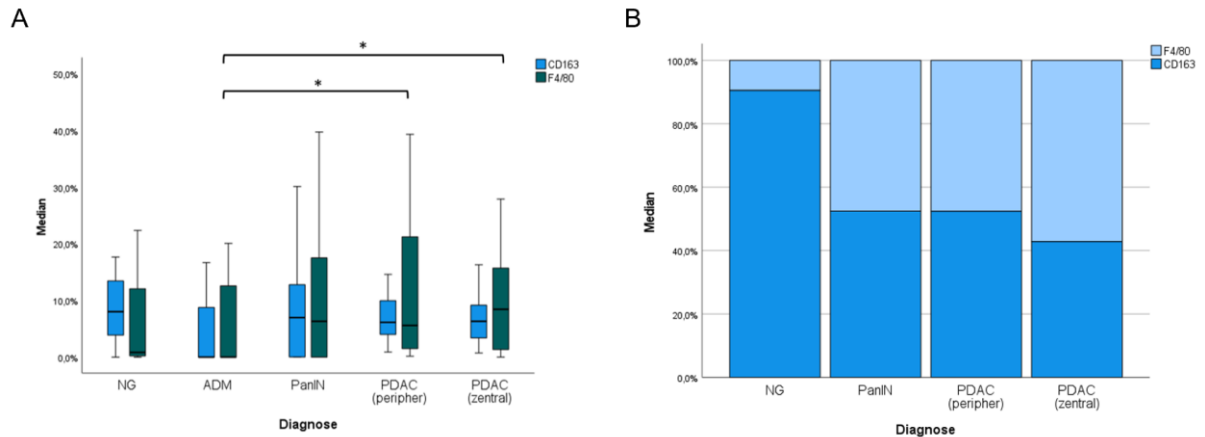


Abbildung 14: Anteil CD163⁺-M2-Makrophagen an F4/80⁺-Gesamtmakrophagen in Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumorgewebe. A: Signifikanter Anstieg der F4/80⁺-Makrophagen in PDAC (zentral und peripher). Kruskal-Wallis-Test mit Boxplot-Darstellung der Mediane, 25. und 75. Perzentile (CD163 = blau; F4/80 = grün). B: Gestapeltes Balkendiagramm mit 100 % Skalierung (CD163 = dunkelblau; F4/80 = hellblau). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.2.2 Erworbenes Immunsystem

Zum erworbenen Immunsystem zählend, wurden T-Zellen und B-Zellen vergleichend für die unterschiedlichen Gewebe im Lauf der Tumorgenese untersucht. Zu den untersuchten CD3⁺-T-Zellen zählen CD4⁺-TH-Zellen, CD8 α ⁺-CTLs und FoxP3⁺-Tregs. CD19⁺-B-Zellen wurden nicht weiter differenziert betrachtet.

Abbildung 15 stellt exemplarische TMA-Ausschnitte mit der Verteilung der CD3⁺-Pan-T-Lymphozyten (rot) in Normalgewebe, PanIN low grade und PDAC peripher dar. Es finden sich mehr CD3⁺-Zellen und FoxP3⁺-Zellen im PDAC-Gewebe als im Normalgewebe.

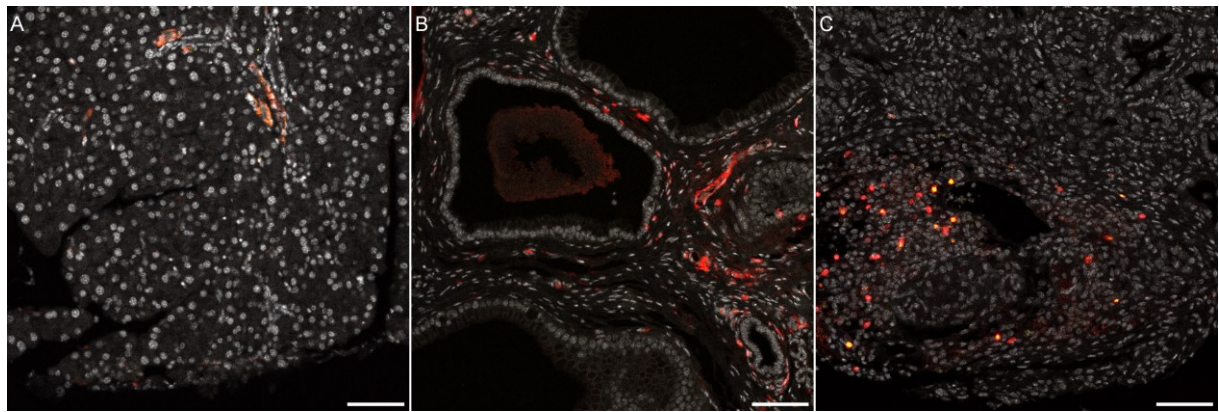


Abbildung 15: Verteilung der CD3⁺-T-Zellen und der FoxP3⁺-Zellen in Normalgewebe (A), in PanIN *low grade* (B) und in PDAC peripher (C). Repräsentative Darstellung. CD3⁺ T-Zellen = rot, FoxP3⁺ T-Zellen = gelb, DAPI = grau

In der Quantifizierung durch *ImageJ* und anschließenden vergleichenden Analyse durch den *Kruskal-Wallis-Test* konnte in den Boxplots gezeigt werden, dass für CD4⁺-T-Lymphozyten die höchsten Prozentzahlen im Median erreicht wurden verglichen mit CD8α⁺-zytotoxischen T-Zellen und FoxP3⁺-Tregs (siehe Abbildung 19). Der Vergleich innerhalb der einzelnen Marker ergab für CD4⁺-Helfer-T-Zellen signifikant erhöhte Zellzahlen in PDAC (zentral) verglichen mit ADM ($p = 0,008$) und in Tendenzen auch in PDAC (zentral) verglichen mit ADM- oder PanIN-Läsionen (siehe Abbildung 16). Abbildung 16 stellt ebenfalls Tendenzen der CD8α⁺-CTLs sowie der FoxP3⁺-Tregs dar. CD8α⁺-CTLs sind in allen Geweben im Median in geringen Prozentzahlen aufzufinden. Es konnten keine signifikanten Zu- oder Abnahmen im Verlauf der Tumorgenese festgestellt werden. Ähnlich imponiert die graphische Darstellung der FoxP3⁺-Tregs mit im Vergleich ebenfalls geringen Anteilen in den untersuchten Geweben. Tendenzen einer Zunahme der FoxP3⁺-Tregs in PanIN und PDAC-Gewebe sind erkennbar.

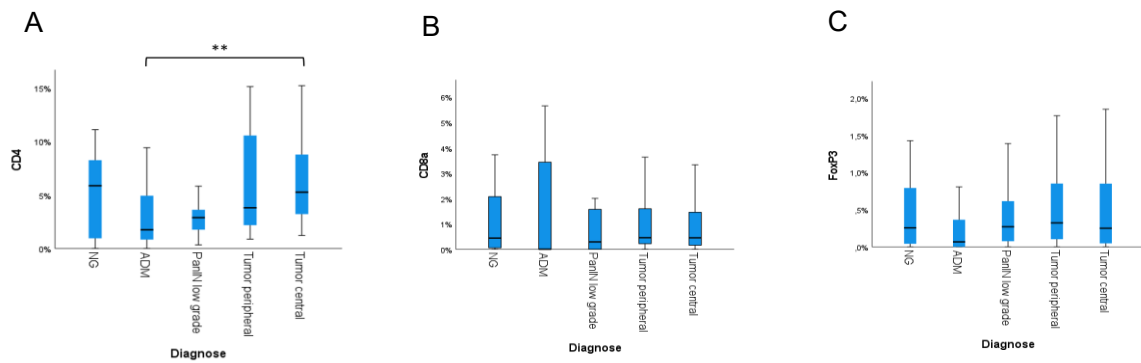


Abbildung 16: Vergleich der CD4⁺-Immunzellen, der CD8α⁺- Immunzellen sowie der FoxP3⁺-Immunzellen in Normalgewebe, in Vorläuferläsionen und in Tumorgewebe. A: CD4⁺-Helfer-T-Zellen im Vergleich (n=123, $p = 0,004$). B: CD8α⁺-Zytotoxische-T-Zellen im Vergleich (n=124, $p > 0,05$). C: FoxP3⁺-Regulatorische-T-Zellen im Vergleich (n=134, $p > 0,05$). Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Das gestapelte Balkendiagramm in Abbildung 17 stellt graphisch den Anteil der FoxP3⁺-Tregs an der Gesamtzahl der CD4⁺-TH-Zellen in 100 % Skalierung dar. Normalgewebe und ADM weisen sehr ähnliche Zahlen auf, wohingegen PanIN und PDAC (peripher) Tendenzen der Erhöhung des Anteils aufweisen.

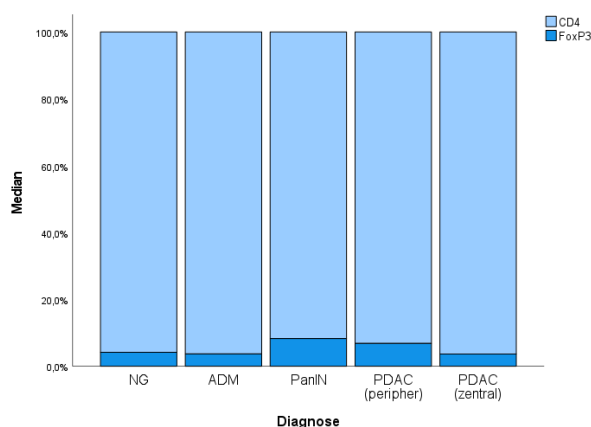


Abbildung 17: Vergleich des Anteils der FoxP3⁺-Regulatorische-T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4⁺-Helfer-T-Zellen in Normalgewebe, in Vorläuferläsionen sowie in Tumorgewebe. Darstellung mittels gestapeltem Balkendiagramm. Median CD4 hellblau, Median FoxP3 dunkelblau. 100 % Skalierung

Die Gegenüberstellung der T- und B-Zell vermittelten Immunreaktion in Vorläuferläsionen des PDAC ergab eine Prädominanz der T-Zell vermittelten Immunantwort v.a. in ADM-Läsionen (siehe Abbildung 18). Weiter fortgeschrittene Läsionen (PanIN) und PDAC-Gewebe verzeichneten anteilsmäßig höhere Zahlen an

B-Zellen, dennoch überwiegt im PDAC weiterhin die T-Zell vermittelte Immunantwort. Lediglich in PanIN überwiegen die B-Zellen die T-Zellen.

