

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

© 2020 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-535-4

1. Auflage 2020

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvj.de
www.dvj.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und
der Chirurgischen Klinik
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Die Rolle des Moleküls B7-H1 in der Immuntherapie des Pankreasadenokarzinoms im murinen Panc02-Modell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freie Universität Berlin

vorgelegt von
Henriette Bunge
Tierärztin aus Diepholz

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4190

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Jörg Aschenbach
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Alexandre Bazhin
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice, laboratory animals, transgenic animal, neoplasms, pancreas, pancreatic cancer, immunotherapy, t lymphocytes, b lymphocytes, antibodies, surface antigens, interferons, cytokines, immunomodulators

Tag der Promotion: 30.04.2020

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Tabellenverzeichnis	VI
III.	Abbildungsverzeichnis	VIII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	XIV
1	Einleitung.....	1
1.1	Das Pankreas.....	1
1.1.1	Anatomie	1
1.1.2	Physiologie	2
1.1.3	Tumoren des Pankreas.....	3
1.2	Das duktale Pankreasadenokarzinom	4
1.2.1	Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
1.2.2	Klinische Symptomatik.....	5
1.2.3	Diagnostik.....	6
1.2.4	Staging und Prognose	7
1.2.5	Therapie	8
1.2.5.1	Chirurgie	8
1.2.5.2	Chemotherapie	9
1.2.5.3	Strahlentherapie.....	11
1.2.5.4	Immuntherapie	11
1.3	Pankreastumoren der Haustiere.....	13
1.3.1	Symptome	13
1.3.2	Diagnose	14
1.3.3	Prognose und Therapie.....	14
1.4	Das Immunsystem.....	15
1.4.1	Aufbau und Aufgaben des Immunsystems.....	15
1.4.2	Organe und Zellen des Immunsystems.....	15
1.4.2.1	T-Lymphozyten	16
1.4.2.2	B-Lymphozyten	18

1.4.2.3	CD11b ⁺ -Zellen.....	18
1.4.2.3.1	CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ -Zellen / MDSC.....	19
1.4.2.3.2	CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen / Makrophagen	20
1.4.2.3.2.1	M1-Makrophagen.....	21
1.4.2.3.2.2	M2-Makrophagen.....	22
1.4.2.4	Zytokine	23
1.4.3	Tumorimmunologie	26
1.4.3.1	Regulatorische Moleküle: B7-H1 und B7-DC.....	26
1.5	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	27
2	Tiere, Material und Methoden.....	29
2.1	Tiere.....	29
2.2	Material	30
2.2.1	Murine Pankreaskarzinomzellen	30
2.2.2	Pharmaka	30
2.2.3	Antikörper und Beads für die Durchflusszytometrie.....	31
2.2.4	Weitere Antikörper	33
2.2.4.1	Antikörper und Zellmarker zur Induktion und Analyse von Zellproliferation	33
2.2.4.2	B7-H1-Antikörper zur in vivo Behandlung.....	34
2.2.5	Isolation von Zellsubpopulationen	34
2.2.6	Zytokinanalyse.....	34
2.2.7	Chemikalien und Lösungen.....	34
2.2.8	Zellkulturmedien	36
2.2.9	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	37
2.2.10	Software	39
2.3	Methoden.....	40
2.3.1	Kultivierung und Gewinnung von Panc02-Zellen.....	40
2.3.2	Die orthotope Implantation von Pankreaskarzinomzellen.....	40
2.3.3	Abbruchkriterien für den Tierversuch.....	41
2.3.4	Therapie in vivo mit 5FU und IFN.....	41
2.3.5	Kardiale Blutentnahme.....	42

2.3.6	Retrobulbäre Blutentnahme	42
2.3.7	Therapie in vivo mit B7-H1-Antikörpern.....	43
2.3.8	Entnahme von Tumoren und Milzen.....	43
2.3.9	Gewinnung von Blutseren und Medienüberständen	44
2.3.10	Einzelzellsuspensionsherstellung.....	44
2.3.11	Magnetische Zellisolation (<i>magnetic activated cell sorting</i> =MACS).....	44
2.3.11.1	Magnetische Isolation von CD11b ⁺ -Zellen	45
2.3.11.2	Magnetische Isolation von CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen	45
2.3.12	Kultivierung von Tumor- und Milzzellen.....	46
2.3.13	Kultivierung von CD11b ⁺ -Zellen	46
2.3.14	Behandlung in vitro mit 5FU und IFN- α	46
2.3.15	Erfassung der Proliferation von Splenozyten in der Durchflusszytometrie	46
2.3.16	Kokultivierung von Splenozyten und Makrophagen.....	47
2.3.17	Aktivierung von Splenozyten.....	47
2.3.18	Fluoreszenz-gekoppelte Zellanalyse in der Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i> =FACS).....	47
2.3.18.1	Anfärbung extrazellulärer Antigene (für FACS).....	48
2.3.18.2	Anfärbung intrazellulärer Antigene (für FACS).....	48
2.3.19	Inkubation von CD11b ⁺ -Zellen mit FluoSpheres [®] Carboxylate-Beads zur Ermittlung der Phagozytoseaktivität	48
2.3.20	Luminex-basierte Zytokinmessung.....	49
2.3.21	Statistik	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	In-vivo-Untersuchung von Milzen und Tumoren tumortragender WT- und KO- Mäusen unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	51
3.1.1	In-vivo-Untersuchung der Immunzellexpression in Milzen und Tumoren tumortragender WT-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	55
3.1.2	In-vivo-Untersuchung der Immunzellexpression in Milzen und Tumoren tumortragender KO-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	63
3.1.3	Vergleich der in vivo untersuchten Immunzellexpression in Milzen und Tumoren tumortragender WT- und KO-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	71
3.1.4	In-vivo-Untersuchung der B7-H1-Expression tumortragender WT- Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU.....	83

3.1.5	In-vivo-Untersuchung der B7-DC-Expression in Milzen und Tumoren tumortragender KO-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	95
3.1.6	Zytokinspiegel tumortragender WT- und KO-Mäuse unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	106
3.2	Untersuchung der Tumolvolumina therapierter WT- und KO-Mäuse mit IFN, 5FU und IFN+5FU	108
3.3	Ex-vivo-Untersuchung der Aktivität CD11b ⁺ -Zellen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU	112
3.3.1	Makrophagenkonzentrationen in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen	113
3.3.2	MDSC-Konzentrationen in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren von WT-/KO-Mäusen	115
3.3.3	B7-H1-/B7-DC-Expression auf mit IFN-, 5FU- und IFN+5FU-behandelter Makrophagen in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen.....	116
3.3.4	B7-H1-/B7-DC-Expression mit IFN-, 5FU- und IFN+5FU-behandelter MDSC in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen	118
3.3.5	Phagozytoseaktivität von Makrophagen in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen	119
3.3.6	Phagozytoseaktivität von MDSC in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen	121
3.3.7	Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen der mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten CD11b ⁺ -Zellen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen	122
3.4	Untersuchung des proliferativen Einflusses von CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen tumortragender WT-Mäuse auf naive CD4 ⁺ -T-Zellen.....	127
3.4.1	Einfluss von CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen tumortragender WT-Mäuse auf CD4 ⁺ -T-Zellen gesunder WT-Mäuse	128
3.4.2	Einfluss von CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen tumortragender WT-Mäuse auf die Proliferation von Splenozyten gesunder WT-Mäuse.....	130
3.4.3	Einfluss von CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen tumortragender WT-Mäuse auf die Zytokinkonzentrationen in Kulturen mit Splenozyten gesunder WT-Mäuse.....	132
3.5	Untersuchung der Auswirkungen der Blockierung von B7-H1 in tumortragenden WT-Mäusen auf ihre Überlebenszeit	135
3.5.1	Überlebenszeit tumortragender Mäuse mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern.....	136
3.5.2	Zytokinkonzentrationen in tumortragenden Mäusen mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern.....	137

4	Diskussion	139
4.1	Methoden.....	139
4.1.1	Datenerhebung mittels Fluoreszenz-gekoppelter Durchflusszytometrie (FACS).....	139
4.1.2	Therapie mit 5-Fluorouracil (5FU) und Interferon- α (IFN).....	139
4.2	Einfluss von 5FU und IFN auf die Immunlage im PDA.....	140
4.3	Makrophagen: Ihre Funktion und ihr Einfluss auf die Immunlage im PDA.....	145
4.3.1	Vermehrte Makrophageninfiltration bei Progression des PDA.....	145
4.3.2	Aus PDA stammende Makrophagen fördern die Expression von CD25 auf aktivierten CD4 ⁺ -T-Zellen, zeigen keinen proliferierenden Effekt auf CD4 ⁺ -T-Zellen und induzieren ein tumorstimulierendes Milieu.....	146
4.3.3	Erhöhte Phagozytose von Makrophagen unter Abwesenheit von B7-H1.....	147
4.3.4	Vergleichende Betrachtung von Makrophagen und MDSC.....	148
4.4	Die Rolle von B7-H1 im PDA.....	149
4.4.1	Einfluss von B7-H1 auf die Immunlage im PDA.....	150
4.4.2	Wechselwirkungen zwischen B7-H1 und der Therapie mit 5FU und IFN.....	152
4.4.3	Die Rolle des PD-1-Liganden B7-DC im PDA.....	153
4.4.4	B7-H1-Antikörper als praxisnaher Therapieansatz im PDA.....	154
5	Zusammenfassung	157
6	Summary	158
7	Literaturverzeichnis	159
V.	Danksagung	XVII
VI.	Selbstständigkeitserklärung	XVIII

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Residualtumor-/R-Klassifikation modifiziert nach Union internationale contre le cancer (UICC)	7
Tabelle 2:	TNM-Klassifikation und Staging des PDA modifiziert nach UICC	8
Tabelle 3:	Einteilung der Immuntherapie-Formen	12
Tabelle 4:	Immunstimulierende Zytokine und ihre Aufgaben im Detail	24
Tabelle 5:	Immunsuppressive Zytokine und ihre Aufgaben im Detail	25
Tabelle 6:	Mäuse	29
Tabelle 7:	Pharmaka	30
Tabelle 8:	Antikörper für die Durchflusszytometrie	31
Tabelle 9:	Verwendete Aktivierungs-Antikörper sowie CFSE	33
Tabelle 10:	Verwendete Chemikalien	35
Tabelle 11:	Inkubationslösung für Tumorzellen zur nachfolgenden MACS-Analyse	35
Tabelle 12:	Verwendete Puffer- und Waschlösungen	36
Tabelle 13:	Verwendete Zellkulturmedien	36
Tabelle 14:	Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien	37
Tabelle 15:	Verwendete Geräte	38
Tabelle 16:	Verwendete Software	39
Tabelle 17:	Therapie in vivo mit 5FU und IFN- α	42
Tabelle 18:	Zusammenfassende Veränderungen der Immunzellexpression in tumortragenden WT-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe	62
Tabelle 19:	Zusammenfassende Veränderungen der Immunzellexpression in tumortragenden KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe	70
Tabelle 20:	Zusammenfassende Darstellung der Mauseffekte sowie Wechselwirkungen von Maustypen und Therapie im Hinblick auf die Immunzellexpression in Milzen aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU in vivo therapierten bzw. nicht therapierten (CON), tumortragenden WT- und KO-Mäusen	76

Tabelle 21:	Zusammenfassende Darstellung der Mauseffekte sowie Wechselwirkungen von Maustypen und Therapie im Hinblick auf die Immunzellexpression in Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU in vivo therapierten bzw. nicht therapierten (CON), tumortragenden WT- und KO-Mäusen	82
Tabelle 22:	Zusammenfassende Darstellung aller signifikanten Ergebnisse der B7-H1-Expression auf Immunzellen in Milzen und Tumoren aus in vivo therapierten bezogen auf nicht therapierte tumortragende WT-Mäuse	94
Tabelle 23:	Zusammenfassende Darstellung aller signifikanten Ergebnisse der B7-DC-Expression auf Immunzellen in Milzen und Tumoren aus in vivo therapierten bezogen auf nicht therapierte tumortragende KO-Mäuse	105
Tabelle 24:	Korrelation zwischen Tumolvolumina und Konzentration an Makrophagen (CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen) bzw. CD206 ⁺ -Makrophagen in WT-Mäusen unter Einfluss der Therapien mit IFN und/oder 5FU	110
Tabelle 25:	Vergleichende Darstellung der Zytokinkonzentrationen aus Abbildung 57 und 58	125
Tabelle 26:	Erläuterung der gewählten Kulturansätze und deren weiterfolgend verwendeten Abkürzungen	127
Tabelle 27:	Signifikante Veränderungen der Zytokinkonzentrationen bei Vergleich der vier gewählten Kulturansätze	134
Tabelle 28:	Zusammenfassende Darstellung des Einflusses von B7-H1 auf die Immunzellexpression aus in vivo therapierten WT- und KO-Mäusen stammenden Milzen und Tumoren	151

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Therapieschema nach Diagnose des PDA	10
Abbildung 2:	Mäusesitus	43
Abbildung 3:	Auswertungsstrategie zur Erfassung von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software	52
Abbildung 4:	Auswertungsstrategie zur Erfassung von B-Zellen sowie T _{Reg} (CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ -T-Zellen) und T _{Conv} (CD25 ⁻ FoxP3 ⁻ CD4 ⁺ -T-Zellen) in Milzen und Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software	53
Abbildung 5:	Auswertungsstrategie zur Erfassung von Makrophagen und MDSC in Milzen und Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software	54
Abbildung 6:	Anteile an Leukozyten, Lymphozyten (CD3 ⁺ -T-Zellen) sowie CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen	56
Abbildung 7:	Anteile der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD4 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen	57
Abbildung 8:	Anteile der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD8 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen	58
Abbildung 9:	Anteile der T _{Reg} (CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ -Leukozyten), T _{Conv} (CD25 ⁻ FoxP3 ⁻ CD4 ⁺ -Leukozyten) und B-Zellen (CD3 ⁻ CD19 ⁺ -Leukozyten) in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen	59
Abbildung 10:	Anteile der MDSC, F4/80 ⁺ -MDSC, granulozytären und monozytären MDSC in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen	61
Abbildung 11:	Anteile der Makrophagen (CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ F4/80 ⁺ -Leukozyten) und CD206 ⁺ -Makrophagen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen	62
Abbildung 12:	Anteile an Leukozyten, Lymphozyten (CD3 ⁺ -), CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen	64

Abbildung 13:	Anteile der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD4 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen	65
Abbildung 14:	Anteile an CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD8 ⁺ -T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen	66
Abbildung 15:	Anteile an T _{Reg} , T _{Conv} und B-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen	67
Abbildung 16:	Anteile an MDSC, F4/80 ⁺ -MDSC, granulozytären und monozytären MDSC in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen	69
Abbildung 17:	Anteile an Makrophagen und CD206 ⁺ -Makrophagen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen	70
Abbildung 18:	Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD3 ⁺ -Lymphozyten, CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	71
Abbildung 19:	Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an gesamten CD4 ⁺ -T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	72
Abbildung 20:	Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an gesamten CD8 ⁺ -T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	73
Abbildung 21:	Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden T _{Reg} , T _{Conv} und B-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	74
Abbildung 22:	Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden MDSC, MDSC-Subpopulationen sowie Makrophagen und deren Subpopulation unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	75
Abbildung 23:	Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden T-Lymphozyten, CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	78
Abbildung 24:	Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD4 ⁺ -	79

	sowie CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen an gesamten CD8 ⁺ -T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	
Abbildung 25:	Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden T _{Reg} , T _{Conv} , aktivierten T _{Conv} (act T _{Conv}) und B-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	80
Abbildung 26:	Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden MDSC, MDSC-Subpopulationen sowie Makrophagen und deren Subpopulation unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU	81
Abbildung 27:	Auswertung der B7-H1-Expression auf den untersuchten Immunzellen aus Tumoren und Milzen tumortragender und therapierter WT-Mäuse	83
Abbildung 28:	B7-H1-Expression auf CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen (naive, emT- und cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS	85
Abbildung 29:	B7-H1-Expression auf CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen (naive, emT- und cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS	87
Abbildung 30:	B7-H1-Expression auf T _{Reg} , T _{Conv} und B-Zellen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS	89
Abbildung 31:	B7-H1-Expression auf MDSC und F4/80 ⁺ -MDSC aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS	90
Abbildung 32:	B7-H1-Expression auf monozytären und granulozytären MDSC aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS	91
Abbildung 33:	B7-H1-Expression auf Makrophagen und CD206 ⁺ Makrophagen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS	93
Abbildung 34:	B7-DC-Expression auf CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen (naive-, emT-, cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS	97

Abbildung 35:	B7-DC-Expression auf CD8 ⁺ T-Zell-Subpopulationen (naive-, emT-, cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS	98
Abbildung 36:	B7-DC-Expression auf T _{Reg} , T _{Conv} und B-Zellen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS	101
Abbildung 37:	B7-DC-Expression auf MDSC und F4/80 ⁺ -MDSC aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS	102
Abbildung 38:	B7-DC-Expression auf MDSC-Subpopulationen (monozytäre und granulozytäre MDSC) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS	103
Abbildung 39:	B7-DC-Expression auf Makrophagen und CD206 ⁺ Makrophagen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS	104
Abbildung 40:	Vergleich der Zytokinkonzentrationen in tumortragenden WT- und KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Therapieeinfluss (CON)	107
Abbildung 41:	Tumorvolumen und Metastasierung in WT-Mäusen unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe (CON)	109
Abbildung 42:	Korrelation zwischen Tumorvolumina und Konzentration an (Makrophagen) CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen bzw. CD206 ⁺ -Makrophagen in WT-Mäusen	110
Abbildung 43:	Tumorvolumen und Metastasierung in KO-Mäusen unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe (CON)	111
Abbildung 44:	Auswertungsstrategie zur Erfassung von Makrophagen und MDSC ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software	113
Abbildung 45:	Gesamtanteile an Makrophagen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich	114
Abbildung 46:	Anteile an Makrophagen aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON)	114
Abbildung 47:	Gesamtanteile an MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen	115

	im Vergleich	
Abbildung 48:	Anteile an MDSC aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON)	115
Abbildung 49:	Auswertungsstrategie zur Erfassung von B7-H1/B7-DC auf Makrophagen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im FACS	116
Abbildung 50:	B7-H1-/B7-DC-Expression auf mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Makrophagen aus Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON) im FACS	117
Abbildung 51:	B7-H1-/B7-DC-Expression auf mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten MDSC aus Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON) im FACS	118
Abbildung 52:	Beispiel für die Auswertung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen aus tumortragenden WT-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. keiner Behandlung (CON) im FACS	119
Abbildung 53:	Gesamtanteile phagozytotisch aktiver Makrophagen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich	120
Abbildung 54:	Anteile phagozytotisch aktiver Makrophagen aus Tumoren von WT-/KO-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Behandlung (CON)	120
Abbildung 55:	Gesamtanteile phagozytotisch aktiver MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich	121
Abbildung 56:	Anteile phagozytotisch aktiver MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Behandlung (CON)	121
Abbildung 57:	Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen von mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten CD11b ⁺ -Zellen aus Tumoren von WT-Mäusen	123
Abbildung 58:	Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen von mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten CD11b ⁺ -Zellen aus Tumoren von KO-Mäusen	124
Abbildung 59:	Vergleichende Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen der Kontrollgruppen (ohne Therapie) ex vivo behandelte CD11b ⁺ -Zellen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen	126

Abbildung 60:	Auswertungsstrategie zur Erfassung von CD25 und CD69 auf CD4 ⁺ -T-Zellen aus WT-Mäusen im FACS	128
Abbildung 61:	Expression von CD4 ⁺ -T-Zellen und ihrer CD25 ⁺ - und CD69 ⁺ - Subpopulationen nach 72h Inkubation mit und ohne Aktivierung (- act, + act) sowie mit und ohne Kokultivierung mit CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ Zellen tumortragender WT-Mäuse (- m, + m)	129
Abbildung 62:	Proliferation aktivierter CD4 ⁺ -T-Zellen im FACS mit (rot) und ohne (blau) Kokultur mit Makrophagen	130
Abbildung 63:	CD4 ⁺ -T-Zellproliferation gesunder WT-Mäuse unter dem Einfluss von Makrophagen tumortragender WT-Mäuse	131
Abbildung 64:	Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen von CD11b ⁺ Gr-1 ⁻ -Zellen (Makrophagen) aus Tumoren von WT-Mäusen in Kokultur mit WT-Splenozyten und in Kulturen von WT-Splenozyten mit und ohne Aktivierung	134
Abbildung 65:	Kaplan-Meier-Kurve tumortragender Mäuse mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern	136
Abbildung 66:	Zytokinkonzentrationen in tumortragenden Mäusen mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern	138

IV. Abkürzungsverzeichnis

5FU	5-Fluorouracil; hier auch Bezeichnung für eine mittels 5FU behandelte Gruppe
A.	<i>Arteria (lat.)</i> , Arterie
ad us vet.	<i>ad usum veterinarium (lat.)</i> , zum tierarzneilichen Gebrauch
act	aktiviert (mittels CD3 und CD28 aktivierte Zellen; Kapitel 3.4)
AK	Antikörper
ANOVA	<i>analysis of variance (engl.)</i> , Varianzanalyse
APC	<i>antigen presenting cell (engl.)</i> , antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy 7	<i>Allophycocyanine-cyanine-7 (engl.)</i>
BAFF	<i>B cell activating factor (engl.)</i>
BCR	<i>B cell receptor (engl.)</i> , B-Zell-Rezeptor
BD	Becton Dickinson GmbH
B-Zellen	B-Lymphozyten
B7-H1	<i>programmed death-ligand 1 (engl.)</i> , CD274
B7-DC	<i>programmed death-ligand 2 (engl.)</i> , CD273
CA	Carbohydrate-Antigen
CapRI	<i>adjuvant ChemoRadiolImmunotherapy of pancreatic carcinoma</i> ; verwendetes Therapieschema der <i>Universität Heidelberg</i>
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand (engl.)</i>
CD	<i>cluster of differentiation (engl.)</i>
CFSE (CFDA-SE)	<i>carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester (engl.)</i>
CI	<i>confidence interval (engl.)</i> , Konfidenzintervall
cmT-cell	<i>central memory T cell (engl.)</i> , zentrale Gedächtniszelle
CON	Kontrollgruppe
CT	Computertomographie
CTL	<i>cytotoxic t lymphocyte (engl.)</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand(engl.)</i>
DC	<i>dendritic cell (engl.)</i> , dendritische Zelle
DE	Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid (engl.)</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid (engl.)</i>
effT-cell	<i>effector T cell (engl.)</i> , Effektor-T-Zelle
XIV	

emT-cell	<i>effector memory T cell (engl.)</i> , Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
EGF	<i>epidermal growth factor (engl.)</i>
EUS	Endoskopischer Ultraschall
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting (engl.)</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	<i>fetal bovine serum (engl.)</i>
FdUMP	5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat
FdUTP	5-Fluorodesoxyuridintriphosphat
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate (engl.)</i>
FoxP3	<i>forkhead box protein P3 (engl.)</i>
FSC	<i>forward scatter (engl.)</i>
FUTP	5-Fluorouridintriphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor (engl.)</i>
HBSS	Hank's balanced salt solution
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
I.E.	Internationale Einheit
IFN	Bezeichnung einer mit IFN- α behandelten Gruppe
IFN- α	Interferon- α
IL	Interleukin
IMC	<i>immature myeloid cells (engl.)</i>
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
i.p.	<i>intraperitoneal (lat.)</i>
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine (engl.)</i>
KO	<i>knock-out (engl.)</i> , Gendeaktivierung durch gezielte, genetische Manipulation
K-Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Lnn.	<i>lymphonodi (lat.)</i>
M	Faktor Mauslinie
M \times T	Interaktion bzw. Wechselwirkung
MACS	<i>magnetic activated cell sorting (engl.)</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue (engl.)</i>
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cell (engl.)</i>
MFI	<i>median fluorescence intensity (engl.)</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex (engl.)</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MR	Mannose-Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

MRT	Magnetresonanztomographie
n	Stichprobenumfang
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NL	Niederlande
p-Wert	Signifikanzwert
Panc02-Zellen	syngene murine Pankreaskarzinomzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline (engl.)</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction (engl.)</i>
PDA	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma (engl.)</i> , duktales Pankreasadenokarzinom
PD-L1	<i>programmed death ligand 1 (engl.)</i> , B7-H1, CD274
PD-L2	<i>programmed death ligand 2 (engl.)</i> , B7-DC, CD273
PD-1	<i>programmed death 1 receptor (engl.)</i>
PE-Cy7	<i>phycoerythrin-cyanine7 (engl.)</i>
PerCP-Cy5.5	<i>peridinin chlorophyll protein complex- cyanin 5.5 (engl.)</i>
PK	Pyruvatkinase
p.op.	<i>post operationem (lat.)</i>
PP	Pankreatisches Polypeptid
r	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
RNA	<i>ribonucleic acid (engl.)</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species (engl.)</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SPF	<i>specific pathogen free (engl.)</i>
SSC	<i>side scatter (engl.)</i>
T	Faktor Therapie
TAM	<i>tumor-associated macrophage (engl.)</i>
T _{Conv}	<i>conventional t cell (engl.)</i> , konventionelle T-Zelle
TCR	<i>t cell receptor (engl.)</i> , T-Zell-Rezeptor
TGF	<i>transforming growth factor (engl.)</i>
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	T=Tumor, N=Nodus, M=Metastase
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
TS	Thymidilat-Synthase
t-Test	Hypothesentest mit t-Verteilung
XVI	

T-Zelle	T-Lymphozyt
UICC	Union internationale contre le cancer
UK	United Kingdom
US	Ultraschall
USA	United States of America
USP	United States Pharmacopeia
V.	<i>Vena (lat.), Vene</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor (engl.)</i>
WHO	World Health Organization
WT	Wildtype

1 Einleitung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (*pancreatic ductal adenocarcinoma*=PDA) ist eine spät diagnostizierbare Neoplasie der Bauchspeicheldrüse, die eine hohe Metastasierungsneigung und eine sehr geringe Überlebenszeit der Patienten selbst nach Resektion zeigt. Tumormarker zur Frühdiagnostik existieren nicht. Eine Diagnose erfolgt für gewöhnlich erst nach Auftreten von klinischen Symptomen. Die Wirksamkeiten adjuvanter Therapien wie Chemo- und Strahlentherapie sind ebenfalls begrenzt und verlängern das Überleben der Patienten nur geringfügig. Es werden deshalb neue Therapien zur Behandlung des PDA gesucht. Das stark immunsuppressive Milieu des Tumors ließ die Überlegung immunstimulierender Therapien aufkommen. Umgekehrt wurde unter anderem das regulatorische Molekül B7-H1 im PDA entdeckt, welches stark immunsuppressive Eigenschaften besitzt und somit zur Verbesserung der Immunlage im Tumor ein mögliches Zielmolekül darstellt.

1.1 Das Pankreas

1.1.1 Anatomie

Die Bauchspeicheldrüse (Pancreas) (Waldeyer *et al.* 2012) liegt beim Menschen quer in der Bauchhöhle auf Höhe der ersten beiden Lendenwirbel (Graumann und Sasse 2004). Sie ist 70-90g schwer (Waldeyer *et al.* 2012) und liegt als langgestrecktes Organ mit ihrem Kopf (Caput pancreatis), Körper (Corpus pancreatis) und Schwanz (Cauda pancreatis) zwischen Duodenum, Magen (Graumann und Sasse 2004) und Milz (Waldeyer *et al.* 2012). Das Caput pancreatis liegt dem Duodenum an und bildet einen hakenförmigen Fortsatz aus, den Processus uncinatus. Der nach links über die Wirbelsäule hinwegziehende Teil bildet das Corpus pancreatis, das in die Cauda pancreatis übergeht, welche sich bis zum Milzhilus erstreckt (Graumann und Sasse 2004). Das Pankreas grenzt an die Rückwand des Magens an und liegt bis auf die Cauda pancreatis retroperitoneal (Waldeyer *et al.* 2012).