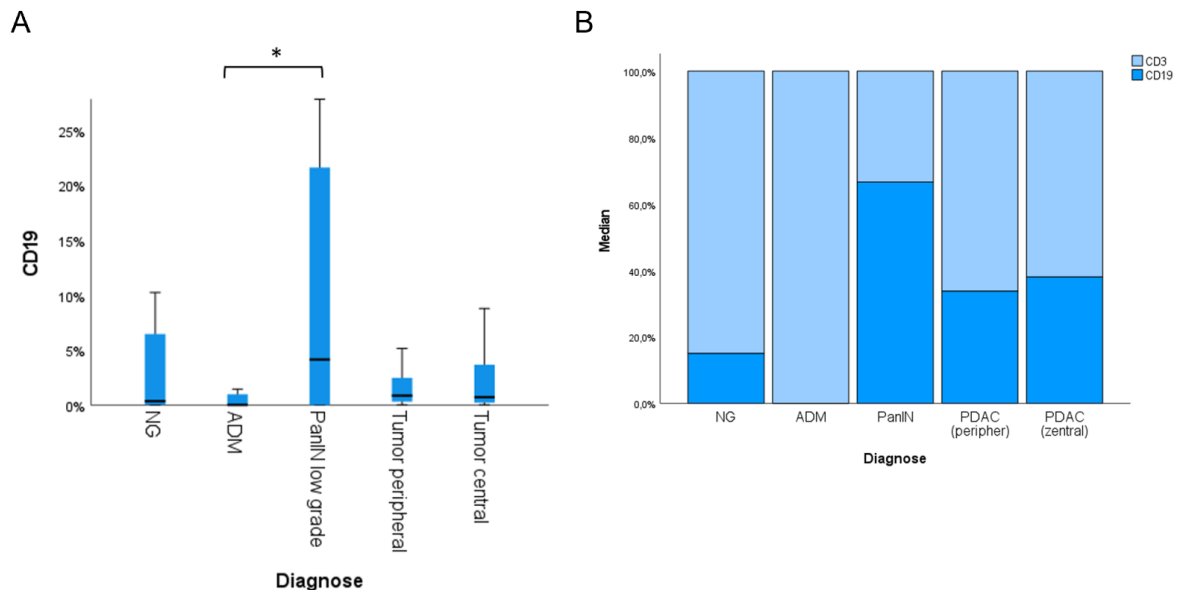


Abbildung 18: Vergleich der CD19⁺- Immunzellen und der CD3⁺- Immunzellen in Normalgewebe, Vorläuferläsionen und in Tumorgewebe. A: Vergleichende Darstellung der CD19⁺-B-Zellen in Normalgewebe (NG), ADM, PanIN low grade und PDAC peripher und zentral. Berechnung mittels *Kruskal-Wallis*-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. B: Anteil CD19⁺-B-Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der CD3⁺-T-Zellen. Gestapeltes Balkendiagramm mit 100 % Skalierung

Die Rolle der zytotoxischen T-Zellen in Vorläuferläsionen des PDAC stellt untenstehende Abbildung 19 dar. CD4⁺-TH-Zellen dominieren die T-Zell-Antwort aller präinvasiven Vorstufen und auch des PDACs. Mit $p < 0,01$ konnte im PDAC (zentral) eine erhöhte Anzahl an CD4⁺-TH-Zellen im Vergleich zu frühen präinvasiven Vorstufen (ADM) gesehen werden. Durchweg entsprechen die Mediane der CD8 α ⁺-CTLs denen der Granzym B⁺-Zellen. Sie unterliegen keinen signifikanten Veränderungen während der Tumorgenese.

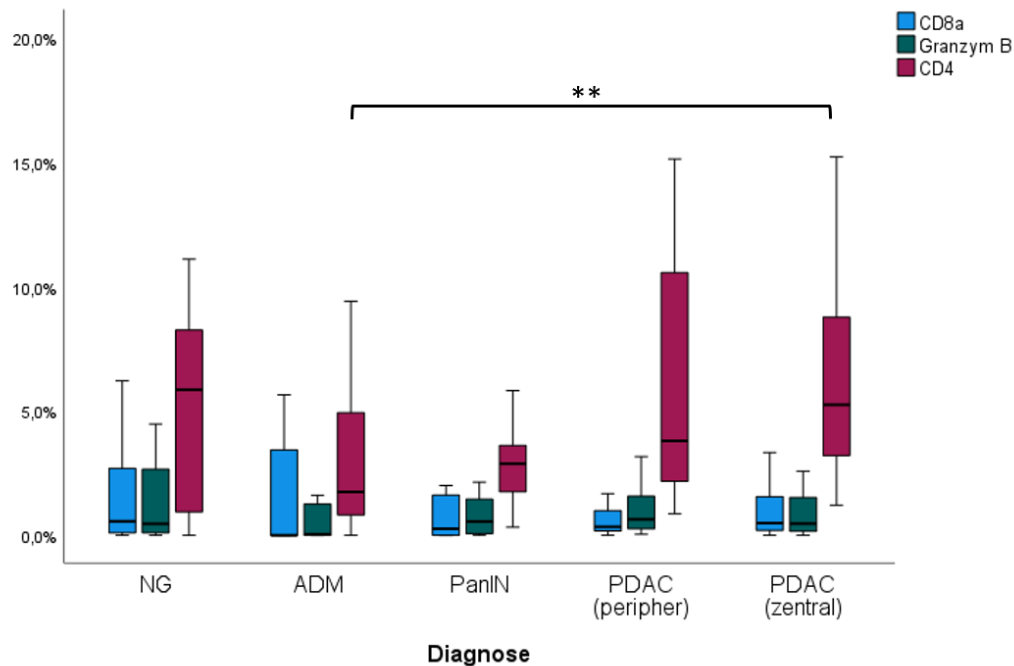


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der CD4⁺-Helfer-T-Zellen (rot), CD8α⁺- Zytotoxischen-T-Zellen (blau) sowie der Granzym B⁺-Zytotoxischen-T-Zellen (grün). Signifikanter Anstieg der CD4⁺-T-Zellen in PDAC zentral verglichen mit ADM ($p < 0,05\%$). Berechnung mittels *Kruskal-Wallis*-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.3 Einflussfaktoren auf Zusammensetzung des iME

Im Folgenden wurde der Einfluss der Genotypen sowie das Geschlecht der Mäuse auf die Verteilung der Immunzellen untersucht. Abbildung 20 stellt den graphischen Zusammenhang zwischen dem Alter der Mäuse in Tagen und dem *Tp53*-Mutationsstatus dar. Dabei wurden Wildtyp-Mäuse (+/+, blau) von Knockout-Mäusen (-/-, grün) und heterozygot-mutierten Mäusen (+/-, rot) unterschieden. Die Kollektivgröße bestand aus *Tp53*-Wildtyp-Mäusen (n=7), aus *Tp53*-heterozygot-mutierten Mäusen (n=9) und aus *Tp53*-Knockout-Mäusen (n=25). Im *Log-Rank-Test* konnte ein signifikanter Unterschied für die Überlebenszeit zwischen den genannten Gruppen festgestellt werden ($p < 0,05$).

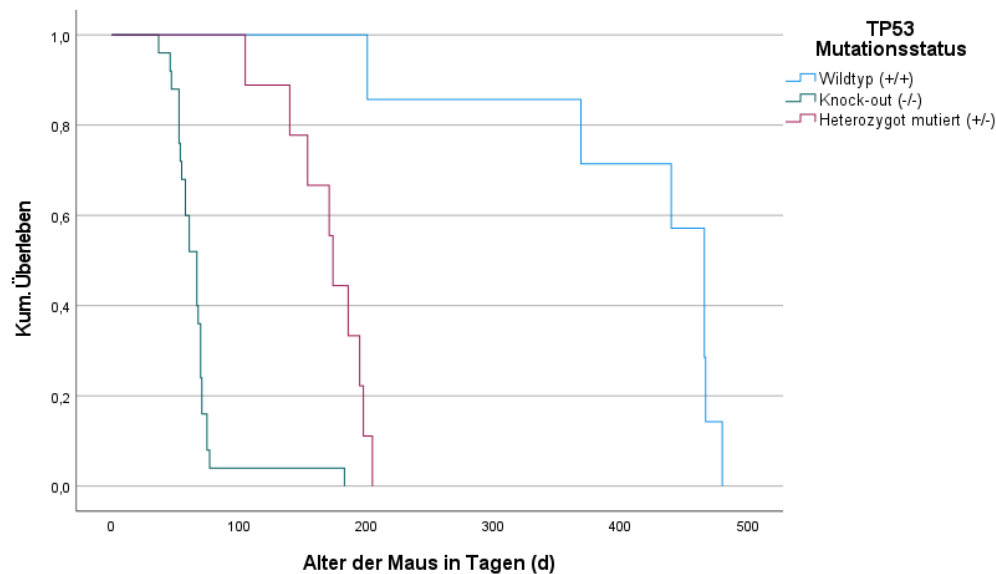


Abbildung 20: Alter der Mäuse in Tagen (d) abhängig vom *Tp53*- Mutationsstaus. Berechnung mittels *Kaplan-Meier*-Analyse ($n=41$, $p < 0,05$)

Ergänzend wurden *Kruskal-Wallis-Tests* durchgeführt, um den Einfluss des *Tp53*-Mutationsstatus auf die Verteilung der Immunzellen genauer zu eruieren. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede, wie Abbildung 21 illustriert. In der vergleichenden graphischen Darstellung zeigten sich vermehrte T-Lymphozyten in Wildtyp-Mäusen verglichen mit Mäusen, die das mutierte *Tp53*-Gen mono- oder biallelisch tragen ($n=134$, $p < 0,05$).

Eine Analyse der Tryptase⁺-Mastzellen ergab im *Kruskal-Wallis-Test* mit anschließender *Bonferroni-Korrektur* ebenfalls signifikante Unterschiede ($n=131$, $p < 0,05$). Jedoch wurden in *TP53-Knockout*-Tieren höhere Zahlen an Mastzellen detektiert als in Wildtyp-Mäusen ($p = 0,028$).

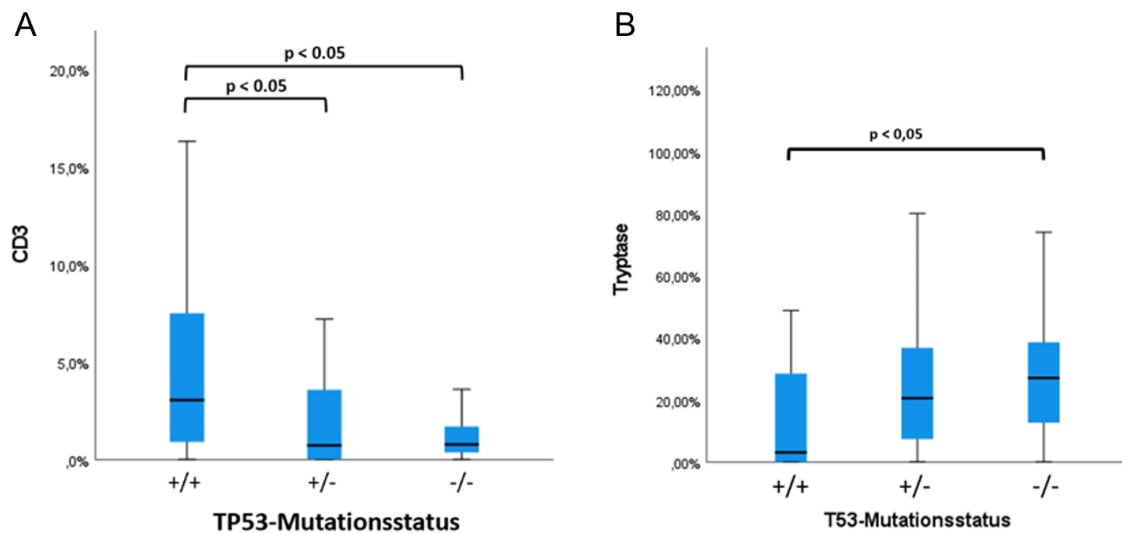


Abbildung 21: Verteilung der CD3⁺-Zellen in PanIN und der Tryptase⁺-Zellen in ADM in Abhängigkeit vom *Tp53*-Mutationsstatus der Mäuse. A: Vergleichende Darstellung Verteilung der CD3⁺-T-Zellen in PanIN abhängig vom *Tp53*-Mutationsstatus (+/+ = Wildtyp; +/- = Heterozygot mutiert; -/- = Knockout). B: Vergleichende Darstellung der Tryptase⁺-Mastzellen in ADM abhängig vom *Tp53*-Mutationsstatus. Berechnung mittels *Kruskal-Wallis*-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Die isolierte Betrachtung der PanIN-Vorläuferläsionen zeigte signifikante Unterschiede in der T-Zell-Antwort ($p = 0,029$, $n=29$) mit signifikant erhöhten CD3⁺-Pan-T-Zellen bei Wildtyp-*Tp53* Mäusen im paarweisen Vergleich mit KO-*Tp53* Mäusen. Ebenso signifikant waren Granzym B⁺-Immunzellen ($p = 0,037$, $n=29$) im Vergleich mit höheren Zahlen in *Tp53*-Wildtyp Mäusen.