Die arterielle Versorgung des Caput pancreatis wird durch die Arteria (A.) mesenterica superior gewährleistet. Corpus- und Cauda pancreatis werden durch die A. lienalis und deren Gefäßästen versorgt (Graumann und Sasse 2004). Hinter dem Caput pancreatis vereinigen sich die großen Gefäße der Bauchhöhle zur Pfortader (Waldeyer *et al.* 2012). In diese münden auch die Vena (V.) lienalis und V. mesenterica superior, die das venöse Blut des Pankreas fortleiten. Der Lymphabfluss in regionäre Lymphknoten bezieht der Lage der Pankreasanteile entsprechend viele Lymphknoten der Bauchhöhle mit ein. So fließt Lymphe aus dem Caput pancreatis über Lymphonodi (Lnn.) hepatici und -mesenterici zu den Lnn.

coeliaci sowie Lymphe aus Corpus- und Cauda pancreatis über die Lnn. mesenterici ebenfalls zu den Lnn. coeliaci. Die neuronale Steuerung erfolgt über den Plexus coeliacus sowie den Plexus mesentericus superior (Graumann und Sasse 2004).

Das Pankreas wird in seiner kompletten Länge vom Wirsung'schen Gang (Ductus pancreaticus) durchzogen. Er mündet mit dem Gallengang (Ductus choledochus) auf der Papilla duodeni major im Duodenum (Pars descendens duodeni) (Waldeyer *et al.* 2012).

Der Ductus pancreaticus accessorius Santorini (Waldeyer *et al.* 2012), der ursprüngliche Hauptausführungsgang des Pankreas, ist rudimentär angelegt (Graumann und Sasse 2004). Er mündet entweder in den Ductus pancreaticus, in Verbindung mit diesem oder eigenständig auf der Papilla duodeni minor und kann auch als vollständiger Ersatzausführungsgang fungieren (Waldeyer *et al.* 2012).

Das Pankreas der Haustiere liegt ebenfalls zwischen Duodenum und Magen und wird unterteilt in ein zentrales Corpus pancreatis sowie in einen Lobus pancreatis sinister und – dexter (Budras *et al.* 2012). Zwischen den Tierarten gibt es Unterschiede hinsichtlich der Mündungsorte der Ausführungsgänge (Dahme und Weiss 2007).

1.1.2 Physiologie

Das Pankreasgewebe produziert eine Vielzahl an Enzymen und Hormonen und reguliert damit verschiedene Funktionen im Körper. Im Pankreas befinden sich u.a. Langerhans-Inseln, deren B-Zellen Insulin sezernieren und den größten Anteil des endokrinen Pankreasgewebes darstellen (Thews und Vaupel 2005). Insulin ist ein Peptidhormon, welches wie weitere Pankreashormone über Pfortader und Leber in den Blutkreislauf gelangt. Seine Ausschüttung wird v.a. durch einen steigenden Plasmaglukosespiegel, aber auch durch steigende Konzentrationen bestimmter Aminosäuren, Azetazetat und freier Fettsäuren stimuliert. Andere gastrointestinale Hormone (GLP, Glukagon, Sekretin, GIP, Gastrin, Pankreozymin, ACTH, Somatotropin, Cholezystokinin) können die B-Zellen zusätzlich für die Blutglukosekonzentration sensibilisieren (Heckmann *et al.* 2010). Durch die Ausschüttung von Insulin kommt es zur Aufnahme von Glukose über gezielt beeinflusste Transportmoleküle in v.a. Muskel- und Fettzellen und zur Glykogenbildung. Ebenfalls wird die Aufnahme von Amino- und Fettsäuren gefördert und im Gegenzug die Lipolyse, Glykogenolyse, Proteolyse und Glukoneogenese gehemmt. Insulin beeinflusst u.a. auch positiv die Aufnahme von Mg^{2+} und K^+ in die Zellen, fördert die renale Na^{2+} -Resorption und zeigt positive Effekte auf die Herzkraft und Zellteilung (Heckmann *et al.* 2010, Kumar und O'Rahilly 2005). Um nur einige der Funktionen von Insulin im Körper aufzuzeigen, ist auch

die Rolle als „Adipositassignal“ im Hypothalamus zu nennen. Gehemmt wird die Insulinausschüttung vorrangig durch im Pankreas ebenfalls produziertes Somatostatin, Amylin, Pankreatostatin sowie durch vegetative Einflüsse (Heckmann *et al.* 2010).

Ein weiteres, in den deutlich weniger vorkommenden A-Zellen gebildetes Peptidhormon ist Glukagon. Glukagon zeigt v.a. antagonistische Wirkungen zum Insulin (Heckmann *et al.* 2010). Es bindet an Glukagonrezeptoren der Hepatozyten und aktiviert über eine Enzymkaskade die Glykogenolyse (Taborsky 2010). Insulin und Glukagon regulieren so vorrangig den Blutzuckerspiegel. Die Glukagonausschüttung steigt folglich bei sinkendem Plasmaglukosespiegel und wird ebenfalls vegetativ beeinflusst. Gehemmt wird es ebenfalls durch Somatostatin sowie durch γ -Aminobuttersäure. Somit sorgt es u.a. für die Erhöhung des Blutzuckerspiegels bei Hypoglykämie bzw. erhöhtem Energiebedarf durch Förderung der Glykogenolyse, Lipolyse, Ketonkörper-Bildung, Proteinolyse und Glukoneogenese. Renal bewirkt es eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate. Die F-Zellen bilden das pankreatische Polypeptid (PP) (Thews und Vaupel 2005).

Das exokrine Pankreas bildet das Pankreassekret, welches aus Wasser, einer Vielzahl an hydrolytischen Verdauungsenzymen und Elektrolyten, hauptsächlich Hydrogenkarbonat (HCO_3^-), Chlorid (Cl^-), Kalium (K^+) und Natrium (Na^+), besteht. Durch seinen basischen pH-Wert neutralisiert es den aus dem Magen stammenden, sauren Chymus. Die Verdauungsenzyme werden durch die Azinuszellen produziert und bei Stimulation durch Exozytose sezerniert. Viele von ihnen werden als Proenzyme, also in inaktiver Form ins Duodenum entlassen, um autolytische Prozesse zu verhindern. Es besteht eine kontinuierliche Basalsekretion des Pankreassekrets. Die weitere Stimulation kann über die Reizung des Nervus vagus (z.B. der Geruch von Essen), über vasovagale Reflexe (Nahrungsaufnahme) oder durch den Einfluss weiterer gastrointestinaler Hormone und Sekretin (Chymus erreicht das Duodenum) erfolgen. Sekretin stimuliert hierbei insbesondere die Sekretion von HCO_3^- (Heckmann *et al.* 2010). Die physiologischen Aufgaben des Pankreas sind unter den Säugern weitestgehend gleich (Dahme und Weiss 2007).

1.1.3 Tumoren des Pankreas

Tumoren des Pankreas können endokrinen Ursprungs sein oder sie gehen von duktalem oder azinärem Zellen des exokrinen Pankreas aus (Munding *et al.* 2011). Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation=WHO*) unterteilt Neoplasien des Pankreas u.a. histologisch. Dabei werden die Neoplasien des exokrinen Pankreas nach ihrem Gewebsursprung in epitheliale, nicht-epitheliale und sekundäre Neoplasien sowie weiterführend ihrer Malignität nach unterteilt (Hamilton und Aaltonen 2000). Die am

häufigsten vorkommende Neoplasie des exokrinen Pankreas stellt dabei das duktales Pankreasadenokarzinom (PDA) dar (Beger *et al.* 2008). Weitere Neoplasien, wie das intraduktale papillär-muzinöse Karzinom, das muzinöse Zystadenokarzinom oder das azinäre Karzinom, kommen weitaus seltener vor. Benigne Tumoren des exokrinen Pankreas stellen beispielsweise seröse Zystadenome dar und sind ebenfalls selten (Hamilton und Aaltonen 2000).

Neoplasien des endokrinen Pankreas kommen selten vor (Capelli *et al.* 2009) und werden nach WHO als neuroendokrine Neoplasien betrachtet, welche sich wiederum in ihrer Malignität unterscheiden. Die funktionelle Unterscheidung nach dem Grad der hormonellen Aktivität ist ebenfalls geläufig. Zu den hormonell aktiven Neoplasien zählen hierbei das Insulinom, das Gastrinom oder auch das Glukagonom (Beger *et al.* 2013).

1.2 Das duktales Pankreasadenokarzinom

Das PDA ist ein derber, bindegewebsreicher Tumor (Munding *et al.* 2011). Es zeigt histologisch ein sehr vielseitiges Bild (Beger *et al.* 2013) und besitzt durch seine Tumorzellverteilung in Form von einzeln gelegenen Tumorzellnestern oder -drüsen unscharfe Ränder, die eine eindeutige Aussage über vollständige Resektion erschweren. Durch sein stark infiltratives Wachstum auch außerhalb der Hauptlokalisation besteht generell eine erhöhte Gefahr, dass Tumorzellen nach einer Resektion zurückbleiben und Ausgangspunkte für Rezidive darstellen (Munding *et al.* 2011).

Das PDA, der mit 85% häufigste Tumortyp des Pankreas (Beger *et al.* 2013), stellt eine fast immer tödlich verlaufende Krankheit dar (Laghi 2010). Es ist die viert- bis fünfhäufigste Todesursache unter den humanen Krebserkrankungen in den meisten Industrieländern (Raimondi *et al.* 2009). Im Jahr 2015 erkrankten 8750 Männer und 8690 Frauen an PDA in Deutschland. Die Zahl der an PDA erkrankten Verstorbenen betrug bei Männern 8273 und bei Frauen 8328 (Kaatsch *et al.* 2015).

Um die 80-85% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose in einem unheilbaren Status der Erkrankung. Mehr als 95% der mit PDA Diagnostizierten sterben innerhalb kurzer Zeit (Laghi 2010). Das erste Jahr überleben dabei etwa 20%, die ersten 5 Jahre weniger als 5% (Beger *et al.* 2013). Das PDA tritt beim Erwachsenen etwa ab dem 40. Lebensjahr auf, mit einem Hauptanteil von 80% zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. Die Lokalisation betrifft zu 60-70% das Caput pancreatis. Weitere 15% liegen im Corpus - und 10-15% in der Cauda pancreatis (Beger *et al.* 2013).

1.2.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Der genaue Ablauf der Tumorentstehung und -ausbreitung ist bisher nicht bekannt, jedoch einige Details der Karzinogenese. Die Entstehung des PDA ist genetisch mitbedingt. Es wurden vererbte sowie erworbene somatische Mutationen entdeckt, die Onkogene oder Tumorsuppressorgene betreffen, wie das K-ras oder das p16INK4A/CDKN2A-Gen. Durch sie wird die Regulation von Proliferation und Apoptose im Gewebe gestört und der Tumor kann entstehen. Zudem werden verschiedene Wachstumsfaktoren vermehrt beim PDA exprimiert und ermöglichen dadurch die Progression (Beger *et al.* 2013).

Die Risikofaktoren für das PDA lassen sich in genetische und nicht-genetische Faktoren unterteilen. Zu den genetischen Risikofaktoren gehören das erhöhte Risiko und das Auftreten von PDA in der Familie, wobei bislang kein Gen entdeckt wurde, das Rückschlüsse auf Vererbbarkeit zulässt sowie andere genetische Syndrome, die mit PDA assoziiert sein können (Laghi 2010). Dabei fallen 70% der erblich bedingten PDA unter die familiär bedingten und 30% unter die mit anderen erblich bedingten Syndromen (Ehehalt und Grutzmann 2011).

Die meisten Fälle von PDA entstehen durch nicht-genetische Ursachen (Laghi 2010). Darunter fallen Alter, Rauchen, fleisch- und fettreiche Ernährung, Adipositas, langjähriger Diabetes mellitus, chronische Pankreatitis, starker Alkoholkonsum (Beger *et al.* 2013), hereditäre Pankreatitis (Laghi 2010), primär sklerosierende Cholangitis (Krejs 2010), berufliche Exposition, Magengeschwüre und Infektionen mit *Helicobacter pylori* (Laghi 2010).

Die höchste Inzidenz findet sich zwischen 60 und 75 Jahren, wobei Frauen später als Männer erkranken. Rauchen führt in etwa zu einer Verdoppelung des Erkrankungsrisikos und darüber hinaus erhöhen chronische Pankreatitiden, die länger als 5 Jahre bestehen, das Risiko an PDA zu erkranken um das 14-fache (Beger *et al.* 2013). Bei hereditärer Pankreatitis wird ein 60-fach höheres Risiko beschrieben und für einen Menschen, in dessen Familie zwei direkte Verwandte PDA haben/hatten, ist das Risiko etwa 7-fach höher (Krejs 2010).

1.2.2 Klinische Symptomatik

Im frühen Stadium ist die Erkrankung asymptomatisch. Klinische Symptomatik zeigt sich beim PDA erst bei der Beeinflussung und Ausbreitung in angrenzende Gewebe und Organe (Vincent *et al.* 2011). Das klinische Bild ist sehr heterogen (Beger *et al.* 2013). Abdominale Schmerzen, Ikterus, Anorexie, Kachexie und Maldigestion sind häufig (Vincent *et al.* 2011). Zudem kann sich eine exokrine Pankreasinsuffizienz mit entsprechender Symptomatik oder

eine akute Pankreatitis als Ersterscheinung des PDA einstellen (Beger *et al.* 2013). Nicht selten wird sie von Diabetes mellitus oder Glukoseintoleranz begleitet (Vincent *et al.* 2011). Auch paraneoplastisch bedingte Thrombosen sind möglich, die ein erhöhtes Risiko für Lungenembolien darstellen (Beger *et al.* 2013).

1.2.3 Diagnostik

Eine Frühdiagnose des PDA ist zurzeit noch nicht möglich. Da Symptome erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auftreten, bleibt die Erkrankung lange unbemerkt.

Die Untersuchung von Blut gibt nur unspezifische Hinweise, wie Anämie oder Erhöhung des C-reaktiven Proteins. Ein aussagekräftiger Tumormarker zur Früherkennung der Erkrankung ist noch nicht gefunden. Am besten geeignet ist bislang das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9), mit einer Sensitivität von 69-93% und einer Spezifität von 76-99%. Der *Cut-off-Wert* liegt bei >37 U/ml. Ein neuerer Marker, M2-Pyruvatkinase (M2PK), ist ebenfalls nicht zur Früherkennung geeignet und nicht PDA-spezifisch. Der Einsatz der Tumormarker erfolgt daher nur im Zusammenhang mit Erfolgskontrollen der Therapie und der Prognose (Beger *et al.* 2013).

Bei Verdacht auf PDA werden folgende bildgebende Verfahren angewendet: abdominaler Ultraschall (US), Computertomographie in Dünnschnitttechnik (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder endoskopischer Ultraschall (EUS). Die Reihenfolge richtet sich dabei nach medizinisch und wirtschaftlich sinnvollen Aspekten. Ziel ist dabei der Nachweis, die Charakterisierung und die Differenzierung des PDA von anderen Läsionen des Pankreas sowie das Staging und die Beurteilung der Resektabilität des Tumors (Beger *et al.* 2013).

Das PDA stellt sich im US als eine hypoechogene, einheitliche Masse mit infiltrierte Rändern dar (Laghi 2010). Es kann oft bereits eine Aussage zur Resektabilität getroffen werden. Im CT kann wiederum die Beziehung zu Gefäßen der Umgebung genauer dargestellt und beurteilt werden (Beger *et al.* 2013). Lymphknotenbefall kann jedoch nicht im CT dargestellt werden. Hauptgrund für die CT-Untersuchung ist die Suche nach Leber- und Bauchwandmetastasen (Laghi 2010). Die Identifikation von Lebermetastasen ist bei kontrastverstärkter Untersuchung im MRT eindeutiger als im CT. Zudem kann der Befall von Lymphknoten betrachtet werden, was jedoch präoperativ nicht von Bedeutung hinsichtlich der Resektabilität ist. Das MRT ist demnach sehr gut für die Diagnostik geeignet, jedoch auch deutlich teurer (Beger *et al.* 2013). Der EUS kann zur Diagnosestellung sowie zum Staging verwendet werden. PDA stellt eine der Hauptindikationen für eine EUS-

Untersuchung dar. Bei dem EUS wird die Ultraschalluntersuchung mittels Endoskop durch die Magenwand hindurch vorgenommen, der das Corpus- sowie die Cauda pancreatis anliegen. Untersuchungen auf Höhe des Duodenum erlauben Darstellungen des Caput pancreatis. Im EUS sind kleinere Tumoren aufgrund höherer Auflösung besser zu detektieren (Laghi 2010). Weitere Untersuchungsmethoden haben sich in der Praxis noch nicht bewährt (Beger *et al.* 2013).

1.2.4 Staging und Prognose

Das Staging des PDA erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (T, N, M=Primärtumor, Regionale Lymphknoten (Nodus), Metastasen; Tabelle 2). Es orientiert sich hierbei an der Resektabilität des Primärtumors und steht im Zusammenhang mit der Überlebenszeit (Vincent *et al.* 2011). Die Resektabilität wird in erster Linie durch die anatomische Ausbreitung des Tumors bestimmt (Beger *et al.* 2013). Zeigt ein PDA bereits Fernmetastasen gilt es als irresektabel (Esposito *et al.* 2008). Nach Resektion des PDA wird der Status über die verbliebenden Tumoranteile erhoben, die sogenannte Residualtumor-Klassifikation (Tabelle 1). Anzustreben ist eine R₀-Situation, bei der kein Tumorgewebe zurückgeblieben ist. Ob diese Situation erreichbar ist, wird vorab durch die TNM-Klassifikation abgewogen (Beger *et al.* 2013).

Lokale oder resezierbare Tumoren, die ungefähr 10% der vorgestellten PDA ausmachen, gehen nach Resektion mit einer mittleren Überlebenszeit von 17-23 Monaten einher, grenzwertig resezierbare Tumoren (10%) mit etwa 20 Monaten, lokal erweiterte oder nicht resezierbare Tumoren (etwa 30%) mit 8-14 Monaten und metastasierende Tumoren (etwa 60%) mit 4-6 Monaten (Vincent *et al.* 2011). Eine Sicherung der Diagnose erfolgt zusätzlich histologisch. Das Staging ermöglicht ein einheitliches Therapiemanagement und eine Abschätzung der Prognose (Beger *et al.* 2013).

Tabelle 1: Residualtumor-/R-Klassifikation modifiziert nach Union internationale contre le cancer (UICC)(Wittekind 2017).

Tumorstatus nach Resektion:	
RX	Vorhandensein eines Residualtumors nicht beurteilbar
R0	kein Residualtumor vorhanden
R1	mikroskopisch vorhandener Residualtumor an der Resektionslinie
R2	makroskopisch vorhandener Residualtumor an der Resektionslinie

Anhand der R-Klassifikation des resezierten Tumors können das weitere therapeutische Vorgehen sowie die Prognose hinsichtlich Genesung bzw. Überlebensdauer definiert werden.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation und Staging des PDA modifiziert nach UICC (Wittekind 2017).

<u>Beurteilung des Primärtumors:</u>			
TX	Der Primärtumor ist nicht beurteilbar		
T0	Es ist kein Primärtumor vorhanden		
Tis	<i>Carcinoma in situ:</i>		
T1	Der Primärtumor ist bis zu 2 cm groß und auf das Pankreas begrenzt		
T2	Der Primärtumor ist größer als 2cm und auf das Pankreas begrenzt		
T3	Der Primärtumor hat sich bereits außerhalb des Pankreas ausgebreitet, befällt aber nicht den Truncus coeliacus oder die Arteria mesenterica superior		
T4	Der Primärtumor infiltriert den Truncus coeliacus und/oder die Arteria mesenterica superior		
<u>Beurteilung der peripankreatischen Lymphknoten:</u>			
NX	Die regionären Lymphknoten sind nicht beurteilbar		
N0	Es sind keine Metastasen in regionären Lymphknoten vorhanden		
N1	Es sind Metastasen in regionären Lymphknoten vorhanden		
<u>Beurteilung von Fernmetastasen:</u>			
M0	Es sind keine Fernmetastasen vorhanden		
M1	Es sind Fernmetastasen vorhanden		
<u>Staging:</u>			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T4	Jedes N	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Das Staging des Tumors bestimmt das weitere therapeutische Vorgehen sowie die Prognose.

1.2.5 Therapie

1.2.5.1 Chirurgie

Die chirurgische Resektion des PDA ist die einzige Methode mit Chance auf Heilung (Vincent *et al.* 2011). Ihr Ziel ist das Erreichen einer R₀-Situation (Beger *et al.* 2013). Jedoch zeigen nur 20% der vorgestellten Patienten einen noch entfernbaren Tumor, 30% einen lokal ausgebreiteten Tumor, der bereits angrenzende Gefäße infiltriert hat und 50% der Patienten haben bereits Metastasen (Laghi 2010). Je nach Ausgangssituation zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung entscheidet sich demnach der Therapieansatz (siehe nachfolgend Abbildung 1).

Standardeingriffe bei resektablen Tumoren sind die partielle Pankreatikoduodenektomie bei Befall des Pankreaskopfes, die distale Pankreatektomie bei Tumoren in Pankreaskörper und –schwanz und die totale Pankreatikoduodenektomie, die bei ausgedehntem Tumorbefund intraoperativ oder ungünstiger Tumorklage abgewägt werden muss. Hierbei wird auch die Milz mitentfernt. Alle Methoden erfolgen zusammen mit der Entfernung befallener regionärer Lymphknoten sowie anschließender adjuvanter Chemotherapie (Beger *et al.* 2013).

Chirurgische Eingriffe können in Ausnahmefällen auch zur palliativen Behandlung erfolgen, wenn ein Eingriff die Symptomlast des Patienten verringern kann (Laghi 2010).

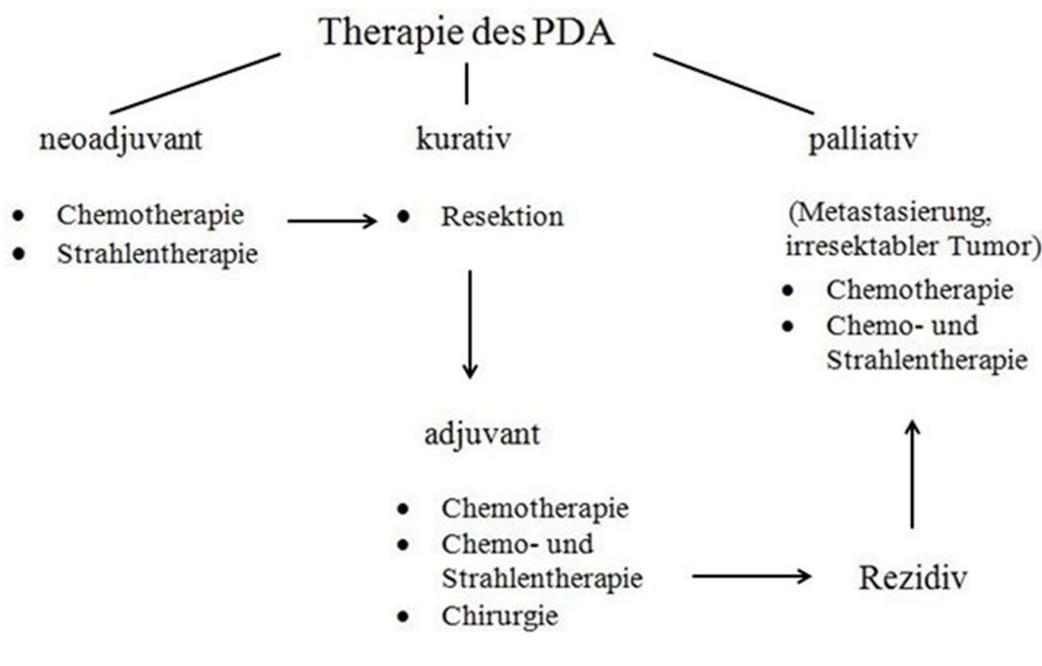
1.2.5.2 Chemotherapie

Die Chemotherapie ist die Behandlung der Wahl bei fortgeschrittenem PDA. Je früher sie beginnt, desto besser sind ihre Erfolge. Sie wird adjuvant nach Tumorresektion angewendet oder als Standardtherapie bei nicht resezierbaren Tumoren (siehe nachfolgend Abbildung 1). Je nach Verträglichkeit wird sie bis zur Progression des Tumors fortgeführt. Erfolgskontrollen erfolgen alle zwei bis drei Monate mittels bildgebender Verfahren. Kombinationstherapien zeigen bessere Erfolge als Monotherapien. Es gibt jedoch keine Standards in der Wahl der Kombination von Präparaten. Basispräparate sind Gemcitabin und 5-Fluorouracil (Beger *et al.* 2013).

5-Fluorouracil (5FU): Als Standard-Chemotherapeutikum (Kizilbash *et al.* 2014), das in vielen Tumorarten eingesetzt wird (Longley *et al.* 2003), erhöht 5FU nachweislich die Überlebenszeit nach chirurgischer Resektion des PDA (Kizilbash *et al.* 2014). Es stellt ein Analogon zu Uracil da (Longley *et al.* 2003) und kann in gleicher Weise als Baustein in die RNA und DNA eingebaut werden (Frey und Löscher 2010). Nach Umbau des intravenös zu verabreichenden 5FU, wird dieses in verschiedene Metaboliten gespalten. Hierzu zählen als aktive Formen 5-Fluorouridintriphosphat (FUTP), 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) und 5-Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) (Longley *et al.* 2003). FUTP wird in die RNA eingebaut und hemmt die Proteinsynthese, FdUMP hemmt die Thymidilat-Synthase (TS), wird als FdUTP in die DNA eingebaut und bewirkt DNA-Strangbrüche (Frey und Löscher 2010). Dadurch kommt es zum Zelltod (Longley *et al.* 2003).

Da unter der Therapie mit 5FU vermehrt unerwünschte Wirkungen auftreten (Longley *et al.* 2003), werden bei der Chemotherapie heute oft verschiedene Präparate kombiniert eingesetzt. Capecitabin beispielsweise stellt eine Vorstufe des 5FU dar. Es hat den Vorteil

oralen Verabreichung. Zudem wird es weniger stark durch die Leber verstoffwechselt und kann sich in höheren Konzentrationen im Tumorgewebe und weniger stark systemisch anhäufen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Aktivität der Thymidinphosphorylase, die an der Katabolisierung des Capecitabin mitbeteiligt ist, durch Strahlentherapie im Tumorgewebe erhöht werden kann (Kim *et al.* 2013). Verschiedene weitere Möglichkeiten sind erforscht, die die Wirkung von 5FU verstärken können. So kann das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD), das 80% des anflutenden 5FU in der Leber bereits katabolisiert, inhibiert werden oder das Bindungsvermögen von Thymidilat-Synthase hinsichtlich FdUMP durch Leucovorin erhöht werden (Longley *et al.* 2003).



Begleittherapie

- Schmerztherapie
- Ernährungsberatung
- Physiotherapie
- Thromboseprophylaxe
- Psychoonkologische Betreuung

Abbildung 1: Therapieschema nach Diagnose des PDA modifiziert nach Pelzer et al. 2014. Die Therapie des PDA entscheidet sich aus der Ausgangssituation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Teilweise kann eine neoadjuvante Therapie zur Verbesserung des chirurgischen Eingriffs von Nutzen sein. Ist das PDA resektabel, so wird diese kurative Therapie angestrebt. Es schließt sich beim PDA i.d.R. eine adjuvante Therapie an die Resektion an. Bei inoperablen oder therapieresistenten Tumoren bzw. Rezidiven ist nur noch eine palliative Therapie möglich. Zusätzlich ist eine parallele Begleittherapie zur Stabilisierung sowie zur Verbesserung des Allgemeinbefindens des Patienten notwendig.

1.2.5.3 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie kann bei der Behandlung des PDA vielseitig eingesetzt werden. So können Tumoren präoperativ bestrahlt werden, um die Erfolgsaussichten einer Resektion zu verbessern (Beger *et al.* 2013) oder sie wird intraoperativ eingesetzt, um gezielt Tumorgewebe zu bestrahlen und das gesunde Gewebe weniger zu schädigen.

Einige vergleichende Studien haben ergeben, dass postoperativ die Kombination von Chemo- und Strahlentherapie bessere Erfolge erzielt, als die Strahlentherapie alleine. Im Vergleich von Chemo- und Chemoradiotherapie gab es jedoch keine signifikanten Vorteile (Laghi 2010).

1.2.5.4 Immuntherapie

Aufgrund der immunsuppressiven Umgebung, die Tumorzellen und suppressorische Zellen erzeugen, kann sich ein Tumor dem Immunsystem entziehen und wird nicht von den Immunzellen angegriffen. Beim PDA zeigen T-Zellen durch das vorherrschende Milieu eine verminderte Aktivität und Zytokinproduktion. Die suppressive Rolle von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) auf T-Zellen scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (Lowy *et al.* 2008).

Die Immuntherapie zielt auf eine Verbesserung der Antitumorantwort ab. Sie kann dabei aktiv oder passiv erfolgen. Zudem wird eine spezifische von einer unspezifischen Immuntherapie unterschieden. Dies kann für den Überblick der Tabelle 3 entnommen werden (Hoffmann-La-Roche-Aktiengesellschaft und Reiche 2003).

Die Tumorstimmung, bei der tumorspezifische Antigene eingesetzt werden, spielt in der Praxis bisher kaum eine Rolle (Prendergast und Jaffee 2013). Die spezifisch-passive Immuntherapie, bei der monoklonale Antikörper gegen z.B. Oberflächenantigene der Tumorzellen verwendet werden (Lowy *et al.* 2008), ermöglicht es, Tumorzellen für das Immunsystem sichtbar zu machen. Antikörper können aber auch Rezeptoren blockieren und so immunsupprimierende Feedbackmechanismen aufhalten (Prendergast und Jaffee 2013). Neben den spezifischen Immuntherapien rückt die unspezifische Immuntherapie durch Einsatz von immunstimulierenden Zytokinen wie Interferon- α (IFN- α) und Interleukin (IL)-2 in den Fokus der aktuellen Wissenschaft (Schmidt *et al.* 2007).

Tabelle 3: Einteilung der Immuntherapie-Formen.

Immuntherapie	Aktiv	Passiv
Spezifisch	Verwendung tumorassoziierter Antigene („Tumorvakzine“)	Passive Immunisierung (Verwendung monoklonaler Antikörper)
Unspezifisch	Verwendung von Immunstimulantien (Zytokine)	

In den letzten Jahren wurden einige Immuntherapieansätze vermehrt im PDA untersucht. In vielen präklinischen Untersuchungen waren die Effekte der Immuntherapie jedoch deutlich positiver zu verzeichnen, als in darauffolgenden klinischen Studien (Chang *et al.* 2016, Thind *et al.* 2017). Ansätze waren hierbei die Vakzinierung der Tumorpatienten (Ganz-Zell-, DC-, DNA- sowie Peptid-Vakzinierungen), das Einschleusen von autologen tumor-infiltrierenden Leukozyten (TILs) ins PDA, die Immunmodulation durch Verwendung von spezifischen Antikörpern (z.B. CD-40-Agonist-Antikörper zur Verbesserung der T-Zell-Antwort) und Regulation von sogenannten „Immun-Checkpoints“. Hierzu zählt u.a. die Verwendung von B7-H1-Antikörpern, wie sie nachfolgend in dieser Arbeit näher untersucht wurde (Thind *et al.* 2017). Die Immuntherapie kann die Standardtherapie (neben der Resektion des Tumors) mittels Chemo- und/oder Radiotherapie im PDA nicht ersetzen. Auch ist noch nicht geklärt, wann der Einsatz der Immuntherapie während des Behandlungsintervalls am effektivsten ist. Es konnte aber insgesamt gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie (Immuntherapie + Chemo-/Radiotherapie) eine signifikant bessere Wirkung auf die mittlere Überlebenszeit der Patienten zeigte, als die Immuntherapie alleine (Zhang *et al.* 2017).

Der Einsatz von IFN- α als Immuntherapeutikum in der PDA-Therapie wird durch die *Universität Heidelberg* im sogenannten CapRI-Schema praktiziert (Knaebel *et al.* 2005). Hierbei werden PDA-Patienten postoperativ mit einer Kombination aus Chemo-, Strahlen- und Immuntherapie behandelt. Die Gabe von IFN- α , 5FU und Cisplatin in definierten Dosierungen und Intervallen wird 5,5 Wochen mit einer äußeren Strahlentherapie kombiniert. Anschließend wird die Chemotherapie mit 5FU in zwei weiteren Zyklen fortgesetzt. Verglichen wurde diese Therapie mit einer zweiten Patientengruppe, die beginnend einen intravenösen Bolus Folsäure und darauffolgend in sechs Zyklen mit 5FU Boli behandelt wurde. Untersucht wurden v.a. die Auswirkungen von IFN- α auf die Immunzellen und das Zytokinmilieu. Durchweg konnte eine deutlich immunstimulierende Wirkung, wie auch schon vorab durch in vivo-Untersuchungen, ausgemacht werden (Schmidt *et al.* 2007). In einer

Studie von *Picozzi et al.*, die der Entwicklung des CapRI-Behandlungsschemas voranging, zeigte sich eine 5-Jahres-Überlebenszeit von 55%. Die Patienten wurden hierbei nach chirurgischer Resektion des PDA mit Chemo- und Strahlentherapie behandelt, kombiniert mit der Gabe von IFN- α (*Picozzi et al.* 2003). Nach chirurgischer Resektion des Tumors mit anschließender adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie ohne IFN- α liegt diese nur bei bis zu 25% (*Schmidt et al.* 2007).

1.3 Pankreastumoren der Haustiere

Neben anderen Erkrankungen des Pankreas treten auch bei den Haustieren, wenn auch sehr selten, Pankreastumoren auf (*Dahme und Weiss* 2007).

Im endokrinen Pankreas, auch Inselorgan genannt (*Dahme und Weiss* 2007), bilden sich vorwiegend bei älteren Hunden und älteren Ratten (*Minkus et al.* 1997), aber auch bei Katze, Rind und Schwein Inseladenome, auch Nesidioblastome genannt. Hierzu zählt das endokrin aktive Insulinom der B-Zellen. Außerdem kommen Gastrinome vor (*Dahme und Weiss* 2007). Tumoren des endokrinen Pankreas sind seltener als solche des exokrinen Pankreas (*Kessler* 2012).

Tumoren des exokrinen Pankreas kommen am häufigsten bei Hund und Katze vor (*Dahme und Weiss* 2007), dabei erkranken Tiere in höherem Alter öfter (*Priester* 1974), im Durchschnitt mit 9-10 Jahren, frühestens mit 2 Jahren. Weniger als 5% aller abdominalen Tumoren entspringen dem exokrinen Pankreas (*Kessler* 2012). In absteigender Häufigkeit treten dabei Adenokarzinome, Adenome sowie auch mesenchymale Tumoren auf. Davon abzugrenzen sind knotige Hyperplasien (*Dahme und Weiss* 2007).

Im Gegensatz zum PDA des Menschen, sind Pankreasadenokarzinome von Hund und Katze vermutlich überwiegend azinären Ursprungs (*Banner et al.* 1979) und beim Hund vorrangig im Corpus pancreatis lokalisiert (*Kessler* 2012). Adenokarzinome zeigen ein infiltratives Wachstum (*Dahme und Weiss* 2007), wodurch es zur Verlegung des Gallenganges kommen kann. Der Tumor metastasiert früh. Betroffene Organe sind unter anderen das Peritoneum, die Leber, die regionalen Lymphknoten, das Zwerchfell, die Lunge und die Knochen (*Kessler* 2012).

1.3.1 Symptome

Klinische Symptome die mit Pankreasadenokarzinomen einhergehen sind Gewichtsabnahme, Inappetenz, Vomitus und Aszites. Bei Verlegung des Gallenganges und

Metastasierung in die Leber kommt es zum Ikterus. Eine Insuffizienz des exokrinen Pankreas liegt sehr selten vor. Seltener ähneln die Symptome einem akuten Abdomen oder einer akuten Pankreatitis. Eine kranial abdominal gelegene Masse ist bei Hund selten palpierbar, bei Katzen sei dies aber bei ca. einem Drittel aller Fälle möglich. Weitere paraneoplastische Symptome, die v.a. mit Hautreaktionen einhergehen, sind bei Hund und Katzen beschrieben, in ihrer Entstehung aber noch größtenteils unklar (Kessler 2012).

1.3.2 Diagnose

Diagnostische Verfahren sind die Blutuntersuchung, eine Punktatuntersuchung auf Tumorzellen bei bestehender Aszites sowie röntgenologische und sonografische Untersuchungen mit Feinnadelaspirationen bis hin zu Biopsien. Blutuntersuchungen sind häufig unspezifisch; stark erhöhte Lipaseaktivitäten können beim Hund, vor allem im Zusammenhang mit einem Ikterus, aber einen sehr hohen Verdacht ermöglichen. Röntgenuntersuchungen dienen nur der Darstellung von Lungenmetastasen bzw. dem Ausschluss anderer Veränderungen, da das Pankreas selbst schlecht darstellbar ist. Im Ultraschall weisen multiple, kleinere Veränderungen auf eher benigne Prozesse hin. Eine genaue Diagnosestellung ist auch mittels Sonografie nicht möglich, kann aber durch Veränderungen weiterer Bauchorgane und Entnahme von Biopsien erhärtet werden. Beim Hund hat sich zudem die Diagnostik mittels CT als recht spezifisch erwiesen (Kessler 2012).

1.3.3 Prognose und Therapie

Die Prognose ist schlecht. Beim Haustier besteht ebenfalls eine hohe Chemo- und Strahlentherapieresistenz im Pankreasadenokarzinom und es sind nur wenige Fälle und Schemata zur Behandlung beschrieben. Bei ausschließlichem Vorliegen eines Primärtumors wird eine Pankreatektomie durchgeführt. Je nach Situation kann sie mit einer Duodenektomie kombiniert werden. Die Erfolgsrate ist jedoch gering und die Operation chirurgisch sehr anspruchsvoll. Nach vollständiger Pankreatektomie, die eher nur in der Humanmedizin durchgeführt wird, muss eine lebenslange enzymatische sowie hormonelle Substitutionstherapie erfolgen. Überlebenszeiten nach Diagnose eines Pankreasadenokarzinoms ab Beginn der klinischen Symptome liegen für Hund und Katze zwischen 3 und 90 Tagen. Die meisten Tiere werden nach Diagnose zeitnah euthanasiert (Kessler 2012).

1.4 Das Immunsystem

1.4.1 Aufbau und Aufgaben des Immunsystems

Das Immunsystem dient dem Schutz des Körpers vor Krankheitserregern und anderen körperfremden Substanzen. Es dient ebenso dem Erkennen und Abbau von körpereigenen toten oder fehlerhaften Zellen sowie von Tumorzellen. Dieses komplexe Gebilde setzt sich aus dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem zusammen, die i.d.R. zusammen agieren. Werden körpereigene Zellen fälschlicherweise von der Immunabwehr angegriffen, so liegt eine Autoimmunerkrankung vor (Murphy und Weaver 2018, Rink *et al.* 2015).

Die erste Reaktion auf ein Pathogen obliegt dem angeborenen Immunsystem. Es entscheidet zwischen körpereigen und körperfremd und trägt zum Auslösen einer geeigneten adaptiven Immunantwort bei (Murphy und Weaver 2018). Es erkennt dabei die Erreger jedoch nicht spezifisch, sodass kein gezielter Schutz gegen eine erneute Infektion entstehen kann (Vollmar *et al.* 2012). Ersten Kontakt haben in der Regel antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen (*dendritic cells*=DC) und Makrophagen. Durch sie wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die weitere Zellen, vor allem neutrophile Granulozyten, zum Ort der Infektion transportiert. Ebenso wie neutrophile Granulozyten phagozytieren Makrophagen die Pathogene. Sie erkennen sie anhand ihrer Oberflächenrezeptoren. Die Pathogene werden ins Zellinnere transportiert und dort abgebaut (Murphy und Weaver 2018).

Einen weiteren Teil des angeborenen Immunsystems bildet das Komplement. Es besteht aus verschiedenen Proteinen im Blutplasma und der extrazellulären Flüssigkeit und bildet nach Aktivierung einen Membranangriffskomplex am Krankheitserreger. Während der Aktivierungskaskade werden zudem chemotaktisch Phagozyten angelockt und die Zerstörung des Krankheitserregers somit auf mehreren Wegen eingeleitet (Rink *et al.* 2015).

Das adaptive oder erworbene Immunsystem hingegen kann ein Pathogen nicht nur gezielt erkennen und zerstören (zelluläre Immunabwehr), sondern baut auch ein immunologisches Gedächtnis auf, z.B. durch die Bildung von Antikörpern (humorale Immunabwehr) (Rink *et al.* 2015, Vollmar *et al.* 2012).

1.4.2 Organe und Zellen des Immunsystems

Ursprung aller immunkompetenten Zellen sind pluripotente hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks. Diese differenzieren während ihrer Reifung zu verschiedenen Vorläuferzellen. So entstehen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Mastzellen aus

einer gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle sowie B-Lymphozyten (B-Zellen), T-Lymphozyten (T-Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle. DC können aus beiden dieser Zelllinien entstehen. Ebenfalls gehen Erythrozyten sowie Thrombozyten aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen hervor. Alle diese Zellen sind im Blut vorzufinden. Einige zirkulieren dort, andere wandern in lymphatische Organe ein.

Thymus und Knochenmark, die primären lymphatischen Organe, sind für die Lymphopoese zuständig. T-Zellen reifen im Thymus heran, B-Zellen im Knochenmark.

Zu den sekundären lymphatischen Organen zählen die Milz, die Lymphknoten und die Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (*mucosa associated lymphoid tissue*=MALT). Sie sollen die Entwicklung einer erworbenen Immunantwort gewährleisten, denn hier können Lymphozyten und Antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*=APC) interagieren (Vollmar *et al.* 2012). Nachfolgend werden die in dieser Arbeit näher untersuchten Immunzellen charakterisiert.

1.4.2.1 T-Lymphozyten

Eine Hauptgruppe der Lymphozyten stellen die T-Zellen dar. Diese Bezeichnung tragen sie aufgrund ihres Heranreifens im Thymus und werden anhand ihrer heterogenen Funktionen in weitere Untergruppen unterteilt. Die Unterteilung orientiert sich dabei an bestimmten Oberflächenmolekülen der T-Zellen, an die bestimmte Gruppen monoklonale Antikörper binden, weshalb sie als Differenzierungscluster (*cluster of differentiation*=CD) bezeichnet werden. Allen T-Zellen gemein ist ihr Oberflächenrezeptor, der T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*=TCR), der mit CD3 und somit mit dem Komplementsystem interagiert. Nach Kontakt mit einem Antigen werden die T-Zellen über ihren TCR aktiviert und differenzieren sich zu T-Effektorzellen. CD4⁺-T-Effektorzellen differenzieren sich zu verschiedenen T-Helferzellen. Sie dienen der Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen. Ihre Aktivierung erfolgt über die Erkennung eines Antigens einer antigenpräsentierenden Zelle auf einem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*=MHC) -II-Molekül durch ihren TCR. Die Aktivierung der zytotoxischen CD8⁺-T-Effektorzellen erfolgt über die Präsentation von Antigenfragmenten an MHC-Klasse-I-Molekülen. Durch Erkennung eines an das MHC-Klasse-I-Molekül gebundene Peptid, Bindung an die Zielzelle und Auslösen der Apoptose mit Hilfe von zytotoxisch-wirkenden Molekülen sind diese T-Zellen in der Lage eine infizierte Zelle direkt zu töten (Murphy und Weaver 2018).

Die T-Helferzellen unterteilen sich primär in zwei Hauptgruppen, innerhalb derer in den letzten Jahren weitere Untergruppen entdeckt wurden. T_H1-Zellen sind für die Aktivierung

von Pathogen-tragenden Makrophagen zuständig, durch Induktion der Lyse des Pathogens im Makrophagen (Murphy und Weaver 2018). Anhand der Sekretion von Zytokinen lassen sich Unterschiede zu T_H2 -Zellen darstellen, wobei auch durchaus gleiche Zytokine durch beide Zelltypen sezerniert werden können. Ausschließlich durch T_H1 -Zellen werden Zytokine wie IFN- γ , IL-2 und Lymphotoxin sezerniert (Mosmann und Coffman 1989). Zudem senden sie kostimulatorische Signale an B-Zellen, die die Produktion von Antikörpern fördern. Hingegen induzieren T_H2 -Zellen ausschließlich die humorale Immunantwort durch die Differenzierung naiver B-Zellen hin zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Murphy und Weaver 2018). Von ihnen werden Zytokine des Typ II (Disis *et al.* 2009), wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produziert (Mosmann und Coffman 1989, Murphy und Weaver 2018). Zum Schutz des Organismus vor übergreifenden zerstörenden Zellmechanismen existieren zudem regulatorische T-Zellen (T_{Reg}). Man unterscheidet adaptive T_{Reg} , die in peripheren lymphatischen Organen gebildet werden und unter Einfluss von Fremdanitigenen aus konventionellen $CD4^+$ -T-Zellen differenzieren, von natürlichen T_{Reg} , die ihre Differenzierung im Thymus vollziehen (Murphy und Weaver 2018). Ein wichtiger Unterschied dieser Zelltypen besteht im Mechanismus ihrer suppressiven Aktivität (Mahic *et al.* 2006, Miyara und Sakaguchi 2007). Natürliche T_{Reg} inhibieren durch direkten Zellkontakt die Ausschüttung von IL-2 durch T-Zellen. Adaptive T_{Reg} wirken wiederum vorrangig über die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, wie IL-10 und den transformierenden Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*=TGF)- β , auf T-Zellen und APC ein (Bluestone und Abbas 2003). T_{Reg} sind $CD4^+$ -T-Zellen, die in der Durchflusszytometrie anhand der Oberflächenmoleküle CD25 und FoxP3 in Menschen und Mäusen identifiziert und von konventionellen T-Zellen (*conventional T cells*= T_{Conv}) unterschieden werden können (Li und Zheng 2015, Rueda *et al.* 2015).

Weiterhin existieren sogenannte T-Gedächtniszellen, die das immunologische Gedächtnis mitbilden (Murphy und Weaver 2018). Diese können aus $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen hervorgehen, wobei noch nicht alle Einflüsse der Differenzierung bekannt sind. T-Gedächtniszellen unterscheiden sich in ihren Funktionen, wodurch sie auch weiter in zentrale und Effektor-Gedächtniszellen unterteilt werden. Für die Zellanalyse wird hierzu die Expression von L-Selektin (CD62L) beobachtet (Seder und Ahmed 2003), welches als Endotheladhäsionsfaktor für die Migration der Zellen von Bedeutung ist (Murphy und Weaver 2018) und bei zentralen Gedächtniszellen vorhanden ist (Seder und Ahmed 2003).

1.4.2.2 B-Lymphozyten

B-Zellen stellen eine weitere Zellpopulation des adaptiven Immunsystems dar (Harris und Drake 2013). Sie bilden antigenspezifische Antikörper, können als APC Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren und produzieren Zytokine und Chemokine (Sanz *et al.* 2008).

Sie entstehen beim adulten Menschen im Knochenmark und gehen dort aus der lymphatischen Zelllinie hervor. Ihre Entwicklung hin zur naiven B-Zelle findet ebenfalls im Knochenmark statt. Hier durchlaufen die Zellen Selektionsstadien, um über das Blut in die peripheren lymphatischen Organe zu gelangen (Murphy und Weaver 2018). Bei den Tieren gibt es Unterschiede der Orte der B-Zell-Reifung. Beim Vogel findet die Reifung in der Bursa fabricii statt, bei Schaf, Rind und Kaninchen durch das *gut-associated lymphoid tissue* (GALT) des Darms. Die B-Zell-Reifung in der Maus findet vergleichbar mit der des Menschen im Knochenmark statt (Von Engelhardt *et al.* 2015). Treffen sie auf ein Antigen, werden sie mit oder ohne Einfluss von T-Helferzellen aktiviert worauf sie proliferieren und zu Gedächtniszellen oder Plasmablasten differenzieren. Plasmablasten wandern ins Knochenmark und differenzieren dort weiter zu Plasmazellen, die Antikörper bilden. Gedächtniszellen wandern mit dem Blutfluss umher und in andere periphere lymphatische Organe (Robert-Koch-Institut 2006).

Die Antigenbindung erfolgt über B-Zell-Antigenrezeptoren (*B cell receptor*=BCR). Das Pathogen wird in die Zelle geschleust, dort zu Peptiden abgebaut und über MHC-II-Moleküle an der Oberfläche T-Helferzellen präsentiert. Nach Bindung der T-Zelle sezerniert diese IL-4 und IL-13 und induziert so die Proliferation und Differenzierung der B-Zelle (Murphy und Weaver 2018). Die sezernierten Antikörper der Plasmazellen sind hochspezifisch für ihr Antigen (Harris und Drake 2013) und zerstören extrazelluläre Mikroorganismen und Viren. Die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen aktiviert zudem das Komplementsystem (Murphy und Weaver 2018).

B-Gedächtniszellen sind langlebige Zellen (Robert-Koch-Institut 2006), die gegenüber ihrem Antigen empfindlicher reagieren. Somit kommt es nach erneutem Antigenkontakt zu einer schnelleren Immunantwort (Murphy und Weaver 2018). Zur Analyse der B-Zellen dienen folgende, spezifischen Oberflächenantigene: CD19, CD20, CD21 und CD22. Im Gegensatz zu T-Zellen sind sie zudem CD3-, CD4- und CD8- (Robert-Koch-Institut 2006).

1.4.2.3 CD11b⁺-Zellen

Makrophagen und myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*=MDSC) entstehen beide aus myeloiden Vorläuferzellen (Gabrilovich und Nagaraj 2009, Murphy und

Weaver 2018). Neben Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen, die ebenfalls aus dieser Zelllinie hervorgehen, besitzen sie das Oberflächenantigen CD11b (Hoffbrand 2003). Eine weitere Unterscheidung von MDSC und Makrophagen wird anhand der Expression des Oberflächenantigen Gr-1 getroffen. So lassen sich MDSC als CD11b⁺Gr-1⁻ und Makrophagen als CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen unterscheiden (Biswas und Mantovani 2010, Youn und Gabrilovich 2010).

1.4.2.3.1 CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen / MDSC

Aus den myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks entstehen alle Leukozyten mit Ausnahme der Lymphozyten (Murphy und Weaver 2018). Dabei differenzieren sich im gesunden Organismus die unreifen myeloiden Zellen (*immature myeloid cells*=IMC) schnell in reife Granulozyten, Makrophagen oder DC. Unter pathologischen Umständen, wie z.B. bei einer Tumorerkrankung, kann die Differenzierung der IMC verhindert werden, sodass es zu einer erhöhten Bildung unreifer Zellstadien kommt. Diese heterogene Gruppe aktivierter, unreifer Zellen myeloiden Ursprungs wird als MDSC bezeichnet. Einfluss auf die fehlende Differenzierung haben hierbei Tumorzellen, Tumorstromazellen sowie aktivierte T-Zellen. Es konnten in verschiedenen Tumorarten unterschiedliche Zytokine nachgewiesen werden, die Einfluss auf die Differenzierung nehmen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass bei abnormaler bzw. permanenter Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) auf IMCs eine Differenzierung in ein reifes Zellstadium nicht möglich ist. (Gabrilovich und Nagaraj 2009). Im Menschen, ebenso wie in der Maus, zeigen sie ein vermehrtes Ansiedeln in Knochenmark, Milz, peripherem Blut (Goedegebuure *et al.* 2011) und Lymphknoten (Gabrilovich und Nagaraj 2009).

MDSC supprimieren T-Zell-Antworten, beeinflussen die Differenzierung von Makrophagen in Richtung sogenannter M2-Makrophagen (Ostrand-Rosenberg 2010) und fördern zudem die Angiogenese und Metastasierung von Tumoren (Gabrilovich und Nagaraj 2009). *Gabitass et al.* zeigten zudem, dass ihr Vorkommen positiv mit dem Voranschreiten von Krebserkrankungen, darunter dem PDA, korreliert und mit einem erhöhtem Sterberisiko einhergeht (Gabitass *et al.* 2011).

MDSC zeigen anhand ihrer Phänotypen unterscheidbare Hauptzelltypen, granulozytäre und monozytäre MDSC. Granulozytäre MDSC (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}-Zellen in Mäusen) (Gabrilovich und Nagaraj 2009) sind im Vergleich zu monozytären MDSC in Tumoren deutlich erhöht (Youn *et al.* 2008). Monozytäre MDSC zeigen in Mäusen den Phänotyp CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{high}. MDSC des Menschen werden definiert als Lin⁻HLA-DR⁺CD33⁺ bzw. CD11b⁺CD14⁻CD33⁺. Zudem können sie als Teilpopulation der CD15⁺-Zellen im peripheren

Blut identifiziert werden (Gabrilovich und Nagaraj 2009).

Das vermehrte Vorkommen von MDSC im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen begründet sich durch den Einfluss der Tumorzellen, des Tumorstromas, aber auch durch aktivierte T-Zellen. So wird die Myelopoese gefördert, die Differenzierung inhibiert und die Aktivierung der unreifen Zellstadien durch Zytokine wie TGF- β , IL-13, IL-4 und IFN- γ ermöglicht (Gabrilovich und Nagaraj 2009).

Der Einfluss der MDSC auf die Tumorentwicklung und Immunsuppression ist vielseitig. Durch die Expression von a) Arginase-1 (Arg-1) und b) induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) wird L-Arginin der Umgebung entzogen und zu a) Ornithin und Harnstoff, bzw. zu b) Stickstoffmonoxid (NO) umgebaut (Bronte *et al.* 2003, Rodriguez und Ochoa 2008, Rodriguez *et al.* 2004). L-Arginin wird jedoch ebenfalls von T-Zellen für die Replikation und für die Bildung von TCR benötigt (Rodriguez *et al.* 2004). Zudem verändert auch NO die Struktur der TCR (Zea *et al.* 2005), sodass eine T-Zell-Aktivierung verhindert wird (Rodriguez und Ochoa 2008). Zusätzlich entlassen MDSC reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) (Kusmartsev und Gabrilovich 2003) sowie Peroxynitrite, die die Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC-Komplex stören (Raber *et al.* 2014) oder zur Apoptose von T-Zellen führen (Rodriguez und Ochoa 2006). Des Weiteren verringern MDSC Cystein in der Umgebung, welches für die Proliferation und Proteinsynthese von T-Zellen benötigt wird (Srivastava *et al.* 2010). Sie regulieren außerdem CD62L auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen herunter (Hanson *et al.* 2009).

Die Expression von IL-10 und TGF- β führt zur Inhibition von T-Zell-Funktionen, bzw. Aktivierung von T_{Reg} (Goedegebuure *et al.* 2011). MDSC exprimieren außerdem das immunsuppressorische Molekül B7-H1 (Liu *et al.* 2008), dessen Bedeutung in Kapitel 1.4.3.1 detaillierter erläutert wird sowie die proangiogenetisch wirkende Matrix-Metalloprotease-9 (MMP9), die die Angiogenese im Tumor und somit auch dessen Wachstum und Metastasierung fördert (Yang *et al.* 2004).

1.4.2.3.2 CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen / Makrophagen

Makrophagen reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten heran, die ins Gewebe abwandern. Sie kommen in großer Zahl im Verdauungstrakt, in der Lunge und in der Milz vor. Im Immunsystem erfüllen sie verschiedene Aufgaben. Sie phagozytieren Pathogene und lösen eine Entzündungsreaktion aus. Hierbei wird das Pathogen an der Oberfläche des Makrophagen gebunden, von der Plasmamembran umhüllt und ins Zellinnere geschleust (Phagosom). Dort verschmilzt es mit dem Lysosom des Makrophagen zu einem Phagolysosom, in dem das Pathogen abgetötet und aufgespaltet wird (Vollmar *et al.* 2012).