Bei der isolierten Betrachtung von ADM-Vorläuferläsionen konnte für Tryptase⁺-Mastzellen ein signifikanter Unterschied abhängig vom *Tp53*-Mutationstatus gefunden werden ($p = 0,013$, $n=20$). Die höchste Anzahl an Tryptase⁺-Mastzellen konnte bei *Tp53*-KO Mäusen gefunden werden. Paarweise Vergleiche ergaben signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und KO-Mäusen ($p = 0,046$) und zwischen Wildtyp und heterozygot mutierten Mäusen ($p = 0,013$).

Für Tumorgewebe konnte kein signifikanter Unterschied der Verteilung der Immunzellen abhängig vom *Tp53*-Mutationsstatus festgestellt werden.

Das Geschlecht hatte im *Kruskal-Wallis*-Test keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der Immunzellen.

Das EZM-Protein POSTN zeigten im *Kruskal-Wallis-Test* einen Einfluss auf die Verteilung der T-Zellen, wobei hier auch das *Kras*- und *Tp53* Mutationsstatus miteinfließt: Es konnten signifikant erhöhte Anzahlen von CD3- und CD4-T-Zellen in POSTN Wildtyp (Ptf1aCre^{tg/+};LSL-Kras^{G12D/+};p53^{flox/flox}) festgestellt werden im Vergleich zur POSTN Knock-out ($p < 0,05$). Für TNC konnte kein signifikanter Einfluss auf die Immunzellverteilung festgestellt werden.

4 Diskussion

In dieser Promotionsarbeit wurde die Zusammensetzung der immunologischen Mikroumgebung im Verlauf der Tumorentstehung des PDAC im Mausmodell untersucht. Zu den untersuchten Vorläuferläsionen zählen die ADM und die PanIN. In dieser Promotionsarbeit konnten folgende Kernaussagen getroffen werden:

1. Während der Tumorgenese stellt das immunologische Mikromilieu einen dynamischen und heterogenen Prozess über die Entwicklung der unterschiedlichen Tumovorläuferläsionen dar, was auf eine aktive Rolle der Immunzellen bei der PDAC-Progression hindeutet.
2. Die Anzahl der Immunzellen zeigte sich im Allgemeinen höher in PanIN und PDAC verglichen mit Normalgewebe und teilweise ADM.
3. PanIN zeigten höhere Zahlen an CD19⁺-B-Zellen als Normalgewebe und ADM.
4. Im PDAC dominieren Zellen des angeborenen Immunsystems wie F4/80⁺-Makrophagen mit höheren Zahlen als in ADM und Normalgewebe.
5. In PDAC herrscht ein vorwiegend immunsuppressives Mikromilieu, welches durch tendenziell höhere FoxP3⁺-Tregs, CD8⁺-CTLs und CD4⁺-Helfer-T-Zellen dominiert wird.
6. Der genetische Hintergrund der GEMM offenbart einen potenziellen Einfluss des TP53-Mutationsstatus auf die Zusammensetzung des iME.

Teile der zuvor beschriebenen Ergebnisse (siehe Kapitel 3) stimmen mit vorheriger Literatur überein. Im Folgenden werden die eigenen erhobene Ergebnisse in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext gesetzt. Vor allem wird dabei der Fokus auf die Rolle der T- und B-zellvermittelten Immunreaktion in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms gelegt. Weiterhin wird die Rolle der zytotoxischen und Effektor-T-Zellen in Vorläuferläsionen des PDAC diskutiert und auf die Rolle der M1- und M2-polarisierten Makrophagen in Vorläuferläsionen des PDAC eingegangen.

4.1 Die Rolle des Immun-Mikromilieus im Laufe der Tumorgenese

Bislang existieren nur wenige Untersuchungen zur Tumorgenese des PDACs. Immunzellen stellen einen wichtigen Teil des iME dar, da sie zur inter- und intra-

tumoralen Heterogenität beitragen und einer dynamischen Beziehung mit epithelialen Zellen unterliegen [63].

4.1.1 Verteilung der B- und T-Zellen in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms

Lymphozyten zählen zum adaptiven Immunsystem und infiltrieren bekanntermaßen Tumorgewebe. An dieser Stelle wird auf die Rolle der B- und T-zellvermittelten Immunreaktion in Vorläuferläsionen des PDAC eingegangen. In dieser Promotionsarbeit wurden generell in allen pankreatischen Geweben geringe Mengen an CD8 α^+ -T-Zellen gefunden, so auch in den präinvasiven Vorstufen ADM und PanIN. Dies konnte auch in Organoid-Modellen gezeigt werden [172]. Es konnten in der Promotionsarbeit keine signifikanten Anstiege der CTLs in Tumorgewebe festgestellt werden, was auf inhibitorische Signale und T-Zell-Ausschluss hindeutet. Dieser T-Zell-Ausschluss konnte in Studien von *Ino et al.* [173] mit schlechteren Überlebenszeiten in humanen Pankreaskarzinomen korreliert werden. Im Detail stellten die Autoren fest, dass im PDAC die Funktion von TH1- und CTLs im Allgemeinen beeinträchtigt ist, während die Funktion von TH2- und Treg-Zellen verstärkt ist. Dementsprechend haben PDAC-Patienten in dieser Studie mit einer hohen Anzahl von TH1- und zytotoxischen T-Zellen eine gute Prognose und Patienten mit niedrigen Anzahlen von TH1- und CTLs eine schlechte Prognose. Durch diese Forschungsarbeit konnten übereinstimmend damit höhere Zahlen an TH2-Zellen in Tumorgewebe detektiert werden und niedrigere Zahlen der CTLs. Es zeigten sich für Tregs keine statistisch signifikanten Anstiege in Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe und zu Vorläuferläsionen. In niedrigen Zahlen konnten Tregs jedoch durchweg in ADM, PanIN und PDAC nachgewiesen werden. Die Differenzierung von TIL in Tregs wird durch immunsuppressive Liganden reguliert (TGF- β , IL-10 und IL-2) [174]. Generell ist der Tumor in der Lage, über die Expression von 2,3-Dioxygenase die Differenzierung von TIL in Tregs zu fördern. Tregs sind vor allem im juxtastromalen Kompartiment vorhanden, wo sie die Aktivität zytotoxischer T-Zellen hemmen und somit eine effektive antitumorale Immunantwort im Sinne einer „Immune Escape“ zu unterdrücken [175]. Der „Immune-Escape“-Mechanismus beschreibt die Fähigkeit des Tumors, einer effektiven Immunüberwachung zu entgehen und dadurch sein Wachstum und den Tumorprogress zu invasiven Stadien zu begünstigen. Wir konnten also zeigen, dass bereits in präinvasiven Vorstufen wie ADM und PanIN Hinweise für

immunmodulatorische Prozesse im Sinne von Prozesse im Sinne von „Immune-Escape“- Mechanismen vorliegen. Diese Erkenntnis liefert Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen, die auf eine Reaktivierung der antitumoralen Immunantwort abzielen könnten.

4.1.2 Verteilung der Makrophagen in Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms

Zu der anderen (myeloischen) Zelllinie des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen. M1- und M2-Makrophagen spielen in allen untersuchten Geweben dieser Promotionsarbeit quantitativ eine wichtige Rolle. Während des Fortschreitens des PDAC konnte jedoch keine Prädominanz der M2-polarisierten Makrophagen festgestellt werden, wie sie beispielsweise *Liou et al.* [109, 111, 176] für humanes und murines Gewebe nachweisen konnten. Wir fanden aber eine signifikante Zunahme der F4/80⁺-Makrophagen im gesamten PDAC-Gewebe verglichen mit frühen präinvasiven Vorstufen (ADM). Vor allem M2-Makrophagen, die prozentuell einen relativen hohen Anteil in allen Geweben ausmachen, stehen im Verdacht für den oben genannten T-Zell-Ausschluss verantwortlich zu sein [172]. *Ruffell et al.* zeigten, dass M1-Makrophagen an Orten chronischer Entzündungen, an denen sich Tumoren entwickeln, reichlich vorhanden sind, während Makrophagen in etablierten Tumoren zu einem tumorfördernden M2-ähnlichen Phänotyp wechseln [177]. In dieser Promotionsarbeit konnten ebenfalls vermehrt Makrophagen in Vorläuferläsionen und Tumorgewebe gefunden werden. Es konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass myeloische Zellen eine wichtige Rolle im PDAC-Progress spielen. Neben den konventionellen M1- und M2 polarisierten Makrophagen bestehen TAMs aus weiteren Subpopulationen [177], die in dieser Arbeit nicht gesondert untersucht wurden und unter die F4/80⁺-Makrophagen fallen. In PanIN und PDAC zeigten sich in dieser Promotionsarbeit ähnlich hohe Mengen an M2-Makrophagen, in ADM jedoch tendenziell weniger, was prinzipiell zu den Ergebnissen von *Biswas et al.* [178] passt. *Biswas et al.* beschreiben die bemerkenswerte Plastizität der Makrophagen in verschiedenen Schritten des Tumorwachstums, wobei es im Verlauf der Tumorprogression zu einem „Switch“ in den Makrophagenphänotypen komme. Während der Tumorinitiation würde der Phänotyp für chronisch Entzündung prädisponieren. In der Folge verschiebe sich der Phänotyp stärker in Richtung eines

immunsuppressiven Typs. Der NF- κ B-Signalweg scheint entscheidend für den Phänotypwechsel von TAM.

4.1.3 Einfluss des genetischen Hintergrundes auf das Immunmikromilieu der Vorläuferläsionen des duktalen Pankreaskarzinoms

Wir konnten im Hinblick auf *KRAS* (+/-)- und *Tp53*-mutierten Mäuse einen signifikanten Einfluss des Genotyps auf die Verteilung der T-Zellen des adaptiven Immunsystems finden. Im Vergleich zu *Tp53*-Wildtyp Mäusen konnten wir in dieser Promotionsarbeit geringere Anzahlen der T-Zellen in heterozygoten Knockout-Mäusen (*Tp53* +/-) oder homozygoten Knockout-Mäusen (*Tp53* -/-) finden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen verschiedene Arbeiten [179-182], die *Braun et al.* [183] in Bezug auf CTLs in ihrem Review zusammenstellen. Sie bezogen sich auf die Fähigkeit des Tumorsuppressors *p53* mit dem adaptiven Immunsystem zu kommunizieren und die Immunantwort der CTLs regulieren zu können. Bei Inaktivität des Tumorsuppressors *p53* kommt es demnach zu verringerten Aktivierungen und dadurch zu einer verringerten T-Zell-Antwort auf die Krebszellen. Folglich ist auch das immuntherapeutische Ansprechen erniedrigt. Im Gegensatz dazu ist *p53* (Wildtyp) in der Lage, über Haupt-Histokompatibilitätskomplexe (MHC) der Klasse I des Antigenpräsentationsweges die Apoptose der Krebszellen einzuleiten [179, 181]. Daran beteiligt sind Regulierungen der Immuncheckpoint-Proteine wie u.a. PD-L1 [180, 184] und Fas/APO-1 [182, 185] als Apoptose-Signalrezeptor. Weiterführende Forschung ist notwendig den genauen Einfluss der genetischen Aberrationen des PDAC auf das Immunsystem zu verstehen.