Zur Erkennung des Pathogens dienen hierbei verschiedene Oberflächenrezeptoren wie der Mannoserezeptor, der Scavenger-Rezeptor, Komplementrezeptoren und verschiedene Toll-like-Rezeptoren (Murphy und Weaver 2018). Da der Phagozytosevorgang an den verschiedenen Rezeptoren unterschiedlich abläuft, unterscheidet man die Fc-Rezeptor- (FcR), die Komplement-Rezeptor- und die Mannose-Rezeptor- (MR-) abhängige Phagozytose (Aderem und Underhill 1999). FcR- und MR-abhängige Phagozytosen gehen dabei mit der Produktion und Sekretion proinflammatorischer Moleküle, wie IL-1 β , IL-6, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-12 bzw. reaktiven Sauerstoffverbindungen und Arachidonsäure-Metaboliten einher (Aderem und Underhill 1999). Hierdurch werden neutrophile Granulozyten chemotaktisch aus dem Blut angelockt und das Bild einer akuten Entzündung hervorgerufen (Vollmar *et al.* 2012). Im aktivierten Zustand, durch die Aufnahme von fremden Molekülmustern, bilden sie kostimulatorische B7-Moleküle und vermehrt MHC-II-Moleküle aus, über die sie die Fremdpeptide auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese werden durch naive CD4⁺-T-Zellen gebunden, die daraufhin aktiviert und zu Effektorzellen werden. Diese exprimieren nun CD40-Liganden, die an CD40 des Makrophagen binden und setzen IFN- γ frei, das die Abtötungskaskade des Pathogens im Makrophagen verstärkt und eine Zerstörung ermöglicht (Murphy und Weaver 2018).

Die Differenzierung der Makrophagen von anderen Immunzellen wird anhand ihrer Oberflächenantigene vorgenommen. Für gewöhnlich werden in der Maus dafür CD11b, Gr-1 und F4/80 verwendet (Kwakkenbos *et al.* 2004). CD11b ist auf allen myeloiden Zellen sowie neutrophilen Granulozyten vorhanden. F4/80 kommt auf den meisten Gewebemakrophagen der Maus vor. Ly6G kommt vorrangig auf Granulozyten vor, Ly6C auf Monozyten (Murphy und Weaver 2018). Ly6G und Ly6C werden auch als Gr-1, das Detektionsantigen für myeloide Zellen, zusammengefasst (Fleming *et al.* 1993). Makrophagen zeigen in der Regel einen Gr-1⁻ Phänotypen (Mordue und Sibley 2003).

1.4.2.3.2.1 M1-Makrophagen

M1-Makrophagen, auch als „klassisch“ aktivierte Makrophagen bezeichnet, bilden sich nach Pathogenkontakt und unter dem Einfluss von IFN- γ , das von T_H1-Zellen gebildet wird.

Sie schütten nach Phagozytose eines Pathogens hohe Mengen an Entzündungsmediatoren, wie IL-12, IL-23, TNF- α und Chemokine wie *C-X-C motif chemokine ligand 9* (CXCL9) und CXCL10 aus. Zudem exprimieren sie iNOS und bilden reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Zwischenprodukte, wodurch sie mikrobizid und tumorizid wirken können. Außerdem haben sie eine höhere Expression an MHC-II- und kostimulierenden Molekülen, wodurch sie als

APC agieren können (Biswas und Mantovani 2010).

M1-Makrophagen unterstützen die Antitumorantwort durch Reduktion der negativen Einflüsse von M2-Makrophagen, MDSC und T_{reg} sowie durch Beteiligung am Prozess des Abtötens von Tumorzellen (Murray und Wynn 2011). Herrscht jedoch im Tumorgewebe bereits ein immunsuppressives Milieu, können sich keine M1-Makrophagen bilden. Ihre tumorizide Wirkung besteht daher in erster Linie im Anfangsstadium eines Tumorzustands (Mantovani und Sica 2010).

1.4.2.3.2 M2-Makrophagen

Die "alternative" Aktivierung dieser Makrophagen folgt auf die Ausschüttung von IL-4 und IL-13 durch T_H2-Zellen (Murphy 2011) sowie rückkoppelnd durch eigene Sekretion von IL-10 (Mantovani *et al.* 2002). Zudem können sich Makrophagen durch Chemokine wie der *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2) und CXCL4 zu einem M2-ähnlichen Phänotyp entwickeln (Biswas und Mantovani 2010). M2-Makrophagen lassen sich durch mehrere Eigenschaften charakterisieren, wie erhöhte Expression an Scavenger-, Mannose-, β -Glucan-, Galaktose-, IL-1-Rezeptoren, IL-10 und IL-1RA, geringe Expression an IL-12 und Produktion von Ornithin und Polyamin (Biswas und Mantovani 2010, Goerdts und Orfanos 1999). Sie bilden zudem CCL17, CCL22, CCL24 sowie IL-8, *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-A, VEGFC und den *epidermal growth factor* (EGF). Sie nehmen dadurch fördernden Einfluss auf die T_H2-Antwort, jedoch auch auf das Tumorzustand und unterstützen die Immunantwort auf parasitäre Erkrankungen sowie Entzündungen (Biswas und Mantovani 2010).

In tumorösen Geweben findet man generell eher M2-Makrophagen, die als tumor-assoziierte-Makrophagen (*tumor-associated macrophage*=TAM) bezeichnet werden (Mantovani *et al.* 2002, Solinas *et al.* 2009). Sie verhindern T-Zell-Antworten und fördern die Menge an T_{Reg} im Tumorgewebe, wodurch sie insgesamt betrachtet die Antitumorantwort unterdrücken (Clark *et al.* 2009). Durch Bildung proangiogenetischer Faktoren, wie VEGF und MMPs, fördern sie die Vaskularisation des Tumorgewebes sowie die Metastasierung durch Einlass der Tumorzellen in die Blutbahn (Clark *et al.* 2009, Wyckoff *et al.* 2004).

In der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*=FACS) können M2-Makrophagen aus der Gesamtheit aller vorhandenen Makrophagen mittels fluoreszenzgekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen CD163 (CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺CD163⁺-Zellen) (Goerdts und Orfanos 1999) oder CD206 (CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺CD206⁺-Zellen), auch als Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) bekannt, unterschieden werden (Mosser und Edwards 2008, Stein *et al.* 1992).

1.4.2.4 Zytokine

Zytokine sind von Zellen unter bestimmten Bedingungen produzierte und sezernierte Proteine, die über spezifische Rezeptoren Einfluss auf andere Zellen haben können. Eine einheitliche Nomenklatur gibt es bei den Zytokinen nicht. Sie werden in die Hämatopoetin- und die Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie unterteilt (Murphy und Weaver 2018). Als Chemokine werden chemotaktische Zytokine bezeichnet (Rubio und Sanz-Rodriguez 2007), die die Wanderung von Leukozyten zum Ort einer Infektion hin beeinflussen (Murphy und Weaver 2018).

Interferon- α (IFN- α): Dieses körpereigene Zytokin besitzt antivirale und antineoplastische Eigenschaften. Es wird von Fibroblasten, T-Zellen, Makrophagen, plasmazytoiden Monozyten, DC sowie NK-Zellen gebildet und ist direkt und indirekt an der angeborenen und erworbenen Immunantwort beteiligt (Brassard *et al.* 2002). Durch Einsatz von IFN- α als Immuntherapeutikum in der Tumorbehandlung (Schmidt *et al.* 2007, Wada *et al.* 2007) kann das Tumorwachstum reduziert (Vitale *et al.* 2007) und die Ansprechbarkeit auf Chemo- und Strahlentherapie verbessert werden (Ma *et al.* 2005). In einigen Tumoren ist zudem eine antiangiogenetische Wirkung nachgewiesen (Von Marschall *et al.* 2003, Wada *et al.* 2007). Zu seinen zahlreichen immunstimulierenden und -modulierenden Effekten zählen die Erhöhung der Aktivität von Makrophagen, DC und NK-Zellen sowie die Zahl vorhandener T-Zellen (Brassard *et al.* 2002, Pfeffer *et al.* 1998). Die verbesserte Immunogenität im Tumor beruht des Weiteren auf einer erhöhten Expression von MHC-I-Molekülen (Pfeffer *et al.* 1998).

Nachfolgend sind wichtige Aufgaben jener Zytokine beschrieben, die in den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit genauer betrachtet wurden (Tabellen 4 und 5).

Tabelle 4: Immunstimulierende Zytokine und ihre Aufgaben im Detail (modifiziert nach ^{1,2,3})

Zytokin	Bildungsort	Aufgaben
Interferon-γ (IFN-γ)	Makrophagen, aktivierte T _H 1-Zellen, CD8 ⁺ - T-, NK- Zellen, DC	Aktiviert Makrophagen, erhöht die Expression von MHC-Molekülen, fördert Differenzierung CD4 ⁺ -T-Zellen zu T _H 1-Zellen, hemmt T _H 2-Zellen
Interleukin-1β (IL-1β)	Makrophagen, Epithelzellen	Induziert Akute-Phase-Reaktion, Induziert Expression von Cyclooxygenase II, aktiviert Makrophagen, fördert Mobilisation von Neutrophilen
Interleukin-2 (IL-2)	T-Zellen	Fördert Proliferation von T-Zellen und Differenzierung zu T-Effektorzellen, Stimulation von NK- und B-Zellen
Interleukin-12 (IL-12)	Makrophagen und DC	Fördert Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T _H 1-Zellen, Freisetzung von IFN- γ , aktiviert NK-Zellen
Interleukin-17 (IL-17)	T _H 17-Zellen, CD8- T-Zellen, Makrophagen, NK- Zellen	Fördert Produktion und Sekretion anderer Zytokine durch Fibroblasten, Keratinozyten und Epithelzellen, steigert Neubildung von Neutrophilen im Knochenmark
Keratinocyte- derived chemokine (KC)	Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen	Mobilisiert Monozyten und Neutrophile
Tumornekrose- faktor-α (TNF-α)	DC, Makrophagen, T-Zellen und NK- Zellen, Mastzellen	mobilisiert DC und fördert ihre Reifung, induziert NO-Produktion auf Makrophagen, lockert Zellverbände des Endothels, erhöht Gefäßpermeabilität, führt zu Gefäßerweiterung

¹ (Murphy und Weaver 2018), ² (Ohmori und Hamilton 1994), ³ (Song *et al.* 1999)

Tabelle 5: Immunsuppressive Zytokine und ihre Aufgaben im Detail (modifiziert nach ^{1,2,3})

Zytokin	Bildungsort	Aufgaben
Interleukin-4 (IL-4)	Aktivierte T _H 2-Zellen, NK-T-Zellen, naive T-Zellen, stimulierte Mastzellen	Fördert Differenzierung zu T _H 2-Zellen, fördert Aktivierung, Proliferation und Isotypenwechsel zu IgE an B-Zellen, hemmt Makrophagenaktivierung
Interleukin-6 (IL-6)	T-Zellen, Makrophagen, DC, Endothelzellen	Induziert Akute-Phase-Reaktion, fördert Differenzierung naiver T-Zellen zu T _H 17-Zellen
Interleukin-10 (IL-10)	Monozyten, T-Zellen, adaptive regulatorische CD4 ⁺ -T-Zellen, DC	hemmt Produktion von IL-2, TNF- α und IL-5 durch T-Zellen, hemmt Antigenpräsentation, T _H 1-Zell-differenzierung und Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen, fördert Entwicklung von T _{Reg} , Wachstum von Mastzellen IgG-Produktion
Interleukin-13 (IL-13)	NK-Zellen, NK-T-Zellen und T _H 2-Zellen	Fördert Differenzierung zu T _H 2-Zellen, fördert IgE-Produktion, Schleimproduktion und Kontraktilität des Darms, Erneuerung des Darmepithels, hemmt T _H 1-Zellen, hemmt Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen
Transformierender Wachstumsfaktor (TGF-β)	Monozyten, DC, CD4 ⁺ -T-Zellen, adaptive regulatorische CD4 ⁺ -T-Zellen	hemmt Wachstum von B-Zellen, Aktivierung von Makrophagen, Entwicklung von T _H 17-, T _H 1- und T _H 2-Zellen, fördert Stimulation von T _H 17-Zellen, Bildung von FoxP3 ⁺ -T _{Reg}
Endothelwachstumsfaktor (VEGF)	Vaskuläres Gewebe	reguliert Angiogenese, Lymphangiogenese und Vaskularisation, senkt Blutdruck

¹ (Murphy und Weaver 2018), ² (Yla-Herttuala *et al.* 2007), ³(Miyara und Sakaguchi 2007)

1.4.3 Tumormunologie

Das Immunsystem schützt den Körper durch gezielte Erkennung und Vernichtung u.a. vor entarteten Zellen. Dies sind Zellen, bei denen es während der Proliferation zu fehlerhaften Ausprägungen oder Mutationen kommt, sodass sie dem Bauplan der körpereigenen Zelle nicht mehr entsprechen. Die Erkennung und Vernichtung der entarteten Zellen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: a) anhand tumorspezifischer Antigene durch zytotoxische T-Zellen, b) durch NK-Zellen und Makrophagen, die an die Oberfläche von Tumorzellen gebundene Antikörper über CD16-Rezeptoren erkennen, c) nach Aktivierung durch das Komplementsystem, d) durch Oberflächenrezeptoren der NK-Zellen bei verminderter Expression von MHC-I-Molekülen und/oder Expression von MICA, einer veränderten Form des MHC-I-Moleküls an der Oberfläche von Tumorzellen (Rink *et al.* 2015).

Jedoch besitzen Tumorzellen nicht nur einige Möglichkeiten, sich dem Immunsystem nach ihrer Entstehung zu entziehen, sie sind auch in der Lage ein tumorfreundliches Milieu zu schaffen, das dem Immunsystem eine Bekämpfung fast unmöglich macht (Bazhin *et al.* 2014, Rink *et al.* 2015). Während des Selektionsdrucks durch das Immunsystems können solche Tumorzellen entkommen, bei denen es z.B. zur verminderten oder veränderten Expression bestimmter Oberflächenmoleküle kam. Zudem sind verschiedene Tumorzelltypen in der Lage Zytokine, wie TGF- β und IL-10 oder Enzyme, wie Indolamin-2,3-Dioxygenase zu sezernieren, die auf unterschiedlichem Wege eine Toleranz der T-Zellen induzieren können (Rink *et al.* 2015). Außerdem können Immunzellen rekrutiert werden, die das immunsuppressive Milieu des Tumors erweitern und aufrechterhalten, wie es beim PDA beobachtet wird. Durch eine erhöhte Menge an T_{Reg}, MDSC und eine vermehrte Expression an regulatorischen, immunsuppressiven Molekülen (u.a. B7-H1 und CTLA-4) auf Immun- und Tumorzellen gelingt es der Tumorerkrankung sogar sich selbst durch das Immunsystem zu schützen (Bazhin *et al.* 2014).

1.4.3.1 Regulatorische Moleküle: B7-H1 und B7-DC

Das B7-H1- (CD274, PD-L1) und das B7-DC-Molekül (CD273 (Medin und Fowler 2011), PD-L2) sind Mitglieder der B7-Superfamilie und an der Regulation der T-Zell-Antwort beteiligt. Sie binden beide an den *programmed-death-1*-Rezeptor (PD-1) und können, abhängig von noch nicht genau bekannten Faktoren, T-Zell-Antworten aktivieren oder supprimieren (Greenwald *et al.* 2005, Karakhanova *et al.* 2010, Subudhi *et al.* 2005).

Der Rezeptor PD-1 ist homolog zu CD28 und den Immunglobulinen zugehörig. Zudem wird eine inhibitorische Funktion dieses Rezeptors vermutet. Seine Struktur ermöglicht jedoch

verschiedene Signalwege, da seine Untereinheiten eine Inhibition, aber auch Aktivierung bei geeigneten Liganden ermöglichen (Subudhi *et al.* 2005).

Das B7-H1-Molekül wird auf Makrophagen, aktivierten DC, aktivierten T-Zellen, B-Zellen sowie auf Endothel- und Epithelzellen exprimiert (Greenwald *et al.* 2005). Vermehrte Expression wird auch in chronischen Entzündungen sowie Autoimmunerkrankungen gefunden. Hier spielt B7-H1 ebenfalls vorrangig eine immunsuppressive Rolle (Dong und Chen 2006, Oikawa *et al.* 2007, Schreiner *et al.* 2004, Wiendl *et al.* 2003). Zudem wird es vermehrt auf verschiedenen Arten von Tumorzellen exprimiert. Hier beeinflusst es die Antitumorantwort negativ durch Suppression der T-Zell-Antwort (Blank *et al.* 2004, Dong *et al.* 2002). Das Vorhandensein von B7-H1 in Tumoren korreliert oft mit einer schlechteren Prognose (Loos *et al.* 2008). Speziell im PDA wird B7-H1 in hohen Mengen von den Tumorzellen und tumor-infiltrierenden Leukozyten exprimiert (Bazhin *et al.* 2013). Blockiert man B7-H1 durch spezifische Antikörper in tumortragenden Mäusen, so ist ein deutlicher Überlebensvorteil dieser Mäuse zu verzeichnen. Sie zeigen zudem höhere Anteile an CD8⁺-Effektor-T-Zellen sowie einen deutlich geringeren Anteil an T_{Reg} (Bazhin *et al.* 2013). Die Expression von IL-10 auf T-Zellen wird durch B7-H1 stimuliert (Subudhi *et al.* 2005). Wiederum wird B7-H1 selbst vermehrt unter dem Einfluss von IFN- γ exprimiert (Loos *et al.* 2008).

Das B7-DC-Molekül ist ebenfalls Ligand des PD-1. Es ist insgesamt weniger intensiv untersucht als B7-H1 (Subudhi *et al.* 2005). Bekannt ist jedoch eine zwei- bis sechsfach höhere Affinität zu PD-1. Dafür wird es wiederum in deutlich geringeren Mengen exprimiert. Die Expression von B7-DC erfolgt auf Makrophagen und DC. Induziert wird sie durch Zytokine, vorrangig durch IL-4 (Greenwald *et al.* 2005).

Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass B7-H1 und B7-DC, unabhängig von der Bindung an PD-1, weitere Signalwege induzieren. Sie müssen daher Ligand für je mindestens einen weiteren Rezeptor sein (Lewkowich *et al.* 2013, Liu *et al.* 2003, Subudhi *et al.* 2005). Andere Gedankenansätze betreffen die Affinität von B7-H1 und B7-DC zu PD-1 und zu ihrem weiteren Rezeptor sowie die dadurch bedingten immunsuppressiven oder stimulierenden Effekte (Subudhi *et al.* 2005).

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Da Immuntherapien beim PDA zwar als Begleittherapie bereits in klinischen Studien eingesetzt wurden, jedoch bislang wenig Effektivität in Bezug auf das immunsuppressive Milieu im PDA zeigten (Laheru und Jaffee 2005, Schmidt *et al.* 2007), war es das

übergeordnete Ziel dieser Arbeit, die Mechanismen der Immuntoleranz des PDA weiter zu untersuchen, wobei das Molekül B7-H1 sowie das Verhalten von Makrophagen und MDSC genauer betrachtet wurden.

Durch Verwendung von B7-H1-Antikörpern sollte gezeigt werden, dass eine Blockierung dieses regulatorischen Moleküls die Überlebenszeit der behandelten Mäuse verlängern kann (Bazhin *et al.* 2013) und zugleich geprüft werden, ob die Blockierung von B7-H1 auf ein weniger immunsuppressives Milieu im Tumor schließen lässt. Diese Untersuchungen wurden durch In-vivo-Untersuchungen der Immunzellexpressionen und Zytokinkonzentrationen in tumortragenden Mäusen ergänzt. Unter Berücksichtigung des beim PDA eingesetzten Chemotherapeutikums 5FU und der Immuntherapie mittels IFN- α , wie sie in der CapRI-Studie der *Universität Heidelberg* verwendet wurden (Knaebel *et al.* 2005), sollte auch der Einfluss der Therapien auf die Immunlage im Tumor berücksichtigt werden. Zugleich sollte betrachtet werden, ob es Wechselwirkungen zwischen den Therapien und dem Einfluss von B7-H1 gibt.

Zusätzlich wurde die Expression von B7-H1 vergleichend zu B7-DC betrachtet, wobei die Hypothese zu klären war, ob die Abwesenheit von B7-H1 den ebenfalls PD-1-Liganden B7-DC in seiner Expression begünstigt. Bei erhöhter Expression von B7-DC, welches unter Anwesenheit von B7-H1 nur in geringen Mengen exprimiert wird (Greenwald *et al.* 2005), sollte dann Rückschluss auf die Immunzellexpressionen und Zytokinkonzentrationen genommen werden, um seine immunsuppressive Rolle im PDA zu klären.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von Makrophagen hinsichtlich ihres Vorkommens, ihrer phagozytotischen Aktivität und ihrer Beeinflussung des Tumormilieus im PDA zu analysieren. Außerdem sollte das Vorkommen von Makrophagen-Subpopulationen analysiert werden, da diesen Zellen unterschiedlichste Funktionen im Tumor bereits zugeordnet wurden (Mantovani und Sica 2010, Solinas *et al.* 2009). Aufgrund der gemeinsamen Abstammung aus einer myeloiden Vorläuferzelle und dem vermehrten Auftreten von MDSC im PDA (Bazhin *et al.* 2013), wurden diese Untersuchungen vergleichend in Bezug auf MDSC durchgeführt. Als B7-H1-exprimierende Zellen und dessen große Bedeutung in der Regulation der Antitumorantwort wurde ebenfalls die Expression von B7-DC und B7-H1 auf Makrophagen und MDSC erfasst.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiere

Als Versuchstiere wurden C57-Bl/6- (WT) und B7-H1-Knockout-Mäuse (KO) verwendet, die männlich und mindestens acht Wochen alt waren. Die Labors aus denen sie bezogen wurden sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Mäuse wurden unter specific pathogen free- (SPF-) Bedingungen durch die *Universität Heidelberg* gehalten (IBF, Heidelberg). Es standen ihnen täglich frisches Trinkwasser sowie sterilisiertes Futter ad libitum zur Verfügung. Zudem waren Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit konstant und der Tagesrhythmus wurde durch ein 12 Stunden-hell/dunkel-Lichtprogramm reguliert.

Die KO-Mäuse wurden durch die IBF gezüchtet. Es handelte sich um transgene Tiere, die kein B7-H1-Molekül bilden konnten. Nach *Dong et al.* wurde das B7-H1-Knockout-Allel mittels verschiedener molekulargenetischer Methoden analysiert und isoliert, in murine Stammzellen eingesetzt, welche dann in C57-Bl/6-Mäuse verbracht wurden. Aus der Verpaarung mit C57-Bl/6-Mäusen entstand eine heterozygote F1-Generation, die miteinander verpaart wurde, um für das mutante B7-H1-Allel homozygote Mäuse zu erhalten. Ermittelt wurde die Homozygotie durch Polymerase-Kettenreaktionen (*polymerase chain reaction*=PCR). Mäuse der mindestens siebten Generation aus Rückkreuzungen mit C57-Bl/6-Mäusen wurden experimentell verwendet (*Dong et al.* 2004).

Tabelle 6: Mäuse

Mauslinie	Zuchtlabor
C57-BL/6	Charles River, Sulzfeld, DE
C57-BL/6	Janvier Labs, Saint-Berthevin Cedex, FR
B7-H1-Knockout	Prof. Dr. Percy, Dr. Linda Diehl, Bonn, DE; eigene Nachzucht: IBF Heidelberg, DE

2.2 Material

2.2.1 Murine Pankreaskarzinomzellen

Entwickelt wurde die Panc02-Zelllinie 1978 von Corbett und Kollegen. Nach Benetzung einer Baumwollfaser mit 3-Methylcholanthren, einem Karzinogen, wurde diese u.a. männlichen C57-Bl/6-Mäusen operativ in das Pankreas eingenäht und sich entwickelnde Tumoren des Pankreas untersucht. Eine der sich entwickelnden Zelllinien, die histologisch einem Adenokarzinom entsprach, war die Panc02-Zelllinie. Durch wiederholte Transplantation der Tumorzellen in C57-Bl/6-Mäuse wurde die Zelllinie für die experimentelle Nutzung optimiert (Corbett *et al.* 1984).

Partecke und Kollegen verglichen die Eigenschaften der Panc02-Zelllinie mit der 6606PDA-Zelllinie im Mausmodell. Panc02 zeigte ein deutlich schnelleres Wachstum mit einer mittleren Überlebenszeit von 28 Tagen post operationem (p.op.) und eine lokale Invasivität mit fingerähnlicher Ausbreitung (Partecke *et al.* 2011).

2.2.2 Pharmaka

Nachfolgend sind in der Tabelle 7 die zur Durchführung der Tierversuche verwendeten Pharmaka aufgeführt. Hierunter fallen die zur orthotopen Implantation der Panc02-Zellen verwendeten Anästhetika und Analgetika sowie die in den In-vitro- und In-vivo-Versuchen verwendeten Zytostatika und Interferon- α .

Tabelle 7: Pharmaka

Präparat	Hersteller
Anästhetika	
IsoFlo [®] (Isofluran, 100%)	ecuphar [®] GmbH, DE
Rompun [®] 2% ad us.vet. (Xylazin, 20mg/ml), Injektionslösung	Bayer AG, DE
Ketanest [®] S ad us.vet. (Esketamin, 25mg/ml), Injektionslösung	Pfizer GmbH, DE
Nichtsteroidale Antiphlogistika	
Rimadyl [®] ad us. vet., Injektionslösung (Carprofen, 50mg/ml)	Pfizer GmbH, DE

Pharmaka zur in vivo/ in vitro Behandlung

Mouse Interferon alpha 2A (1x10 ⁵ units)	R&D Systems, DE
5-FU-cell® (Fluorouracil, 50mg/ml) Injektionslösung	cell pharm, DE

2.2.3 Antikörper und Beads für die Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wurden unterschiedliche Beads zur Laserjustierung des FACS (*fluorescence-activated cell sorting*), zur Kompensation sowie zur Analyse der Phagozytoseaktivität von Makrophagen und MDSC verwendet. Zur Zellanalyse dienten spezifische Antikörper. Beads und Antikörper sind der nachfolgenden Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Beads für die FACS-Laserjustierung und die Kompensation von FACS-Proben

Bezeichnung	Untersuchungs-System	Hersteller
BD™ Cytometer Setup and Tracking Beads	FACS	BD Biosciences, DE
BD™ CompBeads Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ / Negative Control; Compensation Particles Set	FACS	BD Biosciences, DE
BD™ CompBeads Anti-Rat Ig κ / Negative Control; Compensation Particles Set	FACS	BD Biosciences, DE

Phagozytose-Beads

Bezeichnung	Konjugat	Durchmesser	Menge pro 2x10 ⁵ Zellen in	Hersteller
-------------	----------	-------------	--	------------

µl				
FluoSpheres®Car- boxylate	Yellow-green (505/515)	1.0 µm	5	life technologies, DE

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Menge in µl pro 2x10 ⁶ Zellen/50µl	Hersteller
CD3e	APC-Cy7	145-2C11	Armenian Hamster IgG1, κ	1,5	BD (Becton Dickinson GmbH) Pharmingen™, DE
CD4	V450	RM4-5	Rat (DA) IgG2a, κ	1	BD Horizon™, DE
CD8a	PerCP-Cy5.5	07.06.53	Rat (LOU) IgG2a, κ	1	BD Pharmingen™, DE
CD11b	PerCp-Cy5.5	M1/70	Rat (DA) IgG2b, κ	1,5	BD Pharmingen™, DE
CD16/32	Purified	93	Rat IgG2a, λ	1	eBioscience, DE
CD19	PerCp-Cy5.5	ID3	Rat IgG2a, κ	2	BD Pharmingen™, DE
CD25	APC	3C7	Rat (LEW) IgG2b, κ	6	BD Pharmingen™, DE
CD44	FITC	IM7	Rat IgG2b, κ	0,5	BD Pharmingen™, DE
CD45	V500	30-F11	Rat (LOU) IgG2b, κ	2	BD Horizon™, DE
CD62L	APC	MEL-14	Rat (F344) IgG2a, κ	1	BD Pharmingen™, DE

CD69	PE	H1.2F3	Armenian Hamster IgG1, λ3	3	BD Pharmingen™, DE
CD 273 (B7-DC)	PE	122	Rat IgG2a, κ	3	eBioscience, DE
CD 274 (B7-H1)	PE	MIH5	Rat IgG2a, λ	3	eBioscience, DE
F4/80	APC	BM8	Rat IgG2a, κ	1	eBioscience, DE
F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a, κ	1	eBioscience, DE
FoxP3	PerCp-Cy5.5	FJK-16s	Rat IgG2a, kappa	1	eBioscience, DE
Gr-1	APC-Cy7	RB6-8C5	Rat IgG2b, κ	0,25	BD Pharmingen™, DE
MMR/ CD206	APC		goat IgG	1	R&D Systems, DE
Ly-6C	Pacific Blue	AL-21	Rat IgM, κ	0,1	BD Horizon™, DE

2.2.4 Weitere Antikörper

2.2.4.1 Antikörper und Zellmarker zur Induktion und Analyse von Zellproliferation

Zur Aktivierung der Zellen in vitro wurden die Antikörper CD3 und CD28 verwendet, welche der Tabelle 9 zu entnehmen sind. Zur Analyse der Zellproliferation im FACS wurde der intrazelluläre Farbstoff CFSE (*5-(and6)-Carboxyl-fluorescein diacetate succinimidyl ester*) der Firma eBioscience aus Deutschland verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Aktivierungs-Antikörper sowie CFSE

Spezifität	Konjugat	Clon	Isotyp	Menge/ ml Medium	Hersteller
CD3	Functional Grade Purified	17A2	Rat IgG2b, κ	5µl	eBioscience, DE

CD28	Functional Grade Purified	37.51	Golden Syrian Hamster IgG	10µl	eBioscience, DE
Bezeichnung				Hersteller	
CFSE (5-(and6)-Carboxyl-fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA SE)				eBioscience, DE	

2.2.4.2 B7-H1-Antikörper zur in vivo Behandlung

Es wurde der B7-H1-Antikörper, auch als CD274 bezeichnet wird, der Firma eBioscience aus Deutschland verwendet. Dieser Antikörper besitzt folgende Eigenschaften: Clon MIH5, Isotyp Rat IgG2a und λ , functional grade purified.

2.2.5 Isolation von Zellsubpopulationen

Zur Isolation von Makrophagen und MDSC aus murinen Zellproben wurde das MACS (*magnetic activated cell sorting*) verwendet. Durchgeführt wurde dies entsprechend der Protokolle des Herstellers Miltenyi Biotec GmbH aus Deutschland für folgende KITS: CD11b MicroBeads mouse/human, Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation mouse).

2.2.6 Zytokinanalyse

Die Zytokinbestimmung fand mittels Luminex Technologie entsprechend Herstellerangaben statt. Hierzu wurden zwei verschiedene magnetische Platten des Milliplex® MAP Kit (Mouse Cytokine/Chemokine, Magnetic Bead Panel) der Firma EMD Millipore Corporation Merck KGaA aus Deutschland verwendet: 12-Plex-Platte (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, VEGF, KC, TNF α , IL-13, IL-12 (p70), IL-4), TGF β 1-Platte.

2.2.7 Chemikalien und Lösungen

Die zur Bearbeitung und Kultivierung von Zellsuspensionen sowie zur Färbung von lichtmikroskopisch ausgewerteten Zellproben verwendeten Chemikalien und Lösungen sind den Tabellen 10 bis 12 zu entnehmen.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, DE
Collagenase III C3-28	Biochrom AG, DE
Collagenase IV C4-28	Biochrom AG, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,5%	Grüssing GmbH, DE
DNase I	Roche GmbH, DE
Dulbecco´s phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich®, DE
Ethylenediamine tetraacetic acid- Disodium-salt solution; 0.5M; pH 8.0 (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH, DE
Fetal bovine serum (FCS)	Biochrom AG, DE
Hank´s BSS (HBSS)	PAA Laboratories GmbH, DE
Hyaluronidase	Linaris GmbH, DE
Insuman® Rapid; humanes Insulin; 40 I.E./ml	Sanofi-Aventis GmbH, DE
Red Blood Cell Lysis Solution	Miltenyi Biotec GmbH, DE
RPMI 1640; with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, DE
Trypanblaulösung 0.5%	Biochrom AG, DE
Trypsin-EDTA-Solution	Sigma-Aldrich®, DE

Tabelle 11: Inkubationslösung für Tumorzellen zur nachfolgenden MACS-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung
Inkubationslösung	25mg DNase I 120mg Collagenase III C3-28 280mg Collagenase IV C4-28 100mg Hyaluronidase 40 U-H- Insulin 500ml HBSS

Tabelle 12: Verwendete Puffer- und Waschlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer für Zellsuspensionen	
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	50ml Dulbecco´s phosphate buffered saline 450ml Aqua destillata
Erythrolyse-Puffer	0,1ml Red Blood Cell Lysis Solution 0,9ml Aqua destillata
Puffer für FACS	
Stain-Buffer	500ml PBS 1ml EDTA (0.5M)
Fix-Perm-Buffer für intrazelluläre Färbung	1:4 Verdünnung: Fixation/Permeabilization Concentrate (eBioscience, DE) Fixation/Permeabilization Diluent (eBioscience, DE)
Perm-Buffer für intrazelluläre Färbung	1:10 Verdünnung: Permeabilization Buffer (eBioscience, DE) Aqua dest.
MACS-Puffer	500ml PBS 2ml EDTA (0.5M) 2,52g BSA

2.2.8 Zellkulturmedien

Den Ansprüchen der Zellsuspensionen aus Milzen und Tumoren sowie isolierten CD11b⁺-Zellen entsprechend wurden die in Tabelle 13 aufgeführten Kulturmedien verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium für CD11b ⁺ - und Gr-1/CD11b ⁺ -Zellen (30% FCS)	350ml RPMI 1640 150ml FCS

Standard-Kulturmedium (10% FCS)	450ml RPMI 1640 50ml FCS
---------------------------------	-----------------------------

2.2.9 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Durchgeführt wurden die Versuche mit den in Tabelle 14 und 15 gelisteten Verbrauchsmaterialien und Geräten. Den Anforderungen an die Versuche entsprechend wurden im Umgang mit Zellproben sterile Einmalartikel verwendet und beim Verbringen von Zellen in Kultur steril unter der Sterilbank gearbeitet.

Tabelle 14: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth GmbH, DE
Combitips Plus (0.1ml, 0.5ml, 2.5ml, 5ml)	Eppendorf AG, DE
Costar® Stripette (5ml, 10ml, 25ml)	Corning Inc., DE
Nalgene® Cryogenic Vials	Sigma-Aldrich®, DE
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, DE
Kapillarpipetten minicaps, 20µl	Hirschmann®Laborgeräte GmbH & Co. KG, DE
LS Columns MACS	Miltenyi Biotec GmbH, DE
Millex Sterilfilter 33mm Durchmesser	Millipore; Merck KGaA, DE
PCR-Tubes mit Deckel, 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, DE
Polysorb™ USP 5-0	Covidien AG, DE
Probenröhrchen für FACS 5ml	BD Biosciences, DE
Reagenzröhrchen Falcon (50ml, 15ml)	BD Biosciences, DE
Reagenzflaschen Falcon (250ml)	BD Biosciences, DE
Spritzen 50ml	B. Braun Melsungen AG, DE
Spritzen 5ml	BD Biosciences, DE
Transferpipetten 3ml	BD Biosciences, DE
Wundklammergerät Reflex 7mm	Roboz Surgical Instrument Co., USA

Tiere, Material und Methoden

Wundklammern Reflex 7mm	Roboz Surgical Instrument Co., USA
Mikrotiterplatten (6 Einheiten, 96 Einheiten), Kulturplatten	BD Biosciences, DE
Zellschaber 25cm	Sarstedt AG & Co., DE
Zellsiebe (100µm, 40µm)	BD Biosciences, DE

Tabelle 15: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bio Vortex V1	Lab-4 you GmbH, DE
Bio-Plex 200 System, Bioplex HTF	Luminex MAP Technology, NL
Digital Timer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, DE
FACSCanto II™	BD Biosciences, DE
Gefrierschrank -20°C	Liebherr-International GmbH, DE
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, DE
Halterung MidiMACS	Miltenyi Biotec GmbH, DE
Halterung QuadroMACS	Miltenyi Biotec GmbH, DE
Inkubator HeraCell	Heraeus Holding GmbH, DE
Kühlschrank 4°C	Liebherr-International GmbH, DE
Lichtmikroskop AxioStarplus	Carl Zeiss AG, DE
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, DE
Multipette® plus	Eppendorf AG, DE
MultiStand, MACS	Miltenyi Biotec GmbH, DE
Pipet lite	Rainin; Mettler-Toledo GmbH, DE
Pipette Research	Eppendorf AG, DE
Pipetten Pipetman	Gilson, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann®Laborgeräte GmbH & Co. KG, DE
Shaker Bath SBS30	Bibby Scientific Stuart, UK

Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, DE
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Waage EW600-2M	Kern & Sohn GmbH, DE
Zählkammer Neubauer Improved	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, DE
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, DE
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, DE
Bio-Plex 200 System, Bioplex HTF	Luminex MAP Technology, NL

2.2.10 Software

Neben der Analyse von Zellproben im FACS sowie der Luminexanalyse, wurden zur Erstellung der vorliegenden Arbeit folgende, der Tabelle 16 zu entnehmenden, Softwareprogramme verwendet:

Tabelle 16: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Bio-Plex 4.0	Luminex MAP Technology, NL
EndNote (Version X7.0.2)	Thomson Reuters, USA
FlowJo (Version 7.6.1)	Tree Star Inc., USA
FACS Diva Software	BD Biosciences, DE
GraphPad Prism Version 5.01	GraphPad Software Inc., USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung und Gewinnung von Panc02-Zellen

Tiefgefrorene murine Panc02-Zellen (ca. 2×10^6 Panc02-Zellen in 1ml PBS) wurden durch unseren Mitarbeiter Markus Herbst bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit Standard-Kulturmedium gewaschen (Zentrifugation: 5min, 400g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, 15ml Standard-Kulturmedium zum Zellpellet hinzugegeben und die Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt. Diese verblieb zur weiteren Verwendung im Inkubator bei 37°C.

Zellen, die zwei Tage lang inkubiert wurden, konnten gewonnen und den Versuchstieren injiziert werden. Hierzu wurde der Medienüberstand abgenommen und 2ml Trypsin (37°C) zum Zellpellet hinzugegeben. Nach Inkubation im Inkubator (4min, 37°C) wurden die Zellen durch kräftiges Schlagen oder mittels Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst. Es wurden 10ml PBS (37°C) zur Zellsuspension hinzugegeben und diese in ein 15ml Probenröhrchen überführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (7min, 400g, 23°C), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS (37°C) resuspendiert. Es wurden 20µl der Zellsuspension mit 180µl Trypanblau in einem Eppendorfgesäß vermischt. Anhand dieser Probe konnten devitale Zellen unterschieden und die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt werden. Der ungefärbte Anteil der Zellsuspension wurde abzentrifugiert (7min, 400g, 23°C) und das Zellpellet in PBS (37°C) aufgenommen, sodass eine Konzentration von 2×10^7 vitaler Zellen/ml vorlag. Die Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß überführt, gekühlt und binnen zwei Stunden verwendet.

2.3.2 Die orthotope Implantation von Pankreaskarzinomzellen

Die Tierversuchsarbeit wurde vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (Tierversuchsgenehmigungen: A 37/13, G 121/11, G 184/11, T 78/13).

Die Tiere wurden mittels Isofluran/Sauerstoff-Inhalation narkotisiert. Zur Narkoseeinleitung wurden 5% Isofluran/O₂ verwendet. War die gewünschte Narkosetiefe erreicht (Stadium III₂), bei der Reflexe sowie Tiefenschmerz ausgefallen waren, wurde diese mit 2-3% Isofluran/O₂ erhalten und den Tieren zur Analgesie 50µl einer Rimadyl®-Verdünnung (Carprofen 5mg/kg) subkutan injiziert.

Die Kornea wurde mittels Augensalbe geschützt, der Bauch im Operationsbereich geschoren und desinfiziert. Es folgte ein Hautschnitt von 0,5 – 1 cm Länge median kaudal des Sternums. Danach wurde die Linea alba aufgesucht, diese mit einem Schnitt durchtrennt und die Bauchhöhle eröffnet. Zum Auffinden des Pankreas wurde die Leber vorsichtig mittels

Knüpfpinzette verlagert. Darunter waren Duodenum, Pankreas, Colon transversum und weiterer Dünndarm sichtbar. Das Duodenum wurde mittels Knüpfpinzette erfasst und in die Bauchhöhlenöffnung vorgelagert und fixiert. Es wurden 5µl der Panc02-Zellsuspension aus Kapitel 2.2.1 (1×10^5 Panc02-Zellen) mittels Hamilton-Spritze in das Pankreas injiziert.

Die Organe wurden zurückverlagert und die Wunde verschlossen. Hierzu wurde die Muskulatur fortlaufend und die Haut mit Einzelheften mit einem resorbierbaren 5-0 Polysorb-Faden genäht. Zuletzt wurde die Hautwunde mit 7mm Wundklammern verschlossen, um die Naht vor eigenständigem Öffnen durch die Mäuse zusätzlich zu schützen.

Die operierten Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen beobachtet. Die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde während der Operation sowie bis zum vollständigen Erwachen mittels Wärmeplatte (38°C) unterstützt. Die darauffolgenden drei Tage erfolgte eine besonders gründliche Wundkontrolle, um Nahtdehiszenzen und Komplikationen frühzeitig zu erkennen. Die Wundklammern wurden 7 Tage p.op. entfernt.

2.3.3 Abbruchkriterien für den Tierversuch

Gab es Anzeichen von Schmerzen, wie das Belecken von bestimmten Stellen, einen gekrümmten Rücken oder einen hochgezogenen Bauch, so war die Gabe von Analgetika angezeigt. Bei nicht mehr vertretbaren Schmerzen und Leiden wurden die entsprechenden Tiere vorzeitig getötet. Hierzu zählten eine Abnahme des Körpergewichts von mehr als 20%, eine sichtbare Aszites, ein Tumordurchmesser von mehr als 2cm (sofern palpatorisch beurteilbar), Unterkühlung, Lähmungen, Krämpfe, schwere Automutilation, Hyperventilation, Atmungsgeräusche und Verweigerung der Nahrungsaufnahme. Der Gesundheitszustand und das Wohlbefinden der Versuchstiere wurden täglich überprüft.

2.3.4 Therapie in vivo mit 5FU und IFN

Es wurden je Versuchsdurchlauf 10-13 operierte WT- oder KO-Mäuse mit 5FU und/oder IFN- α therapiert. Dabei wurden drei Therapiegruppen sowie eine Kontrollgruppe unterschieden (siehe Tabelle 17). Das Schwanken der Tierzahlen begründete sich durch die Tatsache, dass nicht jede Maus einen Primärtumor ausbildete. Die Zellzahl der Tumoren bestimmte zudem die Anzahl daraus messbarer Proben. Außerdem war die KO-Maus in der Zahl zu verpaarenden Individuen stark eingeschränkt (eigene Nachzucht im IBF Heidelberg) und daher nicht zu jedem Zeitpunkt in ausreichender Menge verfügbar.

Die Injektionen erfolgten i.p. an Tag 5, 7 und 9 post operationem. Für die intraperitoneale Injektion wurde die Maus mit einer Hand fixiert und mit dem Kopf leicht nach unten gerichtet

gehalten. Die Injektion erfolgte im kaudalen rechten Quadranten des Abdomens.

Die Bezeichnung der Therapiegruppen *in vitro* und *in vivo* werden weiterhin in dieser Arbeit wie folgt abgekürzt: Kontrollgruppe=CON, Monotherapie mit 5FU=5FU, Kombinationstherapie mit 5FU und IFN- α =5FU-IFN, Monotherapie mit IFN- α =IFN (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Therapie *in vivo* mit 5FU und IFN- α

WT	KO	Therapie pro Maus und Tag
Kontrolle	Kontrolle	Keine
5FU	5FU	0,71mg 5FU
5FU-IFN	5FU-IFN	0,71mg 5FU 1x10 ⁴ units IFN
IFN	IFN	1x10 ⁴ units IFN

Die jeweiligen Therapeutikadosen wurden als 50 μ l große Injektionsdosen *i.p.* verabreicht.

2.3.5 Kardiale Blutentnahme

Die kardiale Blutentnahme eignet sich zur Gewinnung großer Mengen Blut. Die Maus wurde hierzu mittels Injektionsnarkose (ca. 0,5mg Xylazin, ca. 6mg Ketamin) *i.p.* narkotisiert. Die Anästhetika sind der Tabelle 7 aus Kapitel 2.2.2 zu entnehmen. Eine ausreichende Narkosetiefe war mit Ausfall der Reflexe, insbesondere der Zwischenzehenreflexes, gegeben.

Das narkotisierte Tier wurde auf dem Rücken liegend gelagert, der Brustkorb mit zwei Fingern fixiert und mit einer 1ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle kaudal des Sternums nach kranial ins Herz eingestochen. Es konnten circa 0,5 – 0,9ml Blut bei langsamer Aspiration gewonnen werden, die in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Diesem invasiven Eingriff folgte unverzüglich die Euthanasie mittels zervikaler Dislokation.

2.3.6 Retrobulbäre Blutentnahme

Die retrobulbäre Blutentnahme ermöglichte die wiederholte Gewinnung kleiner Blutmengen während einer Versuchsreihe. Die Maus wurde hierzu mittels Isofluran narkotisiert. Sobald die Reflexe einschließlich der Schmerzreflexe ausgefallen waren, wurde die Maus auf dem Bauch gelagert und im Nacken mit einer Hand fixiert. Die andere Hand führte in drehender

Vorwärtsbewegung eine Glaskapillare (Kapillarpipetten minicaps, 20UL) in den nasalen Winkel der Augenhöhle ein. Das in die Kapillare aufsteigende Blut wurde in einem 0,2ml PCR-Tube mit Deckel aufgefangen. Danach wurde die Blutung durch Druck mittels Tupfer auf das geschlossene Auge gestillt.

2.3.7 Therapie in vivo mit B7-H1-Antikörpern

Es wurden operierte WT-Mäuse (Kapitel 2.3.2) mit dem Antikörper B7-H1 (CD274) aus Kapitel 2.2.4.2 therapiert. Dabei wurden eine Therapiegruppe und eine unbehandelte Kontrollgruppe von je 20 Tieren unterschieden. Die Injektionsdosen betragen 150µl (0,15mg) und wurden an Tag 5, 8, 12, 15 und 19 post operationem i.p. injiziert. An Tag 28 p.op. wurde durch retrobulbäre Blutentnahme (Kapitel 2.3.6) Serum für Zytokinmessungen gewonnen. Die Überlebenszeit wurde täglich nach Beginn des Versuchs erfasst.

2.3.8 Entnahme von Tumoren und Milzen

Die Entnahme von Primärtumor und Milz erfolgte 28 Tage post operationem. Der Eingriff fand am toten Tier statt. Die Euthanasie erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Das Tier wurde auf dem Rücken liegend gelagert und Haut und Bauchhöhle median eröffnet (Abbildung 2). Der Primärtumor wurde identifiziert und vorsichtig entnommen. Danach wurde das Darmkonvolut nach rechts aus der Bauchhöhle verlagert und die Milz entnommen. Für bestimmte Versuchsreihen wurde die Tumorgöße mittels Messschieber erfasst und das Tumolvolumen errechnet (Formel: $(\text{Länge} \times \text{Höhe} \times \text{Breite}) : 6$ in cm) (Marten *et al.* 2008). Außerdem wurden Metastasen der Bauchwand und –organe erfasst.

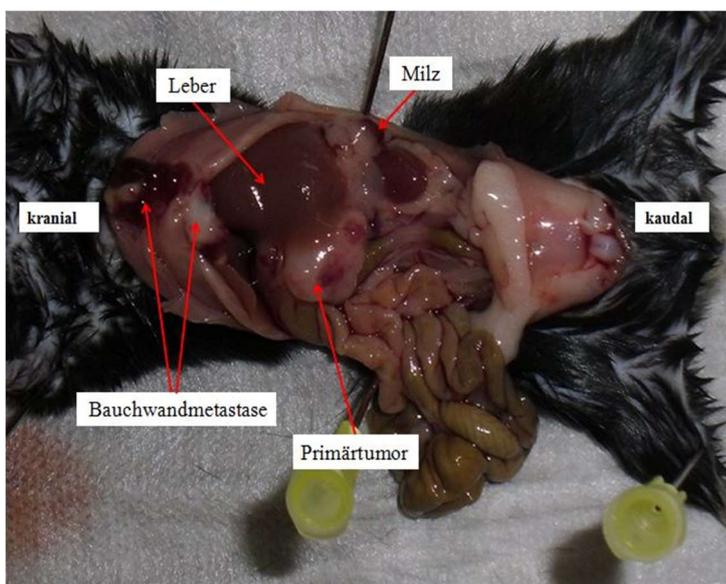


Abbildung 2: Mäusesitus. Für die Versuchsreihen wurden Milz und/oder Primärtumor verwendet.

2.3.9 Gewinnung von Blutseren und Medienüberständen

Serumproben wurden gewonnen, indem den Versuchstieren unter Narkose ca. 1ml Herzblut entnommen wurde. Durch zwei Zentrifugationsschritte (25min, 6000g und 10min, 9600g) wurde das Serum von den Blutzellen getrennt und konnte als Überstand abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Das Serum wurde bei -20°C zur weiteren Verarbeitung gelagert. Medienüberstände wurden aus Zellkulturen nach Inkubation gewonnen. Die hergestellten Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (5min, 400g, 4°C), in Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C tiefgefroren.

2.3.10 Einzelzellsuspensionsherstellung

Milz oder Tumoren wurden durch ein 100µm feines Sieb gerieben, das Sieb währenddessen mit 10ml PBS gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (5min, 400g, 4°C). Danach wurde der Überstand verworfen. Bei in vivo-Untersuchungen wurde eine zusätzliche Erythrolyse durchgeführt. Hierzu wurde 1ml Erythrolyse-Puffer (Kapitel 2.2.7 Tabelle 12) hinzugegeben und die Probe inkubiert (2min, Raumtemperatur=RT). Durch Zugabe von 10ml PBS wurde die Reaktion unterbrochen.

Das Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert, durch ein 40µm feines Sieb gegeben und das Sieb mit 9ml PBS gespült. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (5min, 400g, 4°C) und der Überstand verworfen. Bei einer Tumorprobe wurde dieser Waschschrift wiederholt. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und die Zellzahl nach Anfärben devitaler Zellen mittels Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach zu erreichender Endkonzentration musste die Probe dann mit einer errechneten Menge an PBS versetzt werden.

2.3.11 Magnetische Zellisolation (*magnetic activated cell sorting*=MACS)

Durch die MACS-Methode wurden gezielt Zellpopulationen isoliert. Hierzu wurden sie mit Antikörpern gegen ihre spezifischen Antigene markiert, die wiederum ein magnetisches Molekül gebunden hatten. Durchlief die Zellsuspension eine spezielle Säule, welche mittels Halterung an einer Magnetwand befestigt war, wurden die markierten Zellen zurückgehalten und konnten nachfolgend eluiert werden.

So war es möglich, gewünschte Zellen (Positive Selektion) oder unerwünschte Zellen (Negative Selektion) zu markieren. Diese Methode ermöglichte somit die Isolierung von Zellsubpopulationen.

2.3.11.1 Magnetische Isolation von CD11b⁺-Zellen

Die Isolation der CD11b⁺-Zellen erfolgte nach Protokoll des MACS-Kits (siehe Kapitel 2.2.5). Es wurde eine Tumorzellsuspension wie in Kapitel 2.3.10 hergestellt, wobei die Tumoren vorab einzeln zerkleinert und jeweils in 5ml Inkubationslösung (Tabelle 11, Kapitel 2.2.7) inkubiert wurden (15min, 37°C).

Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (10min, 300g, 4°C) und der Überstand verworfen. Dann wurde jedes Zellpellet pro 1×10^7 Zellen in 90µl MACS-Puffer (Tabelle 12, Kapitel 2.2.7) gelöst und pro 1×10^7 Zellen 10µl CD11b-Microbeads hinzugegeben. Nach kurzem Mischen inkubierten die Suspensionen (15min, 4-8°C). Es folgte ein Waschschriff, bei dem 1-2ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen hinzugegeben, die Proben zentrifugiert (10min, 300g, 4°C) und der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in 1-2ml MACS-Puffer pro Säule suspendiert.

Die Separation begann mit dem Einhängen der sterilen Säulen in die dafür vorgesehenen Halterungen an einer Magnetwand (Tabelle 15, Kapitel 2.2.9). Verwendet wurden LS-Säulen. Jede Säule wurde mit 3ml MACS-Puffer befeuchtet und nach Durchlauf des Puffers mit 1-2ml Probe bestückt. Der Durchfluss wurde in einem 15ml Reagenzröhrchen aufgefangen. Nach Durchlauf der Probe wurden die Säulen gewaschen, indem zweimal 3ml MACS-Puffer hinzugegeben wurde. Die Säule wurde aus der Halterung gelöst, auf ein 15ml Reagenzröhrchen positioniert, 5ml MACS-Puffer hinzugefügt und die Zell-Puffer-Suspension mittels Kolben eluiert. Der gesamte Vorgang der Separation wurde wiederholt, um eine höhere Reinheit der Zellen zu erlangen, die nachträglich mittels FACS ermittelt wurde.

2.3.11.2 Magnetische Isolation von CD11b⁺Gr-1-Zellen

Gr-1/CD11b⁺-Zellen, des Weiteren als Makrophagen bezeichnet, wurden in zwei verschiedenen MACS-Schritten isoliert, wofür zwei KITs Anwendung fanden (Kapitel 2.2.5). Isoliert wurden die Zellen aus Tumoren von 28 Tage vorab operierten WT- und KO-Mäusen. Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie in Kapitel 2.3.10 beschrieben. Nach Zentrifugation der Zellen (10min, 300g, 4°C) und Verwerfen des Überstands, wurden die Zellen in 400µl MACS-Puffer pro 10^8 totale Zellen aufgenommen. Es wurden 100µl Anti-Gr-1-Biotin pro 10^8 totale Zellen hinzugegeben und das Gemisch inkubiert (10min, 2-8°C). Danach wurden 1-5ml MACS-Puffer pro 10^8 totale Zellen hinzugegeben, die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 300g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 900µl MACS-Puffer pro 10^8 totale Zellen gelöst, 100µl Streptavidin MicroBeads hinzugegeben und inkubiert (15min, 2-8°C). Die Zellsuspension wurde mit 10-20ml MACS-Puffer pro 10^8 totale Zellen gewaschen, zentrifugiert (10min, 300g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun in 500µl MACS-Puffer pro 10^8 Zellen gelöst. Es wurden LS-Säulen mit

3ml MACS-Puffer befeuchtet und nach Durchlauf der Zellsuspension mit 3x3ml MACS-Puffer gewaschen. Gr1⁺-Zellen verblieben in der Säule. Der Durchfluss enthielt Gr-1⁻-Zellen. Diese wurden zur weiteren Isolation laut Kapitel 2.3.11.1 verwendet.