Zur Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Matrix-Proteine Tenascin-C (TNC) und Periostin (POSTN) auf die Pankreaskarzinogenese wurden transgene Mäuse mit einem zusätzlichen Knockout dieser Proteine in die Studie aufgenommen. Trotz bekannter immunmodulatorischer Funktionen [84, 85, 98] zeigten sich in diesem Modell keine signifikanten Effekte auf das Tumorstadium. Die durchgeführte quantitative Analyse des immunologischen Mikromilieus (iME) könnte jedoch qualitative oder räumliche Veränderungen übersehen haben. Ein möglicher Mechanismus der TNC-vermittelten Immunsuppression ist beispielsweise das Ausschließen von CD8⁺ T-Zellen aus dem Tumorgewebe, was nicht zwangsläufig mit einer veränderten Zellzahl einhergeht und durch die angewandten Methoden nicht erfasst wurde. Auch eine mögliche Aktivierung immunrelevanter Gene durch TNC oder

die postulierte Rekrutierung von M2-Makrophagen durch POSTN blieben möglicherweise unentdeckt, da entsprechende Zelltypen selten vorkamen.

4.2 Übertragbarkeit auf humane Pankreaskarzinome und Anwendbarkeit im Klinikalltag

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Mausmodellen auf das humane Pankreaskarzinom stellt eine zentrale Hausforderung der onkologischen Forschung dar. Obwohl Mausmodelle essenzielle Einblicke in die Tumorbiologie, Genetik und Interaktionen mit dem Mikromilieu ermöglichen, bilden sie die komplexe Heterogenität des humanen Pankreaskarzinoms nicht perfekt ab. Insbesondere Spezies-spezifische Unterschiede im Immunmilieu, in der genetischen Diversität sowie der Exposition gegenüber Umweltfaktoren können die Relevanz für den Menschen begrenzen. Dennoch leisten Mausmodelle insbesondere für die Grundlagenforschung und die Untersuchung der frühen Phase der Karzinogenese einen wichtigen Beitrag.

Mausmodelle des Pankreaskarzinoms, insbesondere die von uns verwendeten Mauslinien, spiegeln viele der genetischen und histopathologischen Merkmale des menschlichen Pankreaskarzinoms wider, insbesondere die häufigsten Mutationen (*KRAS* und *Tp53*). Mausmodelle weisen eine ähnliche Tumorprogression und Mikroumgebung auf. Immunantworten können sich jedoch auch unterscheiden. In der Zusammensetzung und Funktionalität unterscheiden sich beispielsweise die T-Zell-Aktivierung [186]. Daher sind potenziell auch unterschiedliche Immunantworten und unterschiedliche Reaktionen auf Immuntherapien denkbar.

Bisher besteht das vorwiegende Therapieregime in fortgeschrittenen Stadien derzeit primär aus der Applikation von Chemotherapeutika oder einer kombinierten Radiochemotherapie. Die Therapien bieten allerdings nur wenige Monate an Lebensverlängerung für die Patienten [15]. Mit Hilfe des Mausmodells erhofft man sich so das Tumormikromilieu besser charakterisieren zu können und neue Ansatzpunkte zu finden. Bisher wurden bereits Metalloproteinase-Inhibitoren oder Ansätze zum Abbau von Hyaluron als Bestandteil der EZM untersucht. Auch diese Ansätze blieben bisher ohne großen Erfolg [187, 188]. Es ist anzunehmen, dass durch die veränderte EZM der soliden Pankreaskarzinomen mit abnormalen Blut- und Lymphgefäßen, reaktiven Veränderungen des Stromas und entzündlichen Veränderungen die

Perfusion die Wirksamkeit der Therapeutika eingeschränkt sind. Aufgrund der Heterogenität der Tumorerkrankung sowie der Dynamik während der Tumorgenese existieren – neben der gültigen hauptsächlich auf Histomorphologie und Markerexpression basierenden WHO-Klassifikation – für das humane Pankreaskarzinom mehrere vorgeschlagene Klassifikationssysteme, die auf molekularen Analysen aufbauen. Diese wurden in der Hoffnung entwickelt, die Prognose von Patienten besser einschätzen zu können und den Patienten eine besser auf ihren spezifischen Tumor zugeschnittene Therapie zukommen lassen zu können [58, 63, 189-192]. *Moffitt et al. 2015* [191] analysierten spezifische Genexpressionsmuster und identifizierten damit zwei Subtypen: den klassischen Subtyp und den basalen Subtypen. Der basale Subtyp konnte mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert werden. Der klassische Subtyp ähnelt sehr dem von *Collisson et al. 2011* [190]. Zusätzlich konnten *Moffitt et al.* [191] zwei Stroma-Subtypen definieren: normal und aktiviert. Das aktivierte Stroma zeichnet sich durch erhöhte Entzündungsaktivität aus, was mit Makrophagen und Chemokinen einhergeht. Die aktivierten Stroma-Subtypen trugen zu einer schlechteren Prognose bei. Interessanterweise bestehen die identifizierten Subtypen der zuvor beschriebenen Studien aus einer Kombination aus genetischen Expressionsprofilen und immunologischen Kernmerkmalen, die sich auf die Prognose der Patienten auswirken können.

In diversen Tumorentitäten haben sich Immuntherapien mittlerweile bewährt, wie beispielsweise bei Melanomen oder den Bronchialkarzinomen [193-197]. In Bezug auf die Therapie des Pankreaskarzinoms bieten sie das Potential die begrenzte Wirksamkeit konventioneller Therapieansätze zu ergänzen. Dennoch bleibt der bahnbrechende Erfolg zur Verbesserung der Prognose beim PDAC aus. Lediglich bei einer kleinen Untergruppe (1 – 2 %) konnten Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt werden, sofern eine Mikrosatelliteninstabilität vorliegt [24, 25]. Ursächlich dafür könnte zum einen das desmoplastische Stroma mitsamt der immunsuppressiven Immunzellen sein, aber auch die niedrige Zahl an Neoantigenen und die damit verbundene geringe Zahl an infiltrierenden zytotoxischen T-Zellen [66].

Da der Erfolg der Immun-Checkpoint-Inhibitoren weitestgehend ausbleibt, stellt sich die Frage nach der chimären Antigenrezeptor-T-Zelltherapie (CAR-T-Zelltherapie). Bei dieser Therapieform werden gentechnisch veränderte T-Zellen eingesetzt, die auf spezifische krebsassoziierte Antigene programmiert werden, um eine starke

zytotoxische Wirkung zu erzielen [198]. In Bezug auf hämatologische Erkrankungen konnten bereits Erfolge in der Therapie erzielt werden [199].

Einen weiteren therapeutischen Ansatz bieten TAMs mit dem Ziel, diese zu reprogrammieren [200], da sie Einfluss auf den Umbau der EZM haben. Niedrig dosierte Bestrahlung von Xenotransplantationsmausmodellen programmierte M2- zu M1-polarisierten Makrophagen um, was schließlich zu einer Rekrutierung von Effektor-T-Zellen führte. In ähnlicher Weise modulierten *Caro et al.* [201] eine adjuvante Chemotherapie auf Gemcitabin-Basis bei PDAC-Patienten die Makrophagen-Polarisierung in Richtung eines M1-polarisierten Phänotyps und aktivierte zytotoxische Genexpressionsprogramme, die mit einem besseren klinischen Ergebnis korrelierten.

TAM und myeloide Suppressorzellen fördern die Metastasierung und eine Resistenz gegen Chemotherapien. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Abschwächung dieser Immunzellen durch die Hemmung der Signalübertragung durch CSF1R (myeloischer Wachstumsfaktorrezeptor). Hierdurch könnte die Antigenpräsentation und produktive Antitumor-T-Zell-Reaktionen verbessert werden [202].

Insgesamt scheint es aufgrund der bereits dargelegten sehr limitierten therapeutischen Optionen sinnvoll, bereits bei den Vorläuferläsionen zu intervenieren. Zur tiefgreifenderen Untersuchung eignet sich hier das Mausmodell. Beim Menschen ist die Früherkennung der Vorläuferläsionen weiterhin erschwert, da insbesondere ADM und PanIN inapparent verlaufen [15, 203]. Die Hoffnung besteht darin, dass in Zukunft eine Früherkennung der Vorläuferläsionen möglich sein könnte, beispielsweise durch *liquid biopsy* basierte Ansätze [204].

4.3 Limitationen und Herausforderungen der Studie

Die gewonnen Erkenntnisse der vorliegenden Studie weisen methodisch mögliche Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten.

Einschränkungen der Studie ergaben sich durch die Zusammenstellung des Kollektivs. Die Kollektivgröße mit insgesamt 41 Mäusen ist limitiert, deckt aber die bedeutsamsten genetischen Aberrationen – die Mutationen von *Kras* und *Tp53* – ab. Bei jedem Fall wurden die Vorläuferläsionen histologisch identifiziert und möglichst mehrere Vorläuferläsionen eines Falls (sofern vorhanden) gestanzt. So konnte aus jedem

einzelnen Fall möglichst viel Informationsgewinn gezogen werden mit schlussendlich 140 untersuchten Gewebsstanzen. Dennoch wäre eine Ausweitung der Kollektivgröße in Zukunft wünschenswert mit Einschluss seltenerer Läsionen oder genetischer Aberrationen.

Die gewählte Methodik der Konstruktion von TMAs bietet wesentliche Vorteile: So ermöglicht der Einsatz von TMAs, mit einer geringen Menge an Gewebematerial unter identischen Färbebedingungen zu arbeiten. Hierdurch wird eine hohe Vergleichbarkeit und interne Konsistenz erzielt. Durch die gezielte Auswahl der Stanzzyylindergröße war es möglich unter Aufsicht von Pathologen, das Zielgewebe als auch die unmittelbare Mikroumgebung zuverlässig zu beurteilen. Dennoch stellen TMAs nur einen kleinen Ausschnitt dar und niemals das gesamte Pankreasgewebe der Mausfälle. Damit besteht das Risiko, dass relevante Heterogenitäten innerhalb des Tumorgewebes unberücksichtigt bleiben. Die Auswahl der Gewebeabschnitte für die TMAs wurde unter Aufsicht von Pathologen erstellt, sodass eine größtmögliche Repräsentativität gewährleistet werden kann.