2.3.12 Kultivierung von Tumor- und Milzzellen

Die Kultivierung von Tumor- und Milzzellen erfolgte nach Herstellung einer Einzelzellsuspension (Kapitel 2.3.10) und der Ermittlung der Zellzahl. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (5min, 400g, 4°C) und der Überstand verworfen. Um eine Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml Medium zu erreichen, wurden die Zellen in entsprechender Menge Standard-Kulturmedium (Tabelle 13, Kapitel 2.2.8) resuspendiert und auf 96er-Kulturplatten verteilt. Pro Kulturplattenausbuchung wurden 2x10⁵ Zellen ausgebracht und im Inkubator bei 37°C, je nach Versuchsansatz, 12 bis 72 Stunden inkubiert.

2.3.13 Kultivierung von CD11b⁺-Zellen

Die Kultivierung erfolgte an CD11b⁺-Zellen aus Kapitel 2.3.11.1. Die 96er-Kulturplatten wurden vorab für ein paar Stunden mit Kulturmedium mit 30% FCS-Anteil (Tabelle 13, Kapitel 2.2.8) befüllt und inkubiert (37°C). Es wurde eine Konzentration von 2x10⁶ Zellen/ml Medium gewählt. Je 200µl (4x10⁵ Zellen) des Zell-Medium-Ansatzes wurden in einer Einheit einer 96er-Kulturplatte inkubiert (12h, 37°C).

2.3.14 Behandlung in vitro mit 5FU und IFN-α

Die Behandlung erfolgte an kultivierten CD11b⁺-Zellen aus Kapitel 2.3.13, die bereits zwei Stunden inkubierten. Durch Behandlung der Zellen mit 450µM 5FU/ 1x10⁶ Zellen, mit 5x10²units IFN-α / 1x10⁶ Zellen, bzw. der kombinierten Therapie, entstanden neben einer unbehandelten Kontrollgruppe drei weitere Therapiegruppen.

2.3.15 Erfassung der Proliferation von Splenozyten in der Durchflusszytometrie

Die Behandlung der Splenozyten-Zellsuspension erfolgte mittels CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) (Tabelle 9, Kapitel 2.2.4.1) und ermöglichte die Quantifizierung der Proliferation der Zellen. CFSE wurde hierbei von den Zellen wie ein Farbstoff aufgenommen und während der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Eine Abnahme der Farbintensität spiegelte proportional die Zellteilung wider.

Das CFSE wurde mit 50µl sterilen DMSO (Tabelle 10, Kapitel 2.2.7) vermengt (5min, Tischshaker, RT), aliquotiert, sowie im weiteren Vorgehen im Verhältnis 1:100 mit PBS

verdünnt. Die Splenozyten wurden in einer Konzentration von 10×10^6 /ml in PBS (RT) aufgenommen. Nach Zugabe von $5 \mu\text{l}$ des CFSE-Gemisches pro ml Splenozyten-Zellsuspension, wurde diese inkubiert (10min, RT). Dies entsprach einer Konzentration von $0,25 \mu\text{g}$ CFSE/ml. Durch Zugabe des vier- bis fünffachen Volumens kalten Mediums und anschließender Inkubation (5min, 4°C), wurde die Reaktion der Zellen mit CFSE gestoppt. Die Zellsuspension wurde drei Mal mit Standard-Kulturmedium gewaschen, in Standard-Kulturmedium aufgenommen (2×10^6 Zellen/ml) und in Kultur verbracht ($100 \mu\text{l}$ /Einheit einer 96er Kulturplatte). Das erfolgreiche Markieren konnte unter dem Lichtmikroskop anhand von roten Anteilen in den Zellen überprüft werden.

2.3.16 Kokultivierung von Splenozyten und Makrophagen

Nach Isolation der Makrophagen aus Primärtumoren von tumortragenden KO- und WT-Mäusen, wurden die Makrophagen mit CFSE-markierten Splenozyten aus 2.3.15 kokultiviert. Die Makrophagen wurden hierzu ebenfalls auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Standard-Kulturmedium gebracht und $100 \mu\text{l}$ zu den platzierten Splenozyten gegeben. Dadurch ergab sich ein Verhältnis von Splenozyten zu Makrophagen von 1:1.

2.3.17 Aktivierung von Splenozyten

Mittels CD3- und CD28-Antikörpern (Tabelle 9, Kapitel 2.2.4.1) konnte die Proliferation von Splenozyten aktiviert werden. Hierzu wurde ein Teil der bereits eine Stunde lang inkubierten Kokultur aus 2.3.16 mit einem Gemisch aus $2,5 \mu\text{g}$ CD3- und $5 \mu\text{g}$ CD28-Antikörper /1ml Standard-Kulturmedium aktiviert, von dem $50 \mu\text{l}$ in je eine Einheit der 96er-Kulturplatte verbracht wurde.

2.3.18 Fluoreszenz-gekoppelte Zellanalyse in der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*=FACS)

Die Zellanalyse mittels FACS ermöglichte die Erfassung verschiedener Zellpopulationen einer Zellprobe. Es wurden Größe und Granularität der Zellen gemessen, sowie die Zellsubpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenantigene analysiert.

Hierzu inkubierten die Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Tabelle 8, Kapitel 2.2.3), die jeweils mit einem Fluorochrom gekoppelt waren. Es konnten acht verschiedene Fluorochrome im FACS-Gerät (FACS Canto II™, BD, DE) detektiert, demnach bis zu acht verschiedene Oberflächenantigene bestimmt werden. Diese Oberflächenantigene konnten extrazellulär oder intrazellulär liegen und erforderten unterschiedliche Inkubationsschritte,

eine extrazelluläre- (2.3.18.1) oder intrazelluläre FACS-Färbung (2.3.18.2).

Wanderte die behandelte Zelle im Flüssigkeitsstrom am Laser des FACS-Gerätes vorbei, wurde das Licht an ihr gestreut, sowie das gebundene Fluorochrom angeregt. Gestreutes und emittiertes Licht wurden durch Photodetektoren erfasst und in der DIVA-Software (Tabelle 16, Kapitel 2.2.10) in elektronische Daten umgewandelt. Die Software konnte neben Zellzahlen auch die Zellsubpopulationen unterschiedlich graphisch darstellen.

2.3.18.1 Anfärbung extrazellulärer Antigene (für FACS)

An Antigene, die an der Oberfläche der Zellen liegen, konnten sich Antikörper direkt anlagern. Sie wurden also extrazellulär markiert. Im ersten Schritt wurden unspezifische Bindungen mit Antikörpern unterdrückt, indem die Probe mit je 1µl CD16/32 inkubiert wurde (10min, 4°C). Danach wurden die gewünschten Antikörper hinzugegeben und die Probe erneut inkubiert (20min, 4°C, unter Lichtabschluss). Danach wurden die Proben mit je 1-2ml Stain-Buffer (Tabelle 12, Kapitel 2.2.7) gewaschen, zentrifugiert (5min, 400g, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt und das Zellpellet in ca. 150µl resuspendiert. Die Proben waren durchgehend abgedunkelt und bei 4°C zu behandeln.

2.3.18.2 Anfärbung intrazellulärer Antigene (für FACS)

Um Antigene zu markieren, die im Zellinneren lagen, mussten Poren in den Zellmembranen geschaffen werden, damit die Antikörper in das Zellinnere gelangen konnten. Die intrazelluläre Färbung schloss sich an das Protokoll der extrazellulären Färbung nach dem ersten Waschschrift an.

Der Probe wurde 1ml Fix/Perm-Buffer hinzugefügt, das Zellpellet darin gelöst und inkubiert (4h, 4°C, unter Lichtabschluss). Danach wurde mit 1ml Perm-Buffer gewaschen, zentrifugiert (5min, 400g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das zweite Mal Waschen erfolgte mit 2ml Perm-Buffer. Dann wurden die Antikörper gegen intrazelluläre Antigene hinzugegeben, die Probe gemischt und inkubiert (30min, 4°C, unter Lichtabschluss). Es folgten erneut zwei Waschschriffe mit je 2ml Perm-Buffer. Anschließend wurde die Probe in 150µl Stain-Buffer aufgenommen und konnte gemessen werden.

2.3.19 Inkubation von CD11b⁺-Zellen mit FluoSpheres®Carboxylate-Beads zur Ermittlung der Phagozytoseaktivität

Die Zellen aus Kapitel 2.3.14 wurden nach zwölfstündiger Inkubationszeit mit FluoSpheres®Carboxylate-Beads (Tabelle 8, Kapitel 2.2.3) inkubiert (1h, 37°C). Es wurde

eine Konzentration von $7,7 \times 10^5$ Beads / 1×10^6 Zellen verwendet. Dies entsprach 10 μ l Bead-Suspension/ 96er-Kulturplatteneinheit. Die Proben wurden nach Inkubation entnommen, zentrifugiert (5min, 400g, 4°C) und der Medienüberstand für weitere Messungen tiefgefroren. Die Zellproben wurden mit je 1-2ml Stain-Buffer (Tabelle 12, Kapitel 2.2.7) gewaschen, zentrifugiert (5min, 400g, 4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt und das Zellpellet in ca. 150 μ l resuspendiert. Anschließend wurde die Probe gemessen. Die Fluoreszenz der Beads konnte im FITC-Kanal (495nm) des FACS-Gerätes erfasst werden.

2.3.20 Luminex-basierte Zytokinmessung

Die Messung der Zytokine in Serumproben und Medienüberständen erfolgte mittels Luminex-xMAP-Technologie (Kapitel 2.2.6). Es kamen bei dieser Messmethode *Microspheres* zum Einsatz, fluoreszenz-gekoppelte Polystyrenkügelchen („Beads“), die jeweils spezifisch an ein im Serum befindliches Zytokin binden. Jedes Bead besaß im Inneren ebenso spezifische Fluoreszenzfarbstoffe, wodurch sie bei der Messung im Bio-Plex 200 System (Tabelle 16, Kapitel 2.2.10) in bestimmte Regionen unterteilt wurden. Jede Region entsprach einem bestimmten Bead, also einem bestimmten Zytokin. Zur gleichzeitigen Quantifizierung der Zytokine wurden Detektions-Antikörper verwendet, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt wurden. Die verwendeten Luminex-KITs beinhalteten ein Set aus Beads, das dem Untersuchungsvorhaben entsprach (Kapitel 2.2.6). Generell erlaubte diese Technologie eine gleichzeitige Messung von bis zu 500 Analyten in einer Probe. Die Beads wurden dabei einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an zwei Lasern oder LEDs vorbeigeführt und angeregt. Das emittierte Licht wurde von Photodetektoren erfasst und in Form von elektronischen Daten in die Luminex-Software übertragen. In der dort befindlichen Grafik wurden auf einer Achse die Regionen dargestellt, also die einzelnen Zytokine. Die andere Achse stellte die Menge der farbgekoppelten Detektionsantikörper dar, die der Menge eines bestimmten Zytokins entsprach.

Die Durchführung wurde nach Protokoll des jeweiligen Luminex-KITs (2.2.6) vorgenommen. Auf der vorgefertigten, magnetischen 96-well-Platte inkubierten die Proben mit KIT-spezifischen Beads (über Nacht, Tischshaker, 4°C). Am nächsten Tag folgten Inkubationsschritte mit Detektions-Antikörpern, sowie Streptavidin-Phycoerythrin, das als Farbstoff diente. Leer-, Standard- und Kontrollproben, die neben den Proben auf der Platte enthalten waren, dienten zur genauen Quantifizierung der jeweils enthaltenen Zytokine.

2.3.21 Statistik

Alle Daten wurden mit dem Programm „GraphPad Prism Version 5.01“ (Tabelle 16, Kapitel 2.2.10) statistisch aufgearbeitet. Die Überlebenszeit tumortragender WT-Mäuse mit und ohne B7-H1-Antikörper-Therapie wurde in *Kaplan-Meier*-Kurven dargestellt. Der statistische Vergleich beider Überlebenszeitkurven erfolgte mittels anschließendem *Log-rank*-Test sowie *Gehan-Breslow-Wilcoxon*-Test. Mittels *Hazard-Ratio* wurde das Verhältnis der Überlebenszeiten beider Gruppen ermittelt.

Durch den ungepaarten, zweiseitigen *t*-Test wurden normalverteilte Daten zweier Gruppen verglichen. Besaß eine der zwei Gruppen mehrere Merkmale als Ausprägung, wurde die *one-way ANOVA (analysis of variance)* mit anschließendem *Dunnett*-Test bzw. *Tukey*-Test verwendet. Hierbei wurde je nach Untersuchungsvorhaben gegen eine Kontrollgruppe bzw. alle Gruppen gegeneinander getestet. Die *two-way ANOVA* mit anschließendem *Bonferroni*-Test wurde zur Analyse des Einflusses zweier unabhängiger Faktoren (Maustyp und Therapie) und derer Wechselwirkung bzw. Interaktion in Bezug auf eine abhängige Variable (Immunkellexpression in 3.1.3 bzw. Zytokinkonzentration in 3.1.6) verwendet.

Die Korrelationen zwischen Tumolvolumina und bestimmten Zellpopulationen wurde mittels *Spearman*-Korrelationskoeffizienten (*r*) ermittelt. Der Vergleich aufgetretener Metastasen wurde mittels χ^2 -Test (*Chi-Quadrat*-Test) durchgeführt. Die Ergebnisse der Experimente wurden nach Möglichkeit aus mindestens drei unabhängigen Beobachtungen ermittelt.

Die Verteilung der Variablen wurde bei normalverteilten Daten mit Mittelwert sowie Standardabweichung (SD) und bei nicht-normalverteilten Daten mit Median sowie 25%- und 75%-Perzentil angegeben. Das Signifikanzniveau lag bei allen Tests $< 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 In-vivo-Untersuchung von Milzen und Tumoren tumortragender WT- und KO-Mäusen unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

In dieser Versuchsreihe wurden die Immunzellexpressionen tumortragender WT- und KO-Mäuse in Milzen und Tumoren unter dem Einfluss von Chemo- und Immuntherapie untersucht. Welche Auswirkungen die unterschiedlichen Therapieansätze auf die Immunzell- sowie auf die Zytokinexpression hatten, sollte in den folgenden Punkten erörtert werden. Inwiefern die Therapien die Expression von B7-H1 beeinflussten und ob sich dadurch ein positiver Einfluss auf die anti-Tumorimmunität ergab, wurde nachfolgend betrachtet. Die Verwendung von WT- und KO-Mäusen diente hierbei als zusätzlicher Vergleich für die Expression von B7-DC, welches wie B7-H1 als Ligand an PD-1 fungiert.

Es wurden KO- und WT-Mäusen im Alter von 8 Wochen (Kapitel 2.1) Panc02-Zellen (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1) orthotop implantiert (Kapitel 2.3.2). Die Mäuse wurden an Tag 5, 7 und 9 p.op. mit IFN, 5FU oder IFN+5FU-Kombination i.p. therapiert. Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe (CON) operierter, nicht-therapierter Mäuse herangezogen (Kapitel 2.3.4). Nach 28 Tagen p.op. wurde aus den narkotisierten Mäusen Blut für die Zytokinmessung gewonnen, die Mäuse anschließend euthanasiert und Milz und Primärtumor entnommen. Die Tumoren wurden gemessen und die Tumorumfänge ermittelt sowie makroskopisch sichtbare Metastasen erfasst (Kapitel 2.3.5, 2.3.8 und 2.3.9).

Milz und Tumor wurden in Einzelzellsuspensionen überführt und verschiedene Immunzellpopulationen im FACS (siehe Kapitel 2.3.18) analysiert und mittels FlowJo-Software ausgewertet. Die Ermittlungen der Zellpopulationen der einzelnen Panels (T-cell-Panel, T_{Reg}/T_{Conv}/B-cell-Panel, MDSC/Makrophagen-Panel) im FlowJo sind in den Abbildungen 3-5 dargestellt. Aufgrund limitierter Anzahl an KO-Mäusen (zeitlich aufwendigere Zucht und Verwendung ausschließlich männlicher Tiere) sowie verringerter Größe und Vorkommen von Tumoren in therapierten Mäusen, liegen die Probenanzahlen n im zum Teil sehr niedrigen, einstelligen Bereich. Mäuse, die makroskopisch keinen Tumor entwickelten, wurden in dieser Arbeit nicht weiter erfasst.

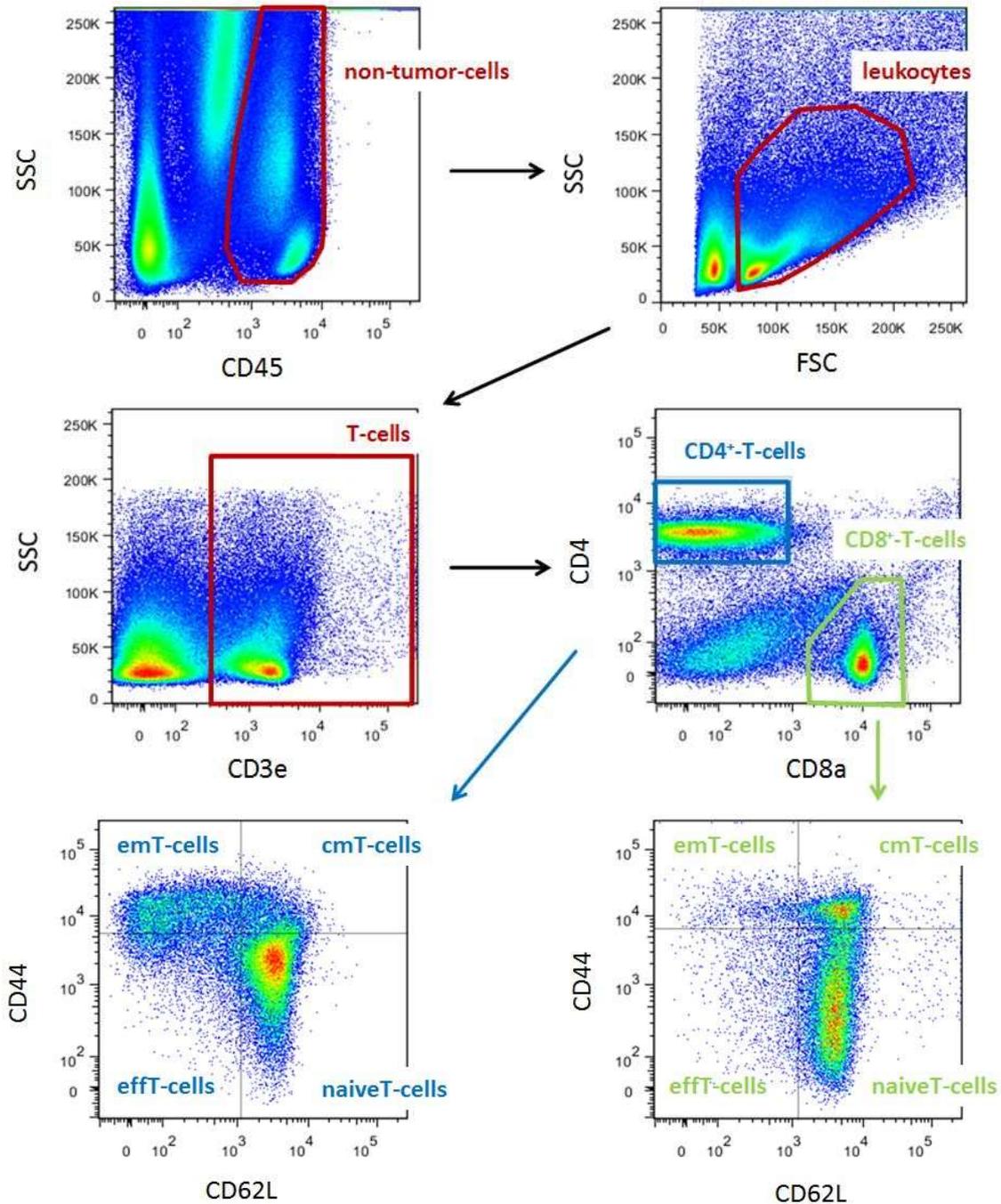


Abbildung 3: Auswertungsstrategie zur Erfassung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software. CD3⁺-T-Zellen wurden aus CD45⁺-Leukozyten ermittelt und mittels CD4- und CD8-Antikörper in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterteilt. Die Analyse ihrer Subpopulationen (naiveT-cells, effT-cells, emT-cells, cmT-cells) erfolgte mittels CD44 und CD62L.

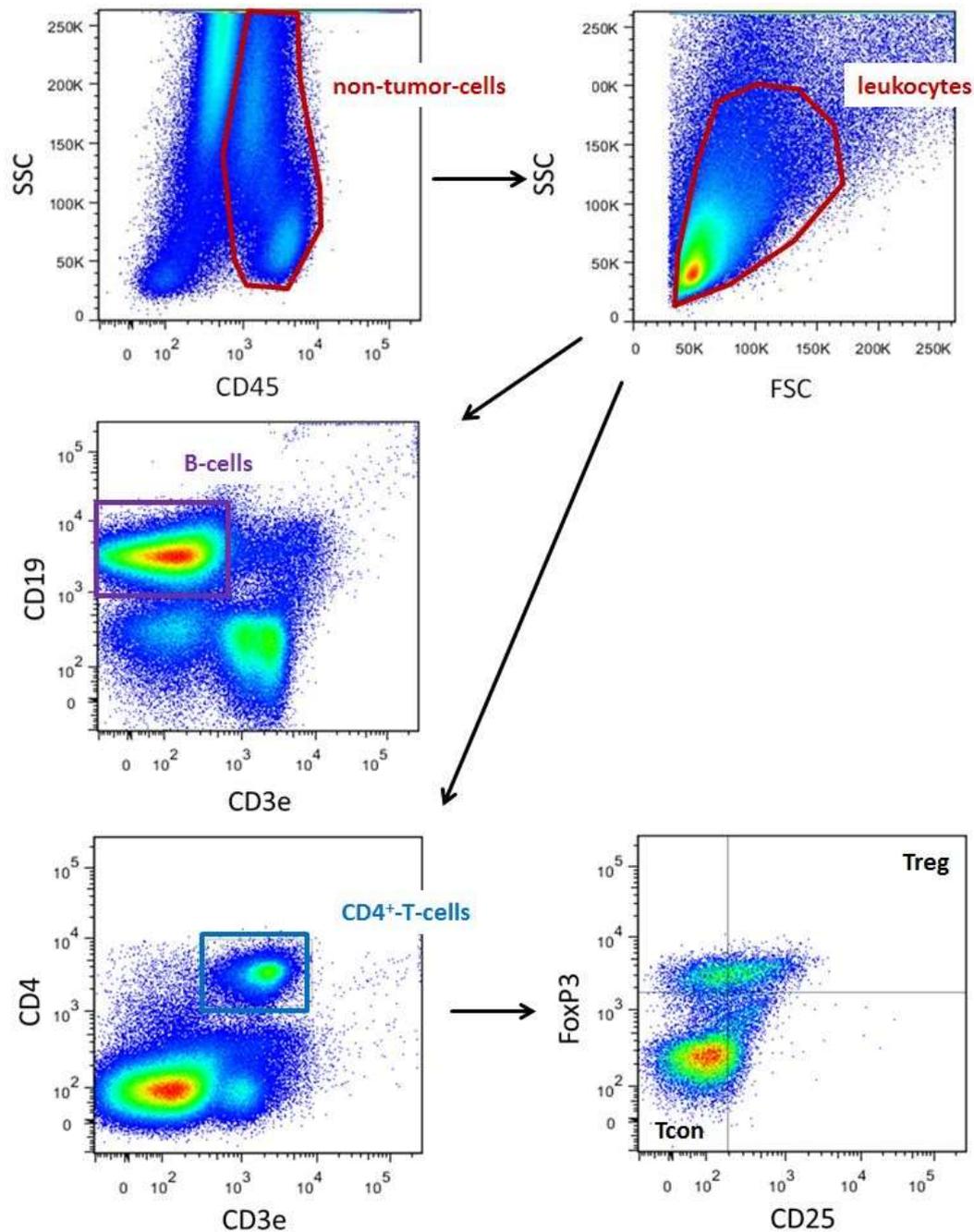


Abbildung 4: Auswertungsstrategie zur Erfassung von B-Zellen sowie T_{Reg} (CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-T-Zellen) und T_{Conv} (CD25⁺FoxP3⁻CD4⁺-T-Zellen) in Milzen und Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software. Mittels CD3 und CD19 sowie mittels CD3 und CD4 wurden B-Zellen und CD4⁺-T-Zellen aus CD45⁺-Leukozyten analysiert und mittels FoxP3 und CD25 ihre Subpopulationen betrachtet.

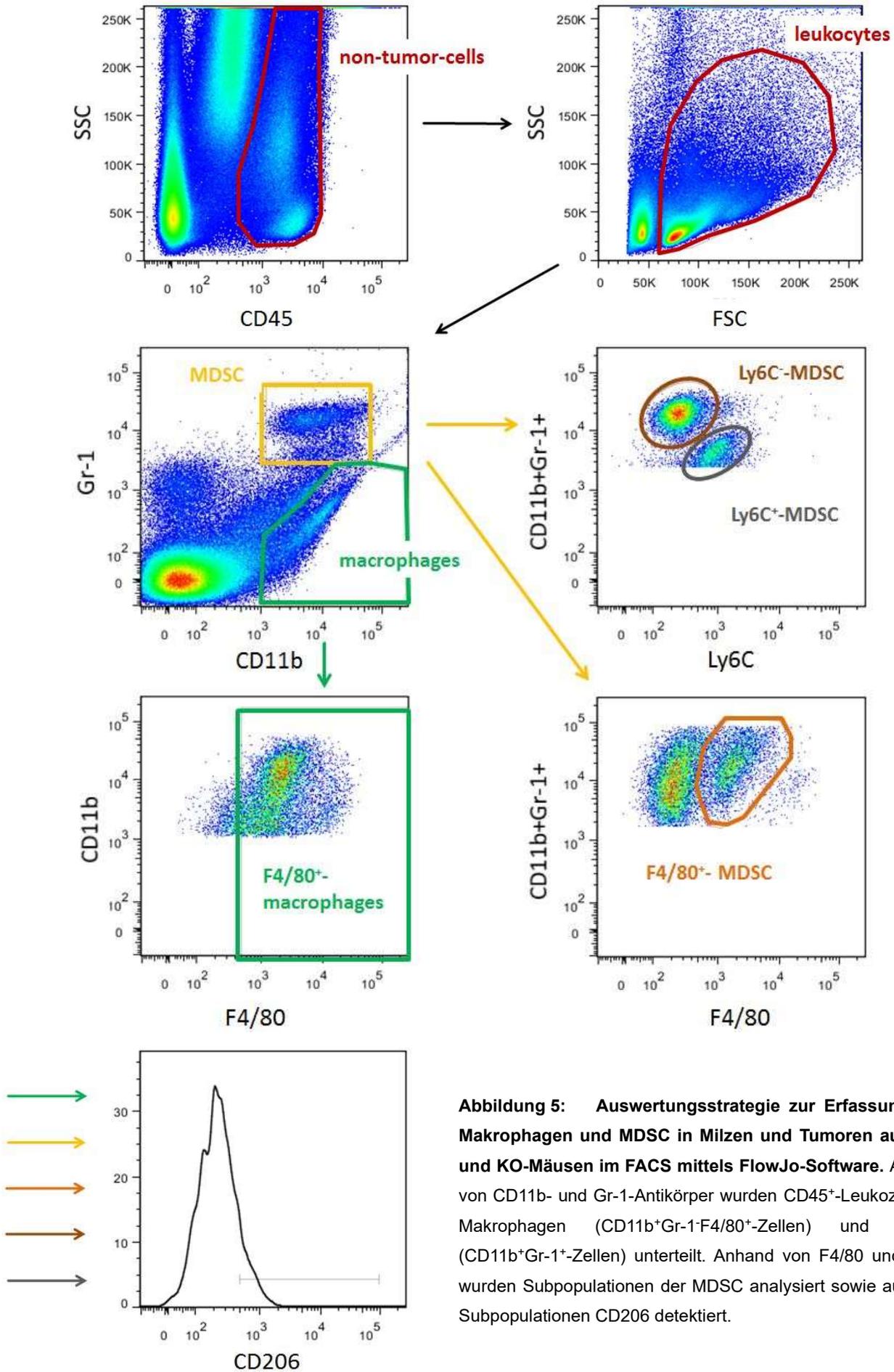


Abbildung 5: Auswertungsstrategie zur Erfassung von Makrophagen und MDSC in Milzen und Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software. Anhand von CD11b- und Gr-1-Antikörper wurden CD45⁺-Leukozyten in Makrophagen (CD11b⁺Gr-1⁻F4/80⁺-Zellen) und MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen) unterteilt. Anhand von F4/80 und Ly6C wurden Subpopulationen der MDSC analysiert sowie auf allen Subpopulationen CD206 detektiert.