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit beruhen auf der TSA-Multiplex-Immunfluoreszenzmethode. Die TSA-Multiplex-Immunfluoreszenz-Methode ist der klassischen Immunhistochemie darin überlegen, dass sie die Möglichkeit bietet, sehr sensitiv Kolo-kalisationen auch in der gleichen Zelle nachzuweisen. Auch sind hochauflösende Aufnahmen durch die Nutzung von STED-Mikroskopen (Engl.: *Stimulated Emission Depletion*), SSIM-Mikroskopen (Engl.: *Structured Illumination Microscope*) und FPALM-Mikroskopen (Engl.: *Photoactivated Localization Microscopy*) möglich. Jedoch weist die Methodik gegenüber der klassischen Immunhistochemie auch Nachteile auf. Dazu zählt zum einen die Problematik des *Photobleachings*, der Autofluoreszenz und dem Verlust der Fluoreszenzintensität über die Zeit. Als *Photobleaching* wird der permanente Verlust der Fluoreszenz bezeichnet, der durch die Bestrahlung des Fluorophors mit Anregungslicht entsteht [205]. Langzeitlagerungen der Schnitte sind nicht möglich. Die klassische Immunhistochemie als konventionelle indirekte Nachweismethode von Proteinlokalisationen bietet in der pathologischen Routine viele Vorteile, denn sie wurde bereits für automatische Probenverarbeitungsgeräte (Engl.: *Autostainer*) etabliert und bietet somit einen hohen Umsatz an Färbungen in kurzer Zeit an. Dadurch eignet sich diese Methodik besonders für die pathologische „Routine“. Die Chromogen-Färbungen weisen eine deutlich längere Halbwertszeit auf als die Multiplex-Immunfluoreszenzfärbungen und

sind damit auch für Langzeitlagerungen geeignet. Sie ist auch deutlich kostengünstiger und die Aufnahme und Analyse der Bilder erfordert lediglich ein Hellfeldmikroskop. Limitationen stellen die Sensitivität bei weniger häufigen Antigenen dar sowie die Limitation der Multiplexfärbung von maximal 3 durch Chromogenüberlappungen, Hintergrundfärbungen und Kreuzreaktionen. Somit stellt die Multiplex-Immunfluoreszenzfärbung eine geeignete reproduzierbare Methode für die simultane Färbung verschiedener Immunmarker an derselben Zelle dar.

Es gilt jedoch zu beachten, dass die Wahl der Antikörperverschüttung und der Färbemethode entscheidend für die quantitative und qualitative Aussagekraft immunhistochemischer Analysen sind. Es ist notwendig die Antikörper sorgfältig zu validieren, da es sonst zu fehlerhaften Interpretationen führen kann. Außerdem beruht die Bewertung auf subjektivem visuellem Scoring und hat schließlich Einfluss auf die Validität der Ergebnisse.

Zukünftige Studien mit hochauflösenden Verfahren wie Einzelzell-RNA-Sequenzierung oder räumlicher Transkriptomanalyse könnten funktionelle Veränderungen, seltene Zellpopulationen sowie kompensatorische Mechanismen — etwa die Hochregulation anderer ECM-Proteine — besser identifizieren.

Eine weitere Limitation stellt die Auswertung dar. Die Auswertung der einzelnen Marker erfolgte über eine automatisierte Zählmethodik, die *Macros*. Jeder Marker wurde eigenständig ausgewertet aufgrund der individuellen Intensitäten der Färbung, der individuellen Morphologie und Größe der positiven Zellen und der unterschiedlich ausgeprägten Hintergrundfärbung. Zum einen bieten automatisierte Verfahren mit *Macros* eine große Zeitersparnis und Objektivierbarkeit der Zählmethodik, dennoch sind Abzüge in der Genauigkeit der Auszählungen zu machen, da sich die Gewebe unterscheiden, so auch die Intensitäten der Färbungen auf einem TMA. Die einzelnen Marker wurden in dieser Promotionsarbeit quantifiziert, jedoch wären ergänzende Untersuchungen zur Funktionalität der Immunzellen bedeutsam.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Auswertung von murinem Pankreasgewebe. Das verwendete Mausmodell rekapituliert jedoch nur teilweise die frühen präinvasiven Läsionen bis hin zu den metastasierenden Karzinomen. Die genetischen Aberrationen entsprechen den häufigsten beim PDAC beschriebenen Aberrationen des Menschen. Da aber nur ein begrenzter Bereich der genomischen Veränderungen im Mausmodell vorzufinden ist (*Kras*, *Tp53*, *POSTN*, *TNC*), können viele weitere im Menschen beschriebenen Mutationen oder epigenetischen Veränderungen in dieser

Promotionsarbeit nicht berücksichtigt werden. Somit können wir den potenziellen genetischen Einfluss anderer genetischer Aberrationen auf das iME nicht ausschließen. In unserem Mausmodell werden IPMN und MCN nicht abgebildet. Besonders IPMN haben eine große klinische Relevanz beim Menschen, da sich bei MD-IPMN und größeren BD-IPMN je nach Risikomerkmale bzw. klinischer Situation eine direkte leitliniengerechte chirurgische Therapiekonsequenz ergibt. Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass Erkenntnisse präklinischer Mausmodelle im Hinblick auf das Immunmilieu einige übertragbare Ähnlichkeiten auf den Menschen aufweisen, sich jedoch auch unterscheiden können. Es bleibt bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass immunologische Mechanismen in Mausmodellen nicht in allen Aspekten die Komplexität des menschlichen Immunsystems widerspiegeln.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Nach wie vor stellt das PDAC durch eine späte Diagnosestellung eine hochmaligne Tumorentität mit schlechter Prognose dar. Therapeutische Optionen sind limitiert. Forschung der letzten Jahre haben Ansätze für personalisierte Therapien anhand von molekularen Subtypen geliefert und das Verständnis der Tumorgenese verbessert. Dennoch fehlen neue therapeutische Ansätze und eine ausführliche Charakterisierung des iME.

Diese Promotionsarbeit leistet besonders in Hinblick auf die Charakterisierung des murinen iME einen wichtigen Beitrag. Es konnte gezeigt werden, dass myeloische Zellen v.a. die Makrophagen eine dominierende Zellpopulation des iME darstellen. Zur Detektion möglicher diagnostischer Klassifizierungen oder therapeutischer Interventionen wären weitere Studien in diesem Bereich gerechtfertigt.

Neben der quantitativen Analyse des iME wären in Zukunft ergänzende qualitative Analysen zur Funktionalität der Immunzellen interessant, um die genauen „*immune escape*“-Mechanismen verstehen zu können. Auch müssten dazu die genauen Interaktionen untereinander betrachtet werden.

Neben der Funktionalität der Immunzellen könnte eine ergänzende Untersuchung weiterer Marker für Th17-Lymphozyten, Bregs, Neutrophile Granulozyten, CTLA-4 und PD-L sinnvoll sein. Höhere Frequenzen von Th17-Zellen fördern laut *Gnerlich et al.* [206] und *He et al.* [207] die Angiogenese und die Bildung von Lymphknotenmetastasen und korrelieren aber auch mit erhöhten zytotoxischen T-Zell-

Populationen, was das Überleben verbessert. Sie stellen somit in diesem Kontext eine weitere sehr interessante T-Zellpopulation dar.

In Zukunft ist ebenfalls ein Vergleich mit humanen Charakterisierungsdaten des PDAC und seiner Vorläuferläsionen vorgesehen. Man erhofft sich so, weitere Erkenntnisse über die Zusammensetzung des iME zu gewinnen. Ebenfalls finden aktuell Untersuchungen zu zusätzlichen Stromamarkern statt, die detailliertere Daten zur Zusammensetzung des Stromas liefern könnten. In Zukunft erhofft man sich so, die Prognose des PDAC verbessern zu können.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Ilic, M. and I. Ilic, *Epidemiology of pancreatic cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(44): p. 9694-9705.
2. Siegel, R.L., A.N. Giaquinto, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2024*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024. **74**(1): p. 12-49.
3. Jemal, A., et al., *Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2017. **109**(9).
4. e.V., G.d.e.K.i.D., *Krebs in Deutschland 2009/2010*, in *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2013.
5. Rawla, P., T. Sunkara, and V. Gaduputi, *Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors*. World J Oncol, 2019. **10**(1): p. 10-27.
6. Blot, W.J., *Alcohol and cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(7 Suppl): p. 2119s-2123s.
7. Delitto, D., et al., *Nicotine Reduces Survival via Augmentation of Paracrine HGF-MET Signaling in the Pancreatic Cancer Microenvironment*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(7): p. 1787-99.
8. Gapstur, S.M., et al., *Association of alcohol intake with pancreatic cancer mortality in never smokers*. Arch Intern Med, 2011. **171**(5): p. 444-51.
9. Olson, S.H., et al., *Allergies, obesity, other risk factors and survival from pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(10): p. 2412-9.
10. Orth, M., et al., *Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches*. Radiation Oncology, 2019. **14**(1): p. 141.
11. Pelucchi, C., et al., *Smoking and body mass index and survival in pancreatic cancer patients*. Pancreas, 2014. **43**(1): p. 47-52.
12. Rahn, S., et al., *Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells*. Cancer Lett, 2018. **415**: p. 129-150.
13. Zhang, S., et al., *Effects of alcohol drinking and smoking on pancreatic ductal adenocarcinoma mortality: A retrospective cohort study consisting of 1783 patients*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9572.
14. Herold, G., *Innere Medizin*. 2021, Köln: Dr. Gerd Herold
15. Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF *S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom*. Leitlinienprogramm Onkologie 2024. **Langversion 3.1**.
16. Force, U.S.P.S.T., et al., *Screening for Pancreatic Cancer: US Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement*. JAMA, 2019. **322**(5): p. 438-444.
17. Hinrichsen, T., B. Dockhorn-Dworniczak, and L. Peterson. *Pankreaskarzinom*. 2022 [cited 2022 31.10.]; Available from: <https://www.medizinische-genetik.de/diagnostik/onkologie/pathologie/solide-tumoren/pankreaskarzinom>.

18. Bartsch, D. *Nationale Fallsammlung familiäres Pankreaskarzinom*. Nationale Fallsammlung familiäres Pankreaskarzinom - Information für Ärzte 2022 31.10.2022; Available from: <http://www.fapaca.de/arzt-inf.html>.
19. Lorenzo, D., et al., *Role of endoscopic ultrasound in the screening and follow-up of high-risk individuals for familial pancreatic cancer*. World J Gastroenterol, 2019. **25**(34): p. 5082-5096.
20. Seufferlein, T., et al., *[S3-guideline exocrine pancreatic cancer]*. Z Gastroenterol, 2013. **51**(12): p. 1395-440.
21. Sohal, D.P., et al., *Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline*. J Clin Oncol, 2016. **34**(23): p. 2784-96.
22. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
23. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
24. Lemery, S., P. Keegan, and R. Pazdur, *First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication*. N Engl J Med, 2017. **377**(15): p. 1409-1412.
25. Le, D.T., et al., *Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade*. Science, 2017. **357**(6349): p. 409-413.
26. Apte, M.V., et al., *Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells*. Pancreas, 2004. **29**(3): p. 179-87.
27. Hingorani, S.R., et al., *Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 469-83.
28. Hruban, R.H., et al., *Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(5): p. 579-86.
29. Kopp, J.L., et al., *Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2012. **22**(6): p. 737-50.
30. Gidekel Friedlander, S.Y., et al., *Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras*. Cancer Cell, 2009. **16**(5): p. 379-89.
31. Kanda, M., et al., *Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia*. Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 730-733.e9.
32. Esposito, I., et al., *Intraduktale Pankreasneoplasien*. Der Pathologe, 2021. **42**(5): p. 472-483.
33. Wagner, M., et al., *A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease*. Genes Dev, 2001. **15**(3): p. 286-93.
34. Esposito, I. and L. Haeberle, *Acinar: Ductal Metaplasia*, in *Encyclopedia of Pathology*, J.H.J.M. van Krieken, Editor. 2020, Springer International Publishing: Cham. p. 1-4.

35. Habbe, N., et al., *Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18913-8.
36. Shi, G., et al., *Loss of the acinar-restricted transcription factor Mist1 accelerates Kras-induced pancreatic intraepithelial neoplasia*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1368-78.
37. Hill, R., et al., *PTEN loss accelerates KrasG12D-induced pancreatic cancer development*. Cancer Res, 2010. **70**(18): p. 7114-24.
38. Baumgart, M., et al., *Genomic instability at both the base pair level and the chromosomal level is detectable in earliest PanIN lesions in tissues of chronic pancreatitis*. Pancreas, 2010. **39**(7): p. 1093-103.
39. Andea, A., F. Sarkar, and V.N. Adsay, *Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma*. Mod Pathol, 2003. **16**(10): p. 996-1006.
40. Lüttges, J., et al., *Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution*. Virchows Arch, 1999. **435**(5): p. 461-8.
41. Ott, C., et al., *[Intraepithelial neoplasms (PanIN) and intraductal papillary-mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas as precursor lesions of pancreatic carcinoma]*. Med Klin (Munich), 2007. **102**(2): p. 127-35.
42. Takaori, K., et al., *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*. Pancreas, 2004. **28**(3): p. 257-262.
43. Hosoda, W., et al., *Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4*. J Pathol, 2017. **242**(1): p. 16-23.
44. Jones, S., et al., *Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1801-6.
45. Tanaka, M., et al., *International Consensus Guidelines for Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Mucinous Cystic Neoplasms of the Pancreas*. Pancreatolgy, 2006. **6**(1): p. 17-32.
46. Gaujoux, S., et al., *Cystic lesions of the pancreas: changes in the presentation and management of 1,424 patients at a single institution over a 15-year time period*. J Am Coll Surg, 2011. **212**(4): p. 590-600; discussion 600-3.
47. Tan, M.C., et al., *GNAS and KRAS Mutations Define Separate Progression Pathways in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm-Associated Carcinoma*. J Am Coll Surg, 2015. **220**(5): p. 845-854.e1.
48. Li, J., et al., *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas: A Review of Their Genetic Characteristics and Mouse Models*. Cancers (Basel), 2021. **13**(21).
49. Nilsson, L.N., et al., *Nature and management of pancreatic mucinous cystic neoplasm (MCN): A systematic review of the literature*. Pancreatolgy, 2016. **16**(6): p. 1028-1036.

50. Esposito, I., et al., *Klassifikation und malignes Potenzial der zystischen Pankreastumoren*. Der Pathologe, 2015. **36**(1): p. 99-114.
51. Wu, J., et al., *Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(52): p. 21188-21193.
52. Jang, K.-T., et al., *Clinicopathologic Characteristics of 29 Invasive Carcinomas Arising in 178 Pancreatic Mucinous Cystic Neoplasms With Ovarian-type Stroma: Implications for Management and Prognosis*. The American Journal of Surgical Pathology, 2015. **39**(2).
53. Guerra, C. and M. Barbacid, *Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma*. Mol Oncol, 2013. **7**(2): p. 232-47.
54. Mazur, P.K. and J.T. Siveke, *Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology*. Gut, 2012. **61**(10): p. 1488-500.
55. Hezel, A.F., et al., *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1218-49.
56. Collins, M.A., et al., *Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 639-53.
57. Biankin, A.V., et al., *Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 399-405.
58. Waddell, N., et al., *Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer*. Nature, 2015. **518**(7540): p. 495-501.
59. Klöppel, G., et al., *Intraductal proliferation in the pancreas and its relationship to human and experimental carcinogenesis*. Virchows Arch A Pathol Anat Histol, 1980. **387**(2): p. 221-33.
60. Iguchi, E., et al., *Pancreatic Cancer, A Mis-interpreter of the Epigenetic Language*. Yale J Biol Med, 2016. **89**(4): p. 575-590.
61. McDonald, O.G., et al., *Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis*. Nature Genetics, 2017. **49**(3): p. 367-376.
62. Lomberk, G., et al., *Distinct epigenetic landscapes underlie the pathobiology of pancreatic cancer subtypes*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1978.
63. Veenstra, V.L., et al., *Extracellular Influences: Molecular Subclasses and the Microenvironment in Pancreatic Cancer*. Cancers (Basel), 2018. **10**(2).
64. Morris, J.P.t., S.C. Wang, and M. Hebrok, *KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 683-95.
65. Narayanan, S., S. Vicent, and M. Ponz-Sarvisé, *PDAC as an Immune Evasive Disease: Can 3D Model Systems Aid to Tackle This Clinical Problem?* Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 787249.

66. Dougan, S.K., *The Pancreatic Cancer Microenvironment*. Cancer J, 2017. **23**(6): p. 321-325.
67. Öhlund, D., et al., *Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer*. J Exp Med, 2017. **214**(3): p. 579-596.
68. Nielsen, M.F., M.B. Mortensen, and S. Detlefsen, *Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(9): p. 2678-700.
69. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4195-200.
70. Clause, K.C. and T.H. Barker, *Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair*. Curr Opin Biotechnol, 2013. **24**(5): p. 830-3.
71. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
72. Jones, F.S. and P.L. Jones, *The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling*. Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 235-59.
73. Pas, J., et al., *Analysis of structure and function of tenascin-C*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(9): p. 1594-602.
74. Rocchi, M., et al., *Assignment of the gene for human tenascin to the region q32-q34 of chromosome 9*. Hum Genet, 1991. **86**(6): p. 621-3.
75. Gulcher, J.R., et al., *Chromosomal localization of the human hexabrachion (tenascin) gene and evidence for recent reduplication within the gene*. Genomics, 1990. **6**(4): p. 616-22.
76. Chiquet-Ehrismann, R., et al., *Tenascins in stem cell niches*. Matrix Biol, 2014. **37**: p. 112-23.
77. Midwood, K.S., et al., *Tenascin-C at a glance*. J Cell Sci, 2016. **129**(23): p. 4321-4327.
78. Chiquet-Ehrismann, R. and M. Chiquet, *Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 488-99.
79. Cai, J., et al., *Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(43): p. 74406-74422.
80. Yoneura, N., et al., *Expression of annexin II and stromal tenascin C promotes epithelial to mesenchymal transition and correlates with distant metastasis in pancreatic cancer*. Int J Mol Med, 2018. **42**(2): p. 821-830.
81. Loike, J.D., et al., *Blockade of alpha 5 beta 1 integrins reverses the inhibitory effect of tenascin on chemotaxis of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes through three-dimensional gels of extracellular matrix proteins*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7534-42.
82. Kanayama, M., et al., *Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 8015-25.

83. Midwood, K., et al., *Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease*. Nat Med, 2009. **15**(7): p. 774-80.
84. Yilmaz, A., et al., *Advances on the roles of tenascin-C in cancer*. J Cell Sci, 2022. **135**(18).
85. Dhaouadi, S., B. Bouhaouala-Zahar, and G. Orend, *Tenascin-C targeting strategies in cancer*. Matrix Biol, 2024. **130**: p. 1-19.
86. Esposito, I., et al., *Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis*. J Pathol, 2006. **208**(5): p. 673-85.
87. Furuhashi, S., et al., *Tenascin C in the Tumor-Nerve Microenvironment Enhances Perineural Invasion and Correlates With Locoregional Recurrence in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. Pancreas, 2020. **49**(3): p. 442-454.
88. Litvin, J., et al., *Expression and function of periostin-isoforms in bone*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 1044-61.
89. Kii, I., et al., *Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture*. J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 2028-39.
90. Hoersch, S. and M.A. Andrade-Navarro, *Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region*. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 30.
91. Norris, R.A., et al., *Periostin regulates atrioventricular valve maturation*. Dev Biol, 2008. **316**(2): p. 200-13.
92. Merle, B. and P. Garnero, *The multiple facets of periostin in bone metabolism*. Osteoporos Int, 2012. **23**(4): p. 1199-212.
93. Bonnet, N., P. Garnero, and S. Ferrari, *Periostin action in bone*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **432**: p. 75-82.
94. Ben, Q.W., et al., *Periostin, a matrix specific protein, is associated with proliferation and invasion of pancreatic cancer*. Oncol Rep, 2011. **25**(3): p. 709-16.
95. Liu, Y., et al., *Role of microenvironmental periostin in pancreatic cancer progression*. Oncotarget, 2017. **8**(52): p. 89552-89565.
96. Liu, Y. and L. Du, *Role of pancreatic stellate cells and periostin in pancreatic cancer progression*. Tumour Biol, 2015. **36**(5): p. 3171-7.
97. González-González, L. and J. Alonso, *Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 225.
98. Chen, Y., et al., *Periostin is associated with prognosis and immune cell infiltration in pancreatic adenocarcinoma based on integrated bioinformatics analysis*. Cancer Rep (Hoboken), 2024. **7**(2): p. e1990.
99. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
100. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.

101. Sica, A. and V. Bronte, *Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development*. The Journal of clinical investigation, 2007. **117** 5: p. 1155-66.
102. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
103. Ferrone, C. and G. Dranoff, *Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers*. J Clin Oncol, 2010. **28**(26): p. 4045-51.
104. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
105. Hiraoka, N., et al., *CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 310-21.
106. Yu, M., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophages in pancreatic cancer: a meta-analysis*. Cancer Manag Res, 2019. **11**: p. 4041-4058.
107. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
108. Santoni, M., et al., *CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 768758.
109. Liou, G.Y., et al., *The Presence of Interleukin-13 at Pancreatic ADM/PanIN Lesions Alters Macrophage Populations and Mediates Pancreatic Tumorigenesis*. Cell Rep, 2017. **19**(7): p. 1322-1333.
110. Pylayeva-Gupta, Y., et al., *Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia*. Cancer Cell, 2012. **21**(6): p. 836-47.
111. Liou, G.Y., et al., *Mutant KRAS-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions*. Cancer Discov, 2015. **5**(1): p. 52-63.
112. Bastea, L.I., et al., *Pomalidomide Alters Pancreatic Macrophage Populations to Generate an Immune-Responsive Environment at Precancerous and Cancerous Lesions*. Cancer Res, 2019. **79**(7): p. 1535-1548.
113. Moon, T.C., et al., *Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function*. Mucosal Immunology, 2010. **3**(2): p. 111-128.
114. Esposito, I., et al., *The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer*. Lab Invest, 2002. **82**(11): p. 1481-92.
115. Esposito, I., et al., *Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Clin Pathol, 2004. **57**(6): p. 630-6.
116. Ma, Y., et al., *Dynamic mast cell-stromal cell interactions promote growth of pancreatic cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(13): p. 3927-37.
117. Longo, V., et al., *Mast cells and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin Exp Med, 2018. **18**(3): p. 319-323.
118. Chang, D.Z., et al., *Mast cells in tumor microenvironment promotes the in vivo growth of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(22): p. 7015-23.

119. Aponte-López, A. and S. Muñoz-Cruz, *Mast Cells in the Tumor Microenvironment*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1273**: p. 159-173.
120. Kubuschok, B., et al., *Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis*. Int J Cancer, 2004. **109**(4): p. 568-75.
121. Schmitz-Winnenthal, F.H., et al., *High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 10079-87.
122. Schmitz-Winnenthal, F.H., et al., *Specific immune recognition of pancreatic carcinoma by patient-derived CD4 and CD8 T cells and its improvement by interferon-gamma*. Int J Oncol, 2006. **28**(6): p. 1419-28.
123. von Bernstorff, W., et al., *Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand*. Surgery, 1999. **125**(1): p. 73-84.
124. Jesnowski, R., et al., *Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine*. Lab Invest, 2005. **85**(10): p. 1276-91.
125. Kleeff, J., et al., *Pancreatic cancer microenvironment*. Int J Cancer, 2007. **121**(4): p. 699-705.
126. Hwang, H.K., et al., *Prognostic impact of the tumor-infiltrating regulatory T-cell (Foxp3(+))/activated cytotoxic T lymphocyte (granzyme B(+)) ratio on resected left-sided pancreatic cancer*. Oncol Lett, 2016. **12**(6): p. 4477-4484.
127. Knochelmann, H.M., et al., *When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity*. Cell Mol Immunol, 2018. **15**(5): p. 458-469.
128. Kryczek, I., et al., *Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments*. Blood, 2009. **114**(6): p. 1141-9.
129. Juneja, T., et al., *Utilization of Treg Cells in Solid Organ Transplantation*. Frontiers in Immunology, 2022. **13**.
130. Krop, J., et al., *Regulatory T Cells in Pregnancy: It Is Not All About FoxP3*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**.
131. Noack, M. and P. Miossec, *Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(6): p. 668-77.
132. Mittrücker, H.W., A. Visekruna, and M. Huber, *Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014. **62**(6): p. 449-58.
133. Pushalkar, S., et al., *The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression*. Cancer Discov, 2018. **8**(4): p. 403-416.
134. Tang, Y., et al., *An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory T cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91551.