3.1.1 In-vivo-Untersuchung der Immunzellexpression in Milzen und Tumoren tumortragender WT-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

Die in Abbildung 6 dargestellten Zellpopulationsanteile in Milzen und Tumoren tumortragender WT-Mäuse unter Einfluss der Therapie von IFN, 5FU und IFN+5FU sowie ohne Therapie (CON) zeigten einen signifikanten Anstieg der T-Lymphozyten (CD3⁺-Leukozyten) an der Gesamtheit der Leukozyten in WT-Milzen unter Therapie von IFN im Vergleich zur Kontrollgruppe. Betrachtet man den Anteil an T-Lymphozyten an der Gesamtheit der Leukozyten und den Anteil der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten an der Gesamtheit der T-Lymphozyten in WT-Milzen und WT-Tumoren waren jedoch keine signifikanten Veränderungen zu erkennen.

In Abbildung 7 und 8 sind die Anteile der Subpopulationen der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtheit der jeweils CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen erfasst. Signifikant verringert waren dabei in WT-Milzen die CD4⁺-Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T-cells*=emT-cells) der IFN+5FU-Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Anteil an CD4⁺-zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (*central memory T-cells*=cmT-cells) war in der IFN+5FU- sowie in der 5FU-Therapiegruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. In WT-Tumoren waren die emT-CD4⁺-Zellen unter Einfluss der Therapie von IFN im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert. Die cmT-CD4⁺-Zellen waren wiederum unter Therapie mit IFN signifikant erhöht. Der Anteil an naiven CD4⁺-T-Zellen (*naive T-cells*) zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den Therapiegruppen in Milzen und Tumoren tumortragender WT-Mäuse. In WT-Milzen erhöhte sich der Anteil an naiven CD8⁺-T-Zellen signifikant in der 5FU- sowie in der IFN+5FU-Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Keine signifikanten Veränderungen waren hinsichtlich der emT-CD8⁺-Zellen und der cmT-CD8⁺-T-Zellen zu erkennen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Leukozyten- und T-Zellpopulationen zusammenfassend, bestanden im Vergleich aller Therapie- und Kontrollgruppen keine signifikanten Veränderungen in Milzen und Tumoren tumortragender WT-Mäuse bezüglich der Anteile an Leukozyten, CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen sowie naiven CD4⁺-T-Zellen, emT-CD8⁺- und cmT-CD8⁺-Zellen. In WT-Tumoren zeigte lediglich die Therapie mit IFN signifikante Veränderungen hinsichtlich des Anteils an emT-CD4⁺- (verringert) und cmT-CD4⁺-Zellen (erhöht). Zudem stieg in WT-Milzen die Zahl an CD3⁺-T-Zellen unter Therapie mit IFN. Die Therapie mit 5FU erhöhte signifikant den Anteil an cmT-CD4⁺- sowie naiven CD8⁺-T-Zellen. Unter Einfluss von IFN+5FU sank der Anteil an emT-CD4⁺-Zellen signifikant, dafür stiegen die Anteile an cmT-CD4⁺- und naiven CD8⁺-T-Zellen. In WT-Tumoren konnten bezüglich dieser Zellpopulationen keine signifikanten Veränderungen gezeigt werden, sodass kein direkter Zusammenhang zu den Veränderungen der Zellpopulation in WT-Milzen unter Einfluss der Therapien bestand.

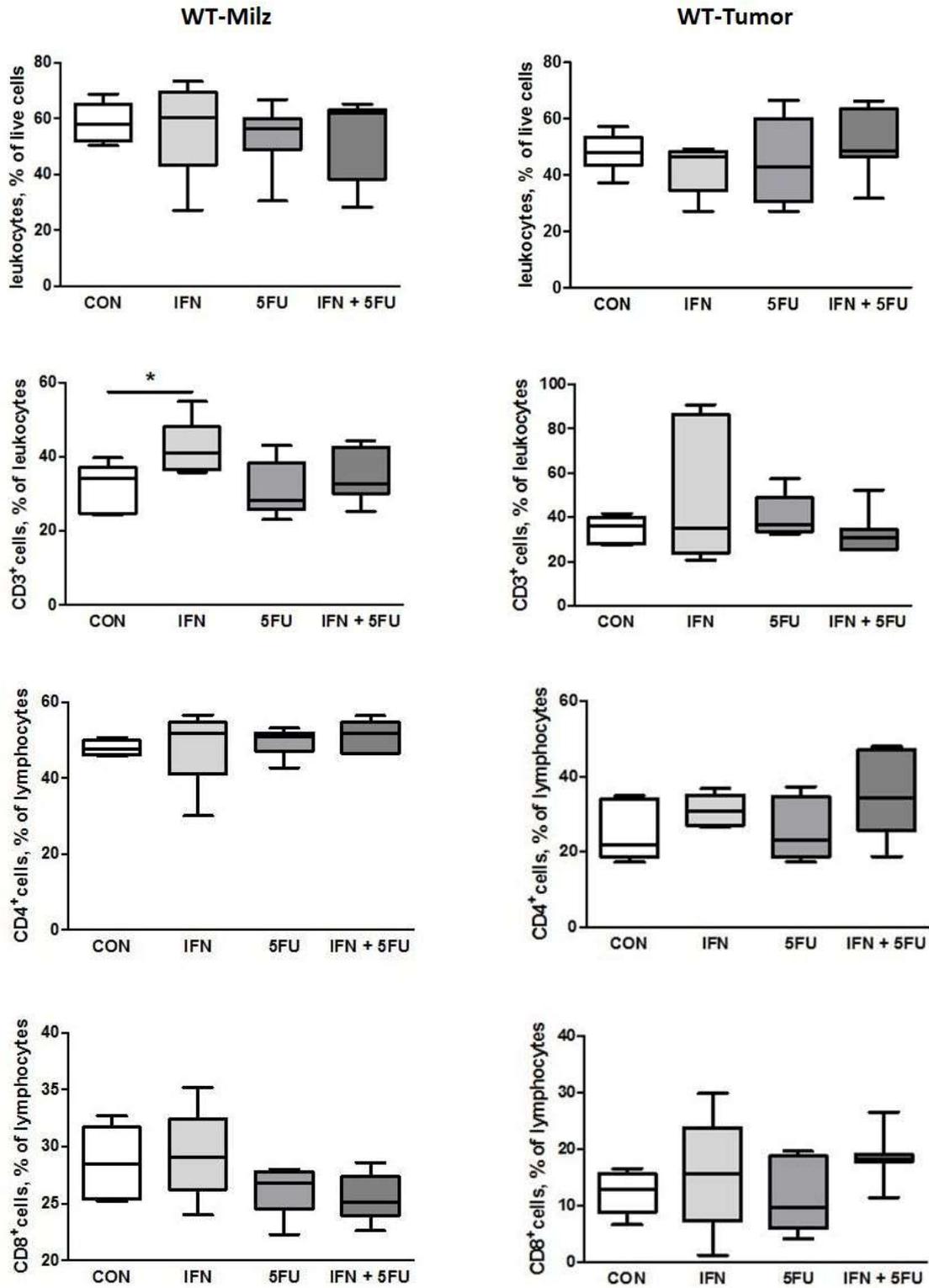


Abbildung 6: Anteile an Leukozyten, Lymphozyten (CD3⁺-T-Zellen) sowie CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=4-7); * - P < 0,05.

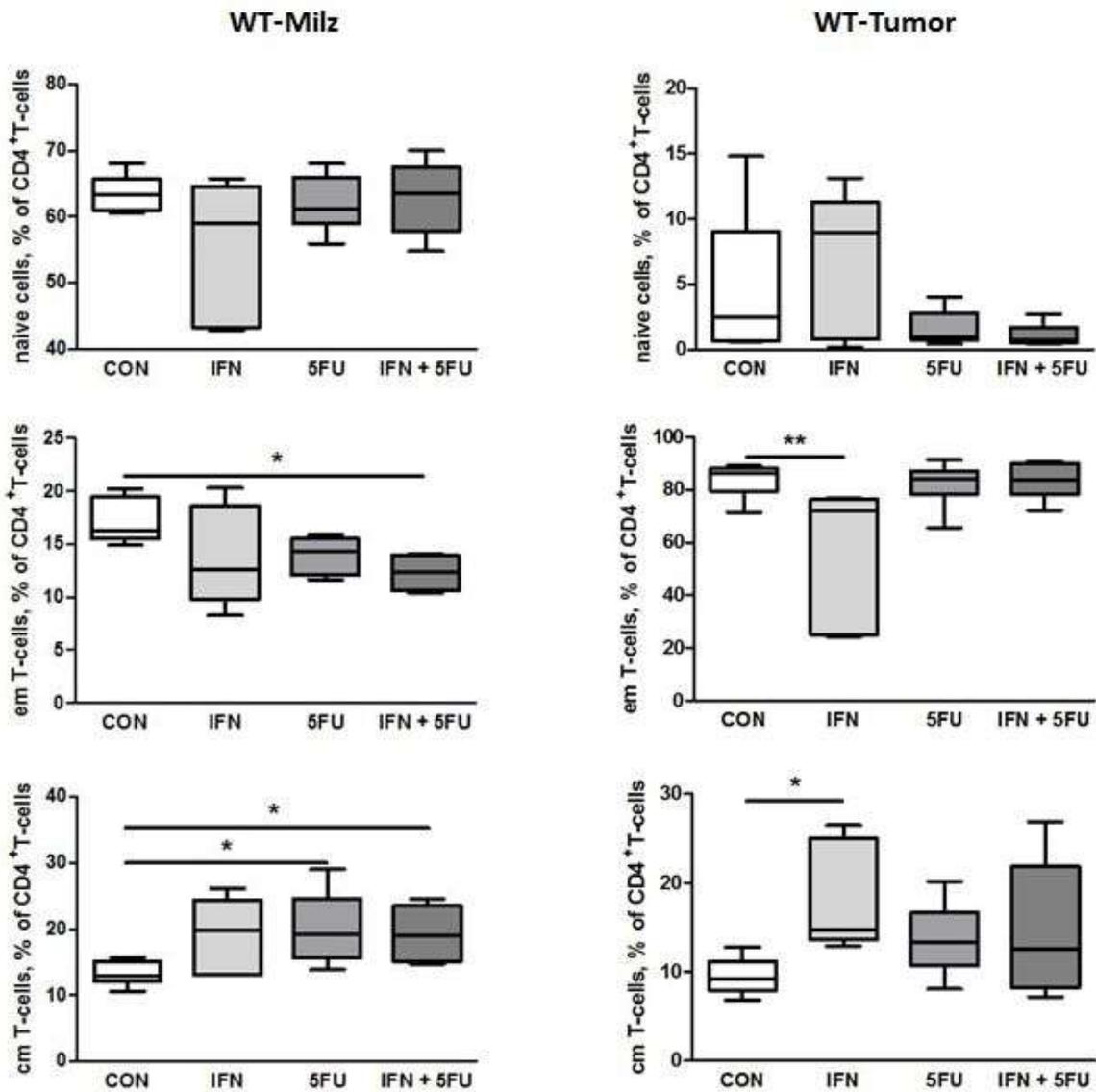


Abbildung 7: Anteile der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD4⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=5-7); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

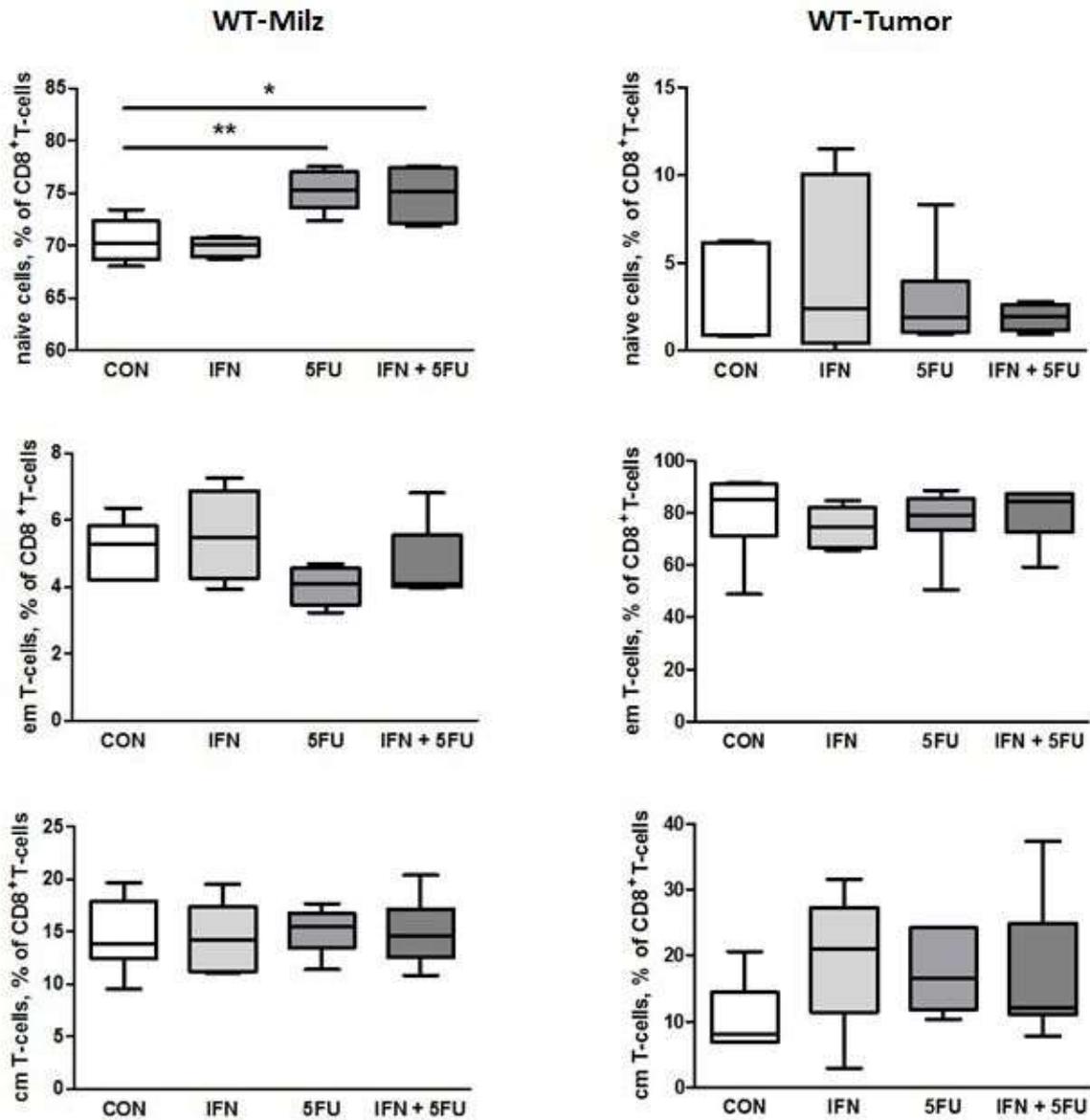


Abbildung 8: Anteile der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD8⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=5-7); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

Betrachtet man die in Abbildung 9 dargestellten Anteile an regulatorischen T-Zellen (T_{Reg} , CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-T-Zellen) und konventionellen T-Zellen (T_{Conv} , CD25⁻FoxP3⁻CD4⁺-T-Zellen) an der Gesamtheit der CD4⁺-T-Zellen sowie die Anteile an B-Zellen (CD3⁻CD19⁺-Leukozyten) an der Gesamtheit der CD3⁺-Leukozyten in WT-Milzen und WT-Tumoren unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Therapie (CON), so zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an B-Zellen in WT-Milzen unter Therapie mit 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe. In WT-Tumoren war der Anteil an B-Zellen signifikant unter Ein-

fluss der Therapie von 5FU verringert. Der Anteil an T_{Conv} war in WT-Tumoren unter Einfluss von IFN signifikant erhöht.

Es konnte beobachtet werden, dass die Therapie mit 5FU den Anteil an B-Zellen in WT-Milzen signifikant steigen und in WT-Tumoren signifikant sinken ließ, sodass ein direkter Zusammenhang zwischen den Populationsveränderungen vermutet werden konnte. Außerdem zeigten die Therapien in WT-Milzen und Tumoren keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil an T_{Reg} .

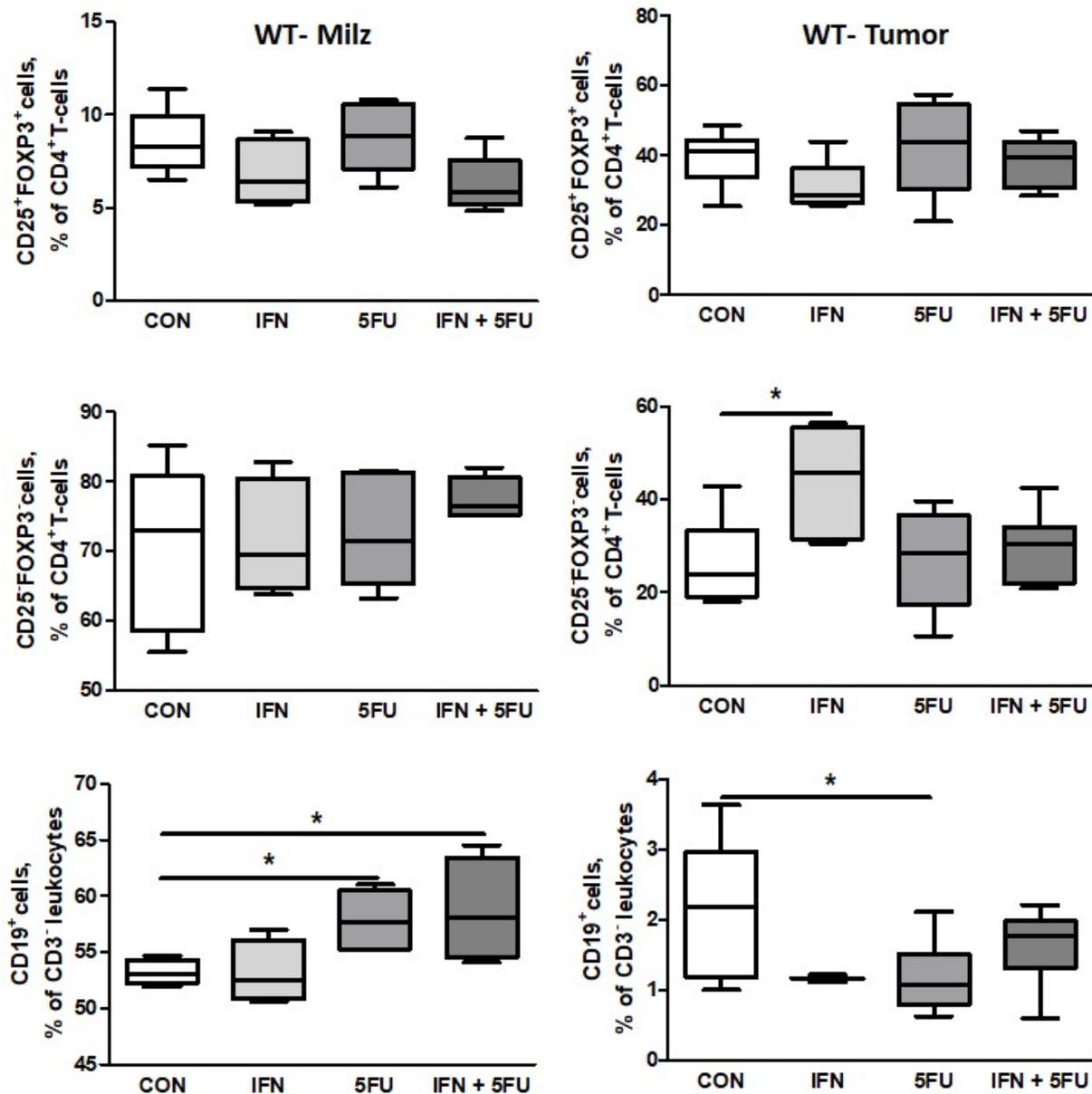


Abbildung 9: Anteile der T_{Reg} (CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-Leukozyten), T_{Conv} (CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺-Leukozyten) und B-Zellen (CD3⁺CD19⁺-Leukozyten) in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=3-8); * - P < 0,05.

In Abbildung 10 sind die Anteile an MDSC am Anteil der Leukozyten und deren Subpopulationen (F4/80⁺-MDSC, monozytäre (Ly6C⁺-) und granulozytäre (Ly6C⁻) MDSC) an der Gesamtheit der MDSC dargestellt. In WT-Milzen war dabei ein signifikant niedrigerer Anteil an MDSC unter Therapie mit IFN im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Der Anteil an F4/80⁺-MDSC waren in WT-Milzen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei allen Therapieansätzen signifikant erhöht.

Der Anteil an monozytären MDSC war signifikant in WT-Milzen unter Therapie mit IFN erhöht, wobei der Anteil an granulozytären MDSC keine signifikanten Veränderungen unter Einfluss der Therapien zeigte. In WT-Tumoren war der Anteil monozytärer MDSC signifikant unter Therapie mit IFN sowie mit 5FU erhöht. Der Anteil an granulozytären MDSC war bei Therapie mit IFN signifikant verringert. Die Anteile an MDSC sowie F4/80⁺-MDSC zeigten in WT-Tumoren keine signifikanten Veränderungen unter Anwendung der Therapien.

Der in Abbildung 11 dargestellte Anteil an Makrophagen an der Gesamtheit der Leukozyten zeigte in WT-Milzen keine signifikanten Veränderungen. Der Anteil der Subpopulation der CD206⁺-Makrophagen war unter Einfluss der Therapie mit 5FU jedoch signifikant erhöht sowie in der IFN-Therapiegruppe signifikant verringert. In WT-Tumoren waren keine signifikanten Veränderungen der Makrophagen und CD206⁺-Makrophagen festzustellen.

Betrachtet man abschließend die Veränderungen der Immunzellexpression in tumortragenden WT-Mäusen (Tabelle 18), die therapiert wurden, zeigte die Therapie mit IFN+5FU keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Immunzellexpression in Tumoren. Die Therapie mit 5FU zeigte zudem in Milzen einen ausschließlich positiven Effekt auf die Anteile einiger Immunzellen in Milzen. In Milzen und Tumoren zeigte die Therapie mit IFN den einflussreichsten, aber zugleich auch unterschiedlichsten Einfluss auf die Immunzellexpression. Die Therapie mit IFN und 5FU zeigte gegensätzlichen Einfluss auf die Anteile der Population von CD206⁺-Makrophagen bezogen auf die Gesamtheit der Makrophagen, jedoch nicht die Kombinationstherapie mit IFN+5FU. Der Anteil der Makrophagen an der Gesamtheit der Leukozyten zeigte bei keiner Therapie signifikante Veränderungen. Die Therapie mit IFN bewirkte in WT-Milzen und Tumoren eine signifikante Erhöhung der monozytären MDSC. In Bezug auf B-Zellen konnte eine signifikante Erhöhung in WT-Milzen sowie eine signifikante Abnahme in WT-Tumoren festgestellt werden.

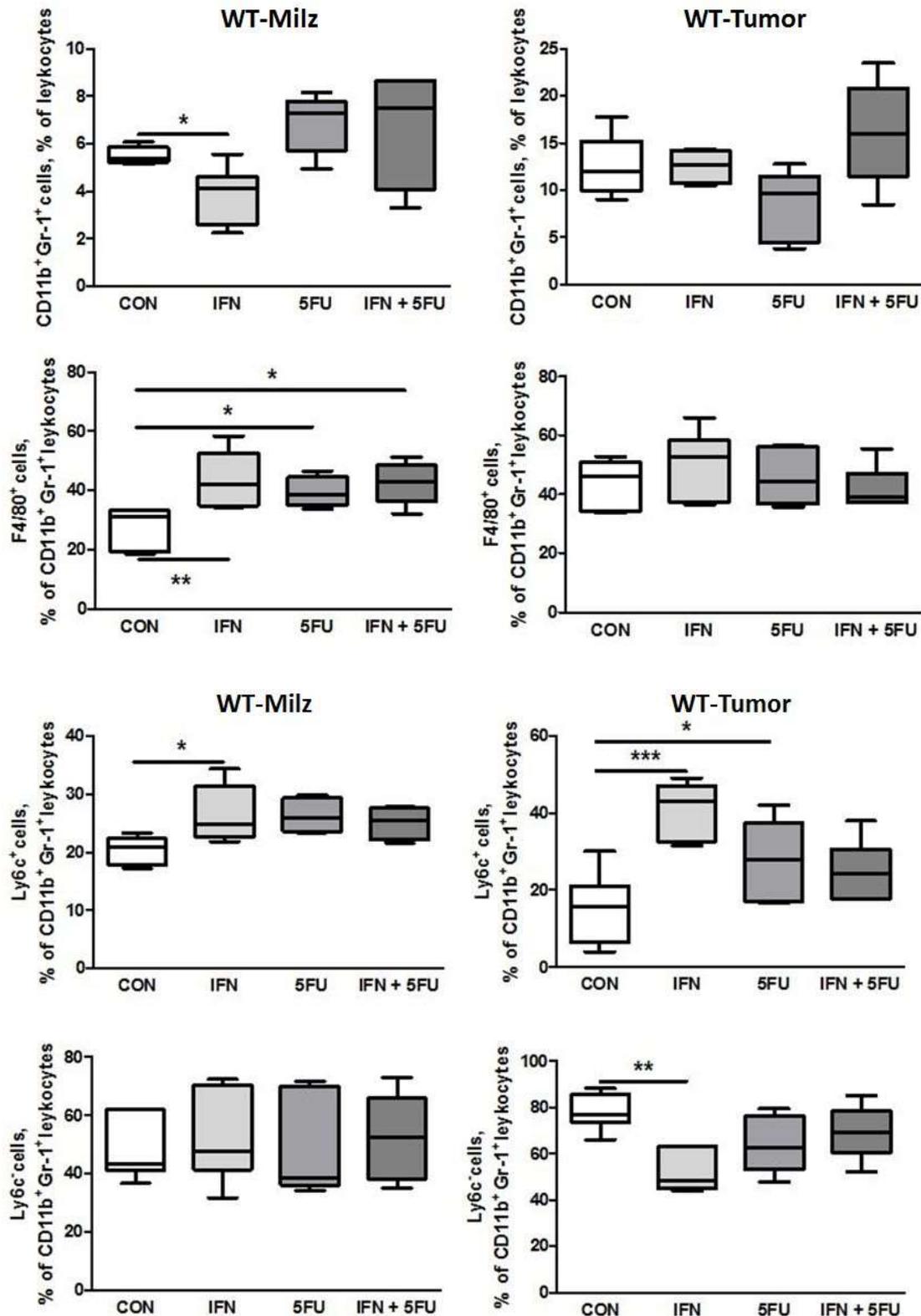


Abbildung 10: Anteile der MDSC, F4/80⁺-MDSC, granulozytären und monozytären MDSC in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und INF+5FU therapierten WT-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=6-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

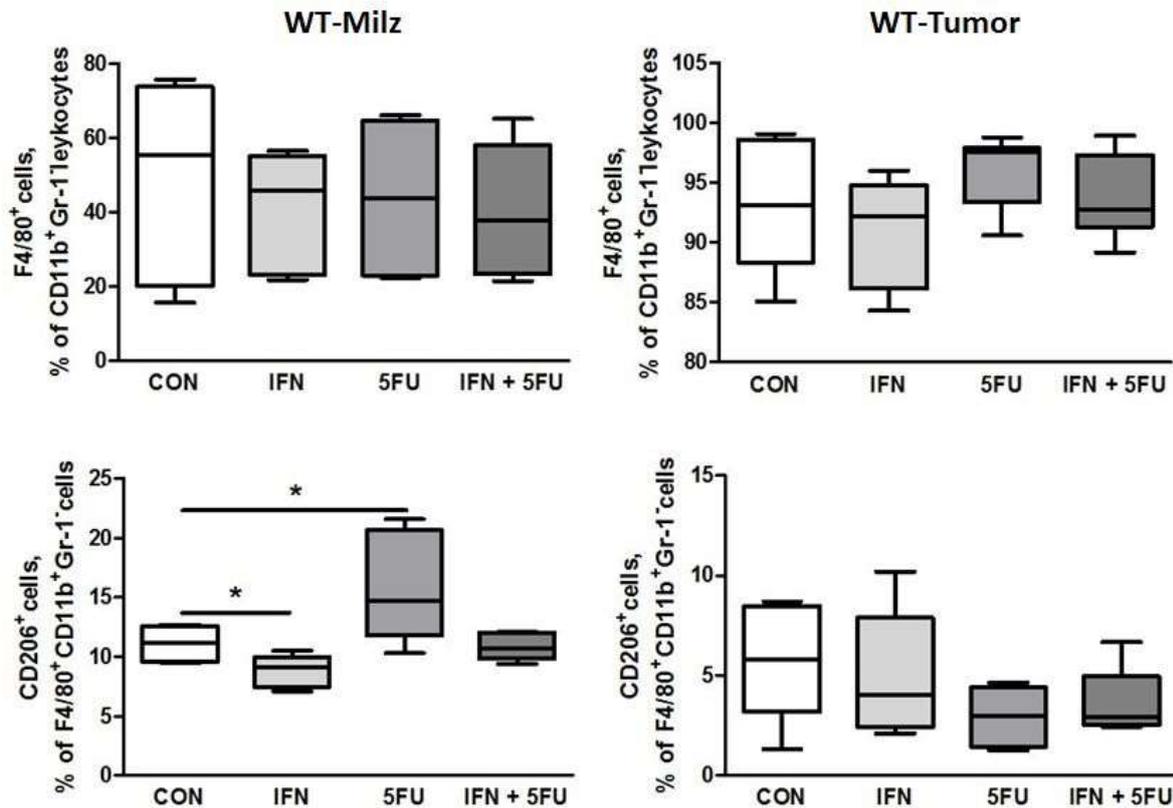


Abbildung 11: Anteile der Makrophagen (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-Leukozyten) und CD206⁺-Makrophagen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten WT-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=6-9); * - P < 0,05.