135. Shou, J., et al., *Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs : a systematic review and meta-analysis*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 687.
136. Tan, M.C., et al., *Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1746-55.
137. Budhu, S., et al., *Blockade of surface-bound TGF- β on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment*. Sci Signal, 2017. **10**(494).
138. Keenan, B.P., et al., *A Listeria vaccine and depletion of T-regulatory cells activate immunity against early stage pancreatic intraepithelial neoplasms and prolong survival of mice*. Gastroenterology, 2014. **146**(7): p. 1784-94.e6.
139. Opitz, F.V., et al., *Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*. Cancers (Basel), 2021. **13**(24).
140. Spear, S., et al., *Discrepancies in the Tumor Microenvironment of Spontaneous and Orthotopic Murine Models of Pancreatic Cancer Uncover a New Immunostimulatory Phenotype for B Cells*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**.
141. Brodt, P. and J. Gordon, *Anti-tumor immunity in B lymphocyte-deprived mice. I. Immunity to a chemically induced tumor*. J Immunol, 1978. **121**(1): p. 359-62.
142. Shah, S., et al., *Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells*. Int J Cancer, 2005. **117**(4): p. 574-86.
143. Inoue, S., et al., *Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7741-7.
144. de Visser, K.E., L.V. Korets, and L.M. Coussens, *De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 411-23.
145. Zhang, Y., et al., *B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2013. **62**(1): p. 87-99.
146. Ammirante, M., et al., *B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer*. Nature, 2010. **464**(7286): p. 302-5.
147. Candolfi, M., et al., *B cells are critical to T-cell-mediated antitumor immunity induced by a combined immune-stimulatory/conditionally cytotoxic therapy for glioblastoma*. Neoplasia, 2011. **13** **10**: p. 947-60.
148. DiLillo, D.J., K. Yanaba, and T.F. Tedder, *B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 4006-16.
149. Garnelo, M., et al., *Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma*. Gut, 2017. **66**(2): p. 342-351.

150. Kroeger, D.R., K. Milne, and B.H. Nelson, *Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(12): p. 3005-15.
151. Nielsen, J.S., et al., *CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27-memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(12): p. 3281-92.
152. Germain, C., et al., *Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(7): p. 832-44.
153. Di Caro, G., et al., *Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(8): p. 2147-58.
154. Castino, G.F., et al., *Spatial distribution of B cells predicts prognosis in human pancreatic adenocarcinoma*. Oncoimmunology, 2016. **5**(4): p. e1085147.
155. Xia, B. and R.S. Herbst, *Immune checkpoint therapy for non-small-cell lung cancer: an update*. Immunotherapy, 2016. **8**(3): p. 279-98.
156. Creelan, B.C., *Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer*. Cancer Control, 2014. **21**(1): p. 80-9.
157. Riella, L.V., et al., *Role of the PD-1 pathway in the immune response*. Am J Transplant, 2012. **12**(10): p. 2575-87.
158. Zou, W. and L. Chen, *Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 467-77.
159. Zheng, L., *PD-L1 Expression in Pancreatic Cancer*. J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(6).
160. Jin, H.T., R. Ahmed, and T. Okazaki, *Role of PD-1 in regulating T-cell immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **350**: p. 17-37.
161. Feng, M., et al., *PD-1/PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2017. **407**: p. 57-65.
162. Soares, K.C., et al., *PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors*. J Immunother, 2015. **38**(1): p. 1-11.
163. Iacovelli, R., et al., *Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis*. Target Oncol, 2016. **11**(2): p. 143-8.
164. Huang, Y., et al., *The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer*. Oncol Rep, 2015. **33**(6): p. 3075-84.
165. Ying, L., et al., *PD-L1 expression is a prognostic factor in subgroups of gastric cancer patients stratified according to their levels of CD8 and FOXP3 immune markers*. Oncoimmunology, 2018. **7**(6): p. e1433520.
166. Knol, A.C., et al., *PD-L1 expression by tumor cell lines: A predictive marker in melanoma*. Exp Dermatol, 2018. **27**(6): p. 647-655.
167. Foley, K., et al., *Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2016. **381**(1): p. 244-51.

168. Gorris, M.A.J., et al., *Eight-Color Multiplex Immunohistochemistry for Simultaneous Detection of Multiple Immune Checkpoint Molecules within the Tumor Microenvironment*. J Immunol, 2018. **200**(1): p. 347-354.
169. (CAi), C.f.A.I. *Leica TCS SP8 STED 3X*. 15.10.2022 [cited 2022 15.10]; Available from: <https://www.cai.hhu.de/ausruestung/superaufloesungs-mikroskope/leica-tcs-sp8-sted-3x>.
170. Microsystems, L. *Superauflösung für die Lebendzellbeobachtung mit multiplen Markern SP8 LIGHTNING*. 2022 [cited 2022 15.10.2022]; Available from: <https://www.leica-microsystems.com/de/produkte/konfokalmikroskope/p/leica-tcs-sp8/>.
171. Locati, M., G. Curtale, and A. Mantovani, *Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity*. Annu Rev Pathol, 2020. **15**: p. 123-147.
172. Filippini, D., et al., *Immuno-evolution of mouse pancreatic organoid isografts from preinvasive to metastatic disease*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 12286.
173. Ino, Y., et al., *Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2013. **108**(4): p. 914-23.
174. Vizio, B., et al., *Potential plasticity of T regulatory cells in pancreatic carcinoma in relation to disease progression and outcome*. Exp Ther Med, 2012. **4**(1): p. 70-78.
175. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6752-61.
176. Liou, G.Y., et al., *Macrophage-secreted cytokines drive pancreatic acinar-to-ductal metaplasia through NF- κ B and MMPs*. J Cell Biol, 2013. **202**(3): p. 563-77.
177. Ruffell, B., N. Affara, and L. Coussens, *Differential macrophage programming in the tumor microenvironment*. Trends Immunol 33: 119-126. Trends in immunology, 2012. **33**: p. 119-26.
178. Biswas, S.K., A. Sica, and C.E. Lewis, *Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2011-7.
179. Wang, B., et al., *p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2359.
180. Cortez, M.A., et al., *PDL1 Regulation by p53 via miR-34*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(1).
181. Zhu, K., et al., *p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides*. Oncogene, 1999. **18**(54): p. 7740-7.
182. Owen-Schaub, L.B., et al., *Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3032-40.
183. Braun, M.W. and T. Iwakuma, *Regulation of cytotoxic T-cell responses by p53 in cancer*. Translational Cancer Research, 2016. **5**(6): p. 692-697.

184. Wang, X., et al., *Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia*. *Cell Signal*, 2015. **27**(3): p. 443-52.
185. Thiery, J., et al., *p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 871-8.
186. Zschaler, J., D. Schlorke, and J. Arnhold, *Differences in innate immune response between man and mouse*. *Crit Rev Immunol*, 2014. **34**(5): p. 433-54.
187. Moore, M.J., et al., *Comparison of Gemcitabine Versus the Matrix Metalloproteinase Inhibitor BAY 12-9566 in Patients With Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Pancreas: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. **21**(17): p. 3296-3302.
188. Morosi, L., et al., *PEGylated recombinant human hyaluronidase (PEGPH20) pre-treatment improves intra-tumour distribution and efficacy of paclitaxel in preclinical models*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021. **40**(1): p. 286.
189. Bailey, P., et al., *Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer*. *Nature*, 2016. **531**(7592): p. 47-52.
190. Collisson, E.A., et al., *Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy*. *Nature Medicine*, 2011. **17**(4): p. 500-503.
191. Moffitt, R.A., et al., *Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Nat Genet*, 2015. **47**(10): p. 1168-78.
192. Connor, A.A., et al., *Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(6): p. 774-783.
193. Brahmer, J.R., et al., *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2455-65.
194. Borghaei, H., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(17): p. 1627-39.
195. Borghaei, H., M.R. Smith, and K.S. Campbell, *Immunotherapy of cancer*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **625**(1-3): p. 41-54.
196. Topalian, S.L., et al., *Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(10): p. 1020-30.
197. Larkin, J., F.S. Hodi, and J.D. Wolchok, *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(13): p. 1270-1.
198. Akce, M., et al., *The Potential of CAR T Cell Therapy in Pancreatic Cancer*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2166.
199. Yeo, D., et al., *The next wave of cellular immunotherapies in pancreatic cancer*. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2022. **24**: p. 561-576.

200. Klug, F., et al., *Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS⁺/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy*. *Cancer Cell*, 2013. **24**(5): p. 589-602.
201. Di Caro, G., et al., *Dual prognostic significance of tumour-associated macrophages in human pancreatic adenocarcinoma treated or untreated with chemotherapy*. *Gut*, 2016. **65**(10): p. 1710-20.
202. Zhu, Y., et al., *CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models*. *Cancer Res*, 2014. **74**(18): p. 5057-69.
203. Esposito, I., et al., *[Intraductal neoplasms of the pancreas]*. *Pathologe*, 2021. **42**(5): p. 472-483.
204. Cohen, J.D., et al., *Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(38): p. 10202-10207.
205. Song, L., et al., *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. *Biophys J*, 1995. **68**(6): p. 2588-600.
206. Gnerlich, J.L., et al., *Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer*. *J Immunol*, 2010. **185**(7): p. 4063-71.
207. He, S., et al., *Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients*. *Int J Mol Sci*, 2011. **12**(11): p. 7424-37.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Etablierung der Primärantikörper	34
Tabelle 2: Opal Fluorophore und ihre Wellenlängen	36
Tabelle 3: Überblick der Zusammensetzung der TMA-Gewebestanzten des transgenen Mauskollektives (n = 41).....	42
Tabelle 4: Übersicht Kollektivgröße und Altersverteilung in Tagen (d) der Gewebetypen. Aufgeführt wird die Kollektivgröße nach Normalgewebe (n=18), ADM (n=21), PanIN low grade (n=31), PDAC peripher (n=35) und PDAC zentral (n=35).....	42

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologie des PDAC mit ausgeprägter desmoplastischer Stromareaktion einer KPC-Maus: Das Tumorgewebe zeigt irreguläre drüsige wachsende epitheliale Strukturen (exemplarisch: Pfeil), die vergrößerte pleomorphe Zellkerne aufweisen. Die atypischen Drüsenkomplexe sind eingebettet in ein zellreiches desmoplastisches Stroma (exemplarisch: Stern), teilweise mit Immunzellinfiltrat. HE-Färbung, Vergrößerung 20x.	15
Abbildung 2: Histologie einer ADM-Läsion einer KPC-Maus: Das azinäre Pankreasparenchym zeigt eine deutliche Atrophie mit Übergang der typischen azinären Morphologie hin zur Ausbildung tubulärer Strukturen mit Auskleidung durch ein duktal imponierendes Epithel (exemplarisch: Pfeile). Umgebend aktiviertes Stroma mit vereinzelt Immunzellen. HE-Färbung, Vergrößerung 20x.	16
Abbildung 3: Histologie von PanIN-Läsionen einer KC-Maus: Zylindrisches Epithel mit basaler Kernlage. Mehrkernige Nukleolen. Um die PanIN herum ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion mit Infiltration von Immunzellen. HE-Färbung, Vergrößerung 20x.	18
Abbildung 4: Mehrschrittige molekulargenetische und zelluläre Ereignisse während der Karzinogenese des PDAC. Modifiziert nach [10, 64]	20
Abbildung 5: Tissue Microarray. TMA1-Paraffinblock (A); HE-Färbung TMA1 (B)	33
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung der Multiplex-Immunfluoreszenz Färbung. A: Darstellung von Panel 1 in der Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung an murinem Lymphknotengewebe. B: Darstellung von Panel 2 in der Multiplex-Immunfluoreszenz-Färbung an murinem Lymphknotengewebe. Leica TCS SP8 STED 3X Mikroskop.	37
Abbildung 7: Arbeitsablauf der Quantifizierung mittels ImageJ. Multiplex-Originalbild einer PanIN-Läsion (A), Monoplex-DAPI ⁺ -Zellen der PanIN-Läsion (B), pink umrandet detektierte DAPI ⁺ -Zellen durch Bildanalyse in ImageJ (C)	38
Abbildung 8: Exemplarische Darstellung der Etablierung der Immunmarker in lymphatischem Mausgewebe in der klassischen Immunhistochemie. A: CD3 ⁺ -T-Zellen. B: CD4 ⁺ -TH-Zellen. C: CD163 ⁺ -Makrophagen. D: FoxP3 ⁺ -Tregs. E: Granzym B ⁺ -T-Zellen, PD1 ⁺ - Immunzellen. Zeiss Axioskop 2 plus. Vergrößerung 20x.	40

Abbildung 9: Darstellung der der Immunmarker aus Panel 1 in der Multiplex- Immunfluoreszenz an Maus-Lymphknotengewebe. Leica TCS SP8 Mikroskop, Vergrößerung: 20x	41
Abbildung 10: Darstellung der Immunmarker aus Panel 2 in der Multiplex-Immunfluoreszenz an Maus-Lymphknotengewebe. Leica TCS SP8 Mikroskop, Vergrößerung: 20x	41
Abbildung 11: Vergleich der Tryptase ⁺ Zellen zwischen Normalgewebe (NG), Vorläuferläsionen und Tumorgewebe. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test (n = 131; p = 0,05). Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = p < 0,05; ** = p < 0,01	43
Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der F4/80 ⁺ -Zellen und der CD163 ⁺ -Zellen in Normalgewebe (NG), ADM, PanIN low grade sowie PDAC peripher und zentral. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. A: F4/80 ⁺ -Makrophagen im Vergleich (n = 130; p < 0,05). B: CD163 ⁺ -M2-Makrophagen im Vergleich (n = 132; p > 0,05). Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = p < 0,05; ** = p < 0,01	44
Abbildung 13: Verteilung der M1- und M2-Makrophagen (pink)- und M2-Makrophagen (blau) in der Fluoreszenz-Immunhistochemie in Normalgewebe (A), ADM (B), PanIN (C) und PDAC peripher (D). Es finden sich mehr F4/80 ⁺ und CD163 ⁺ -Zellen im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Repräsentative Abbildung. CD163 = blau, F4/80 = pink, DAPI = grau	44
Abbildung 14: Anteil CD163 ⁺ -M2-Makrophagen an F4/80 ⁺ -Gesamtmakrophagen in Normalgewebe, Vorläuferläsionen und Tumorgewebe. A: Signifikanter Anstieg der F4/80 ⁺ - Makrophagen in PDAC (zentral und peripher). Kruskal-Wallis-Test mit Boxplot-Darstellung der Mediane, 25. und 75. Perzentile (CD163 = blau; F4/80 = grün). B: Gestapeltes Balkendiagramm mit 100 % Skalierung (CD163 = dunkelblau; F4/80 = hellblau). * = p < 0,05; ** = p < 0,01	45
Abbildung 15: Verteilung der CD3 ⁺ -T-Zellen und der FoxP3 ⁺ -Zellen in Normalgewebe (A), in PanIN low grade (B) und in PDAC peripher (C). Repräsentative Darstellung. CD3 ⁺ T-Zellen = rot, FoxP3 ⁺ T-Zellen = gelb, DAPI = grau	46
Abbildung 16: Vergleich der CD4 ⁺ -Immunzellen, der CD8α ⁺ - Immunzellen sowie der FoxP3 ⁺ - Immunzellen in Normalgewebe, in Vorläuferläsionen und in Tumorgewebe. A: CD4 ⁺ -Helfer- T-Zellen im Vergleich (n=123, p = 0,004). B: CD8α ⁺ -Zytotoxische-T-Zellen im Vergleich (n=124, p > 0,05). C: FoxP3 ⁺ -Regulatorische-T-Zellen im Vergleich (n=134, p > 0,05). Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = p < 0,05; ** = p < 0,01	47

Abbildung 17: Vergleich des Anteils der FoxP3 ⁺ -Regulatorische-T-Zellen an der Gesamtzahl der CD4 ⁺ -Helfer-T-Zellen in Normalgewebe, in Vorläuferläsionen sowie in Tumorgewebe. Darstellung mittels gestapeltem Balkendiagramm. Median CD4 hellblau, Median FoxP3 dunkelblau. 100 % Skalierung	47
Abbildung 18: Vergleich der CD19 ⁺ - Immunzellen und der CD3 ⁺ - Immunzellen in Normalgewebe, Vorläuferläsionen und in Tumorgewebe. A: Vergleichende Darstellung der CD19 ⁺ -B-Zellen in Normalgewebe (NG), ADM, PanIN low grade und PDAC peripher und zentral. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = p < 0,05; ** = p < 0,01. B: Anteil CD19 ⁺ -B-Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der CD3 ⁺ -T-Zellen. Gestapeltes Balkendiagramm mit 100 % Skalierung	48
Abbildung 19: Vergleichende Darstellung der CD4 ⁺ -Helfer-T-Zellen (rot), CD8α ⁺ -Zytotoxischen-T-Zellen (blau) sowie der Granzym B ⁺ -Zytotoxischen-T-Zellen (grün). Signifikanter Anstieg der CD4 ⁺ -T-Zellen in PDAC zentral verglichen mit ADM (p < 0,05%). Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = p < 0,05; ** = p < 0,01	49
Abbildung 20: Alter der Mäuse in Tagen (d) abhängig vom Tp53- Mutationsstaus. Berechnung mittels Kaplan-Meier-Analyse (n=41, p < 0,05).....	50
Abbildung 21: Verteilung der CD3 ⁺ -Zellen in PanIN und der Tryptase ⁺ -Zellen in ADM in Abhängigkeit vom Tp53-Mutationsstatus der Mäuse. A: Vergleichende Darstellung Verteilung der CD3 ⁺ -T-Zellen in PanIN abhängig vom Tp53-Mutationsstatus (+/+ = Wildtyp; +/- = Heterozygot mutiert; -/- = Knockout). B: Vergleichende Darstellung der Tryptase ⁺ -Mastzellen in ADM abhängig vom Tp53-Mutationsstatus. Berechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Die Daten sind dargestellt als Boxplots (Median, 25. und 75. Perzentile). * = p < 0,05; ** = p < 0,01	51

8 Anhang

8.1 Opal Multiplex-Immunfluoreszenz Protokoll

Preparation: Bake Slides at 65°C for 1 h or o.n.

1. Deparaffinization	Xylol	3x 10min	Day 1
2. Descending alcohol series	Ethanol 100%, 95%, Rinse in 70% and then Aqua dest	10 min each	
3. Fix	10% Neutral buffered Formalin	20 min	
4. Wash	Aqua dest	rinse	
5. Antigen demasking	AR buffer	15 min, let cool 15-30 min	
6. Wash	Aqua dest, TBS-T	rinse	
7. Peroxidase Block	3% H ₂ O ₂ in PBS	10 min	
8. Wash	TBS-T	6 min	
9. Blocking	Blocking buffer	10 min at RT	
10. Prim. antibody	in Prim. AB Working Solution	1 h at RT	
11. Wash	TBS-T	6 min	Day 2
12. Scd. antibody	Polymer HRP Ms + Rb	10 min at RT	
13. Wash	TBS-T	6 min	
14. Signal generation	Opal Fluorophore Working Solution	10 min at RT	
15. Wash	TBS-T	6 min	
16. MWT/AB-Stripping	AR buffer	15 min, let cool 15-30 min	
17. Detection of next target	Restart Protocol at Step 8	continue with step 18 after detection of all targets	
18. Counterstaining	DAPI Working Solution	5 min at RT	
19. Wash	TBST, Water	2 min each	
20. Mounting	Coverslip slides		

8.2 Repräsentativer Auszug der Macro-Auswertung mit ImageJ für den Marker FoxP3

```
104 //Initialize local variables and tell the user that analysis startet
105 PureName = ActiveImageName;
106 PureName = replace(PureName, File.name, "");
107 PureName = substring(PureName, 3, lengthOf(PureName));
108 print("Start to analyze "+PureName);
109 //Extract channels of interest
110 run("Duplicate...", "duplicate channels="+ReviewChannel);
111 rename("ReviewOriginal");
112 selectWindow(ActiveImageName);
113 run("Duplicate...", "duplicate channels="+FoxChannel);
114 rename("FoxOriginal");
115 run("Duplicate...", "duplicate channels=1");
116 rename(originalImageName+"-Ch1");
117 //Create Mask for Quantification
118 setAutoThreshold("Yen dark");
119 setOption("BlackBackground", true);
120 run("Convert to Mask");
121 run("Despeckle");
122 //Analyze regions
123 run("Analyze Particles...", "size=2-Infinity pixel circularity=0.50-1.00 show=[Bare Outlines] display exclude summarize add");
124 //Create image for quality control
125 selectWindow("Drawing of "+originalImageName+"-Ch1");
126 run("8-bit");
127 rename("Outline");
128 run("Invert");
129 run("Enhance Contrast", "saturated=0");
130 selectWindow(originalImageName+"-Ch1");
131 resetMinAndMax();
132 selectWindow("ReviewOriginal");
```

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Mentorin und Betreuerin Frau Prof. Dr. Irene Esposito. Vielen Dank, dass ich meine Dissertation in Ihrem Institut durchführen durfte und Sie mir Ihr Vertrauen für das gemeinsame Projekt entgegengebracht haben.

Bei Marie Schulte, Herrn Dr. Schlensog, Frau Dr. Häberle-Graser und Frau Dr. Opitz möchte ich mich explizit bedanken für die große Unterstützung im Labor und bei der Auswertung meiner Daten sowie für die steten Vorbereitungen auf Kongresse. Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team der Pathologie und die „Routine“.

Mein herzlichster Dank gilt an Herrn Ecker, der mir in schwierigen Stunden durch meine Excel-Rohdaten geholfen hat.

Herrn Dr. Sebastian Hänsch und Herrn Dr. Jelle Postma aus dem *Center for Advance Imaging* (CAi) möchte ich ganz besonders für die Einführung in die Lasermikroskopie und Unterstützung bei der Kodierung der *Macros* danken.

Meiner Familie und Freunden möchte ich für die vielen motivierenden Worte und die Jahre lange Unterstützung danken. Besonders meinen Eltern möchte ich danken, denn ohne sie wäre das Medizinstudium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.