Tabelle 18: Zusammenfassende Veränderungen der Immunzellexpression in tumortragenden WT-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe

Therapie	↑ WT-Milz	↓ WT-Milz	↑ WT-Tumor	↓ WT-Tumor
IFN	CD3 ⁺ -T-Zellen F4/80 ⁺ -MDSC Ly6C ⁺ -MDSC	MDSC CD206 ⁺ - Makrophagen	cmT-CD4 ⁺ - Zellen T _{Conv} Ly6C ⁺ -MDSC	emT-CD4 ⁺ - Zellen
5FU	cmT-CD4 ⁺ - naive CD8 ⁺ -T-Zellen B-Zellen F4/80 ⁺ -MDSC CD206 ⁺ - Makrophagen		Ly6C ⁺ -MDSC	B-Zellen Ly6C ⁻ -MDSC
IFN+5FU	cmT-CD4 ⁺ - naive CD8 ⁺ -T-Zellen B-Zellen F4/80 ⁺ -MDSC	emT-CD4 ⁺ - Zellen		

Dargestellt sind die signifikant erhöhten oder verringerten Zellpopulationen dieses Ergebnisteils im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.1.2 In-vivo-Untersuchung der Immunzellexpression in Milzen und Tumoren tumortragender KO-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

Die in der Abbildung 12 dargestellten Anteile der Leukozyten an den Splenozyten, der CD3⁺-Leukozyten an der Gesamtheit der Leukozyten sowie die Anteile der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen an den CD3⁺-Leukozyten in Milzen und Tumoren aus KO-Mäusen zeigten folgende signifikante Veränderungen: In KO-Milzen war der Anteil an Leukozyten unter Therapie mit IFN signifikant verringert. Die Anteile der CD3⁺-Leukozyten, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zeigten keine signifikanten Veränderungen. In KO-Tumoren waren die Leukozyten ebenfalls unter Therapie mit IFN signifikant verringert. Gleiches galt auch für den Anteil an CD4⁺-T-Zellen. Der Anteil an CD3⁺-Leukozyten und CD8⁺-T-Zellen war nicht signifikant verändert.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen die Anteile der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen an der jeweiligen Gesamtheit der CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren aus KO-Mäusen. Dabei zeigte sich in KO-Milzen eine signifikante Verringerung der naiven CD4⁺-T-Zellen unter Therapie mit 5FU. Signifikant steigende Anteile zeigten hingegen cmT-CD4⁺-Zellen in der 5FU- und IFN+5FU-Therapiegruppe. Die Anteile der emT-CD4⁺-Zellen sowie die der CD8⁺-T-Zellsubpopulationen waren in KO-Milzen nicht signifikant verändert.

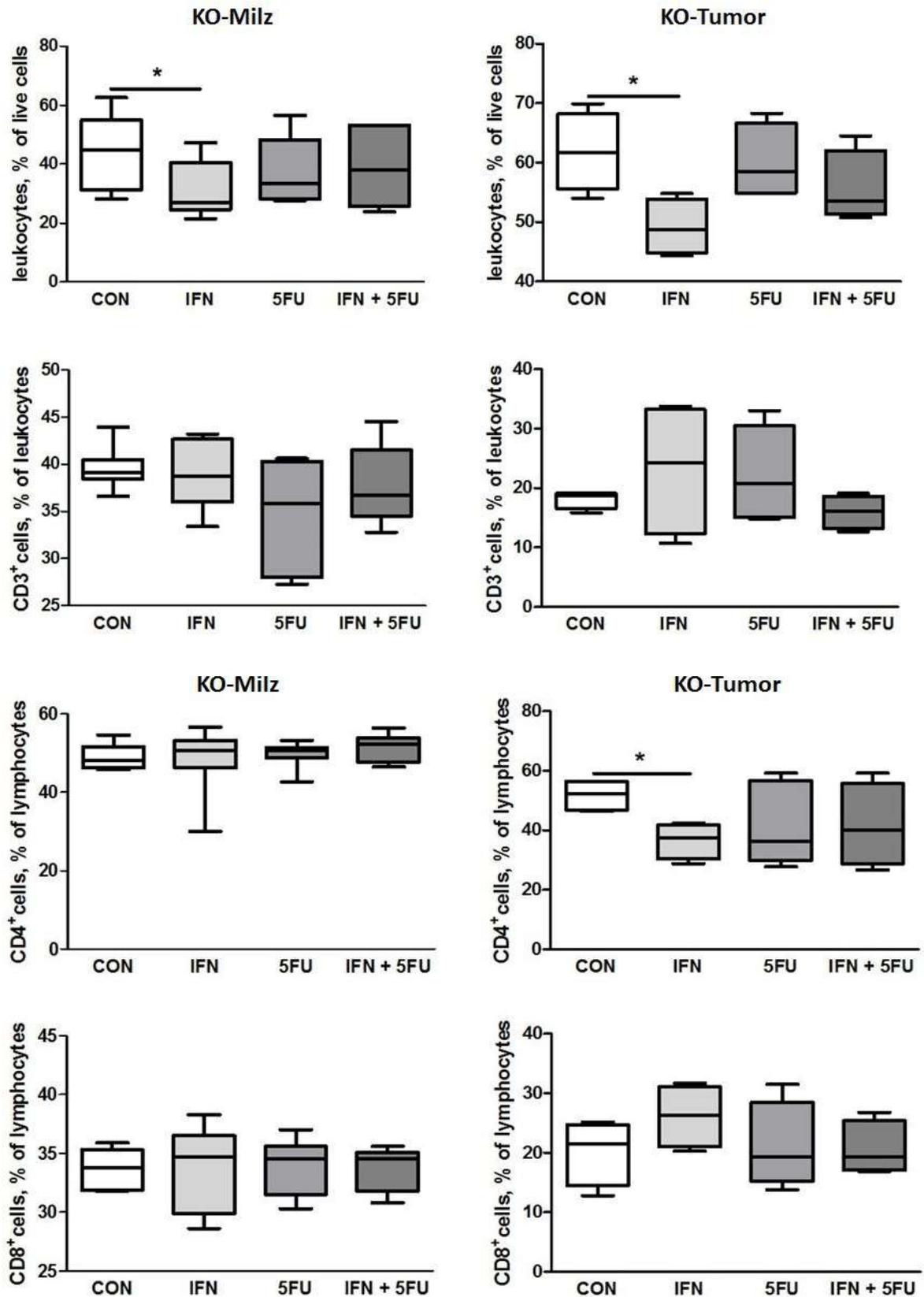


Abbildung 12: Anteile an Leukozyten, Lymphozyten (CD3⁺), CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=7-10); * - P < 0,05.

In KO-Tumoren bewirkte die Therapie mit IFN eine signifikante Steigerung der Anteile der emT-CD4⁺ sowie eine signifikante Abnahme der Anteile der cmT-CD4⁺ und der naiven CD8⁺-T-Zellen. Der Anteil der naiven CD4⁺, emT-CD8⁺ und cmT-CD8⁺-Zellen war in KO-Tumoren durch die Behandlungen nicht signifikant verändert.

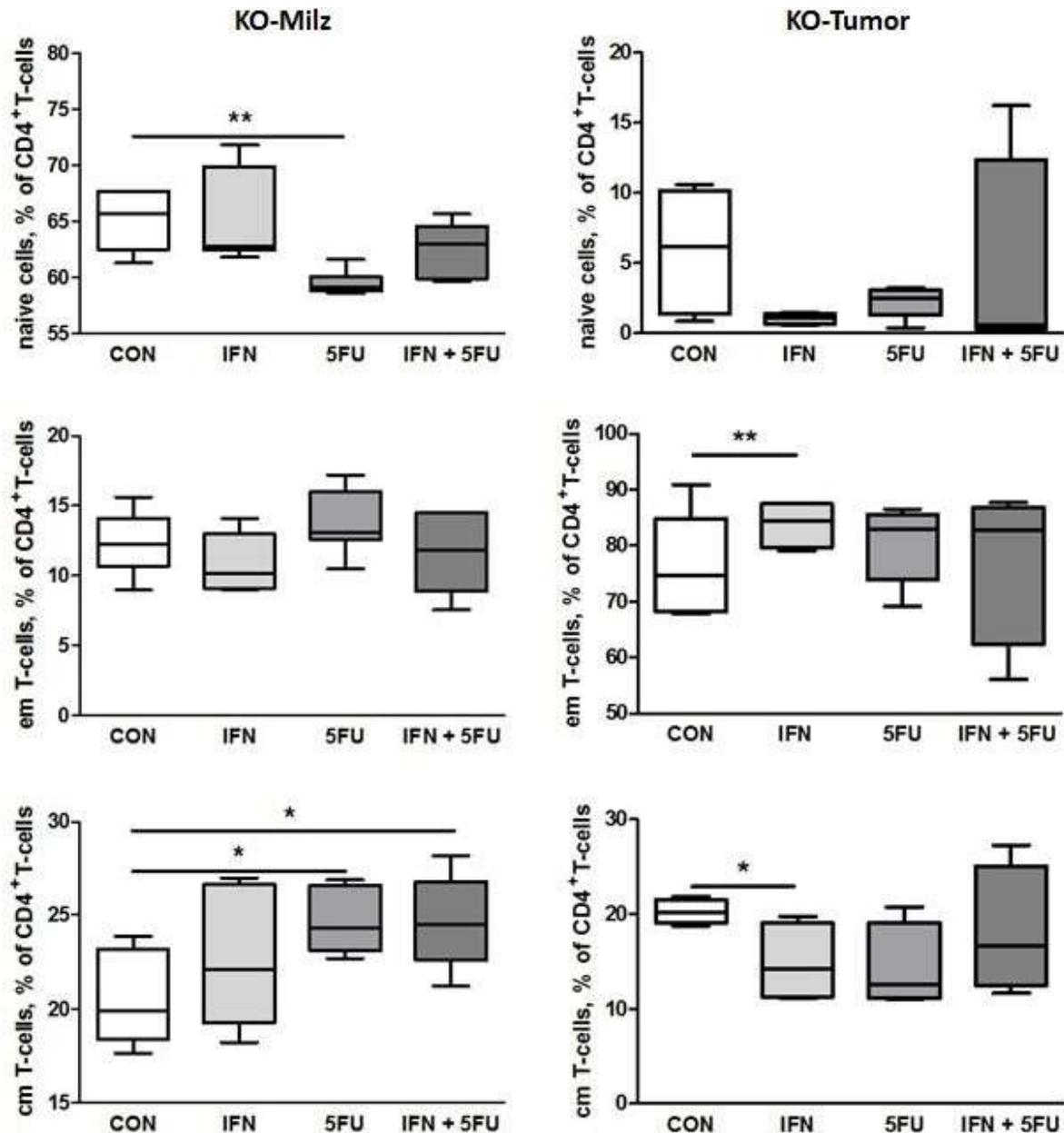


Abbildung 13: Anteile der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD4⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=7-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

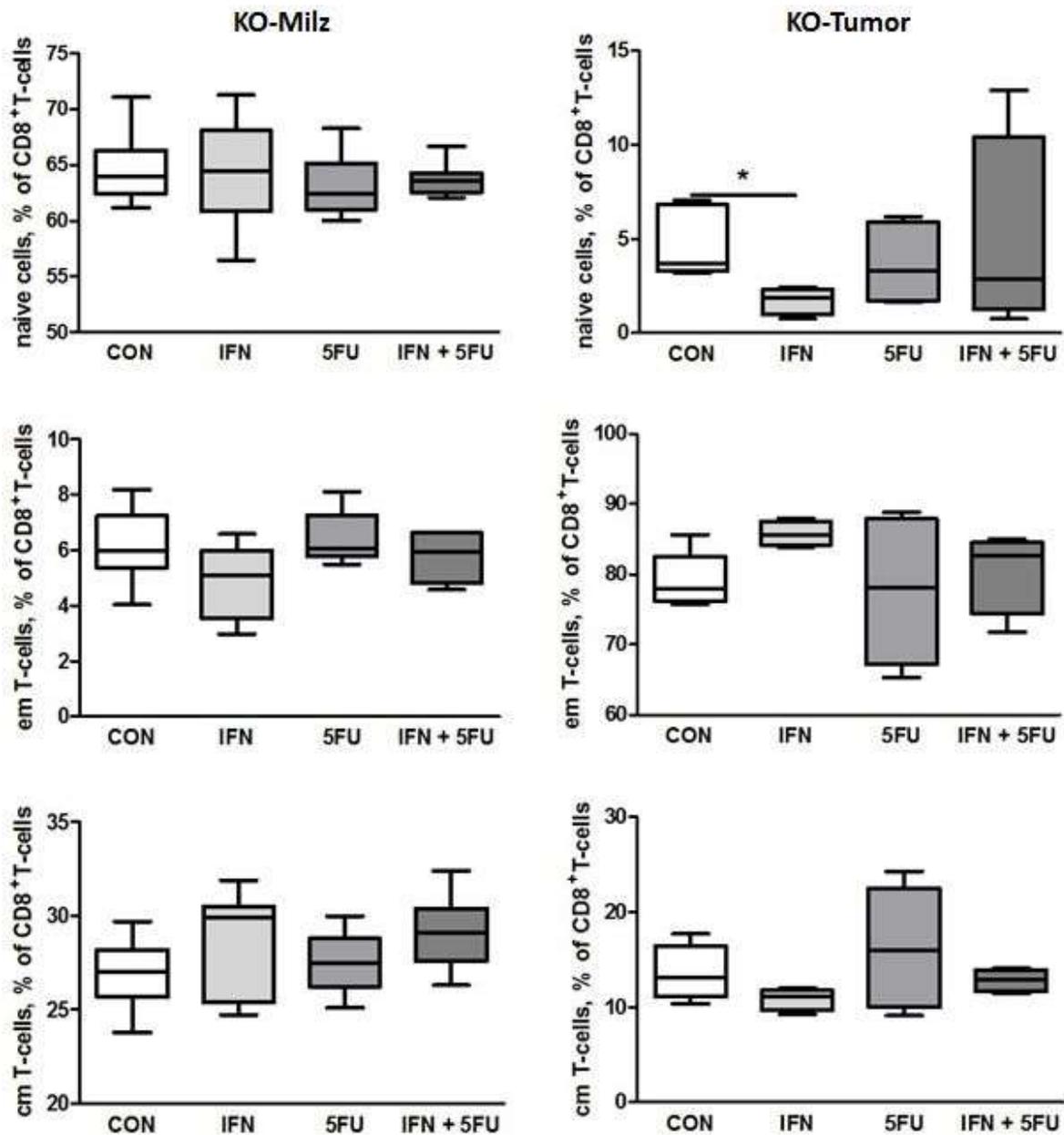


Abbildung 14: Anteile an CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD8⁺-T-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=7-9); * - P < 0,05.

Insgesamt zeigte ausschließlich die Therapie mit IFN einen Einfluss auf die Zellexpression einiger CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulationen. Hinsichtlich der Expression von Leukozyten senkte die Therapie mit IFN diese signifikant in KO-Milzen und Tumoren. Die Therapien mit 5FU und IFN+5FU zeigten unterschiedliche Effekte auf die Anteile der CD4⁺-T-Zellsubpopulationen an der Gesamtheit der CD4⁺-T-Zellen.

Die in Abbildung 15 dargestellten Anteile der T_{Reg} , T_{Conv} und B-Zellen zeigten in KO-Milzen unter der Therapie mit IFN+5FU sowie IFN eine signifikante Abnahme des Anteils an B-Zellen. Die Konzentrationen an T_{Reg} und T_{Conv} zeigten keine signifikanten Veränderungen. In KO-Tumoren stieg der Anteil an T_{Reg} unter der Therapie mit 5FU signifikant an. Die Anteile an T_{Conv} und B-Zellen waren nicht signifikant verändert.

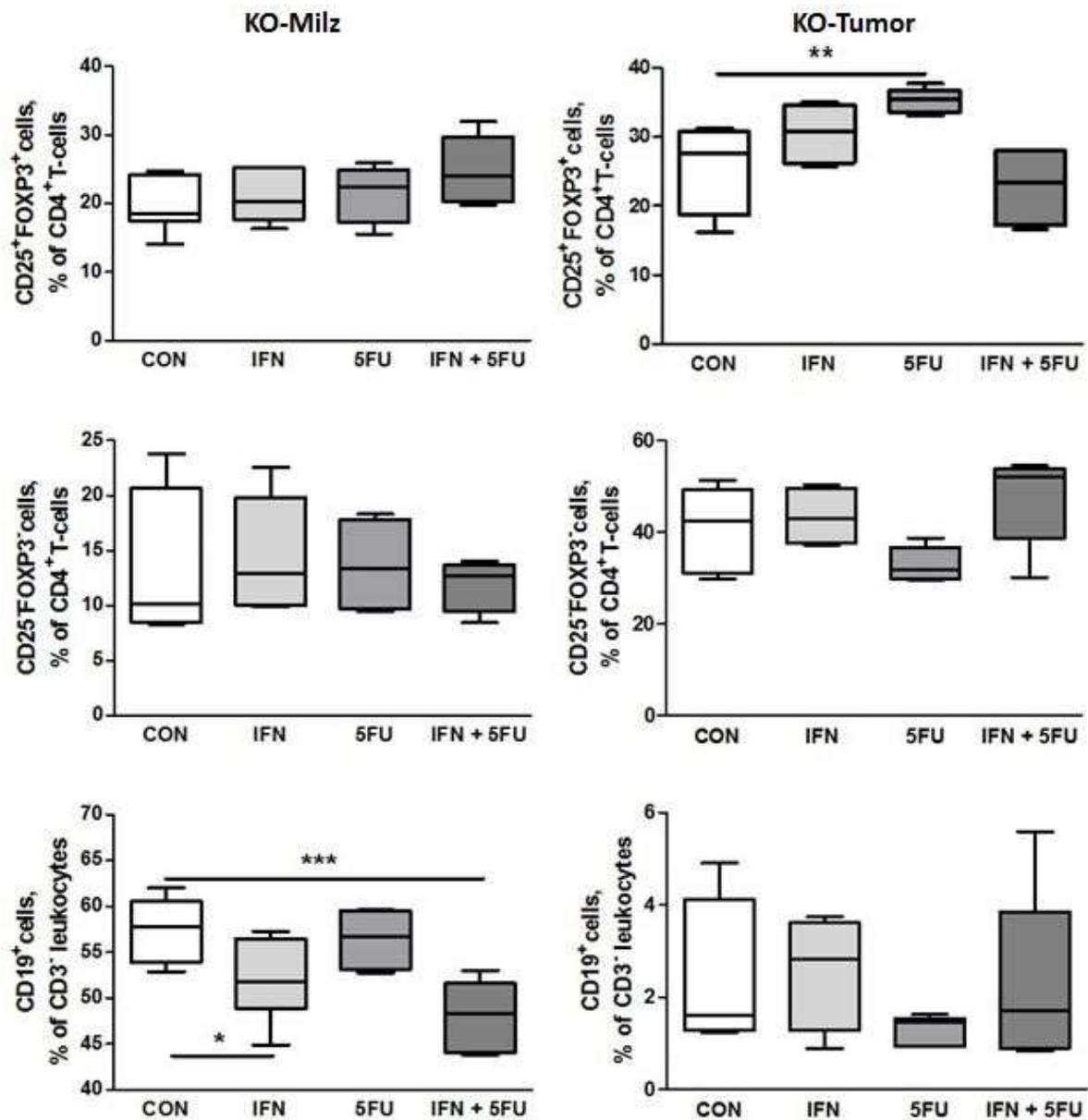


Abbildung 15: Anteile an T_{Reg} , T_{Conv} und B-Zellen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=4-9); * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$. *** - $P < 0,001$.

Die Abbildung 16 zeigt die Anteile der MDSC an den Leukozyten und deren Subpopulationen an der Gesamtheit der MDSC in Milzen und Tumoren aus KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Dabei erhöhten sich signifikant MDSC unter Therapie mit IFN+5FU in KO-Milzen. F4/80⁺-MDSC hingegen wurden durch Therapie mit IFN signifikant in ihrem Anteil verringert. Granulozytäre und monozytäre MDSC zeigten keinerlei signifikante Veränderungen. In KO-Tumoren zeigten lediglich die Anteile der monozytären MDSC eine signifikante Erhöhung unter Therapie mit IFN.

Die Anteile der Makrophagen an der Gesamtheit der Leukozyten sowie der Anteil der CD206⁺-Makrophagen an den Makrophagen, die in Abbildung 17 dargestellt sind, veränderten sich weder in Milzen noch in Tumoren aus KO-Mäusen signifikant unter dem Einfluss der Therapien.

Alle signifikanten Veränderungen in KO-Milzen und Tumoren unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU sind in Tabelle 19 zusammenfassend dargestellt. Es zeigten sich in der Gesamtbetrachtung keinerlei signifikanten Veränderungen in KO-Tumoren bei Therapie mit IFN+5FU. Die Therapie mit IFN zeigte im Vergleich zur Therapie mit 5FU vermehrt signifikante Veränderungen in einer großen Anzahl an Zellpopulationen, besonders am Anteil der Leukozyten, CD4⁺-T-Zell- und MDSC-Subpopulationen. Keine der drei Therapien zeigte signifikante Veränderungen bezüglich der Makrophagenpopulationen. Die Therapie mit IFN senkte in KO-Milzen und Tumoren signifikant den Anteil an Leukozyten. Es konnten keine gegenläufigen Veränderungen der Immunzellexpressionen in KO-Milzen und Tumoren festgestellt werden, die eine Zellwanderung vermuten lassen könnten.

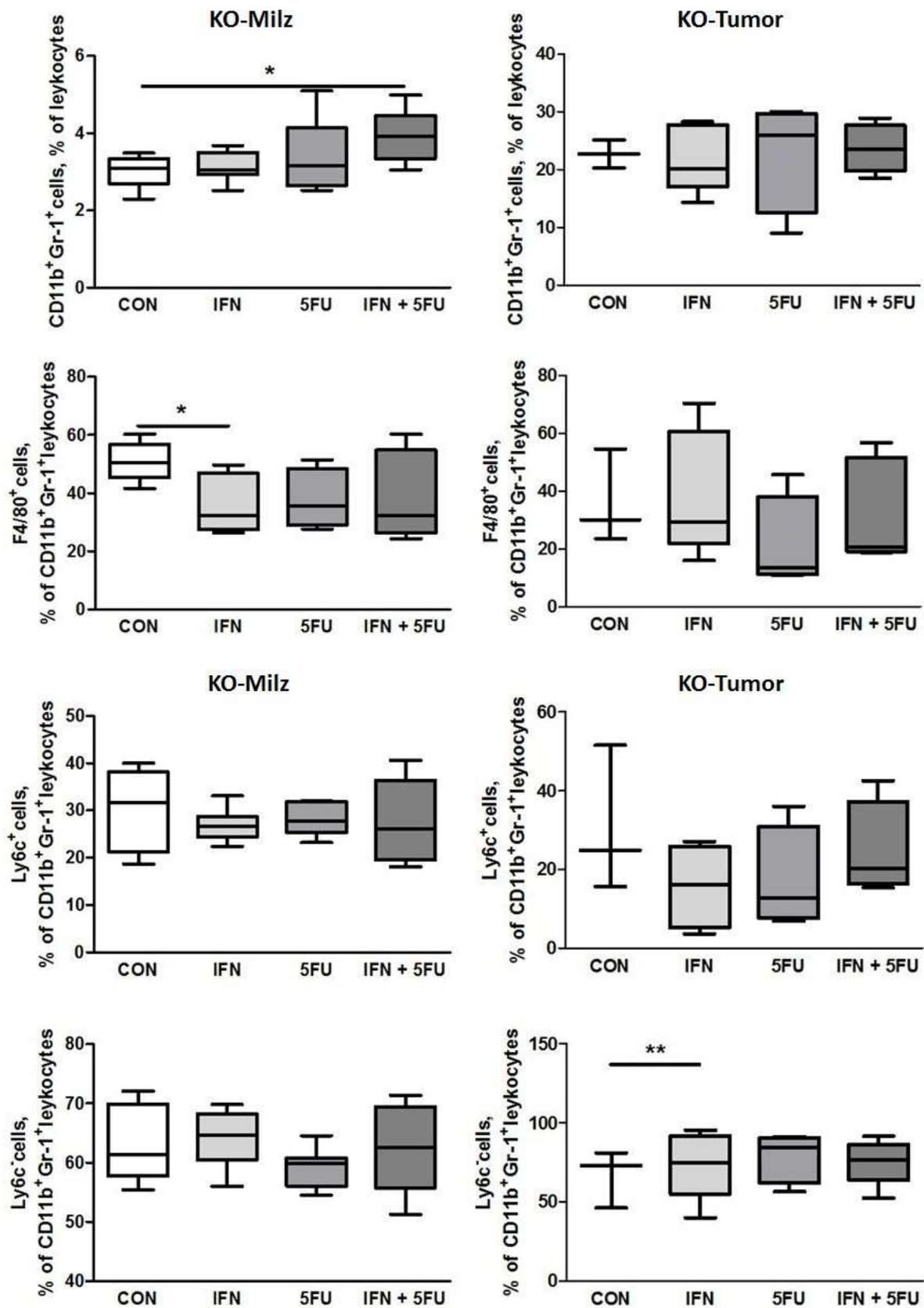


Abbildung 16: Anteile an MDSC, F4/80⁺-MDSC, granulozytären und monozytären MDSC in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=3-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

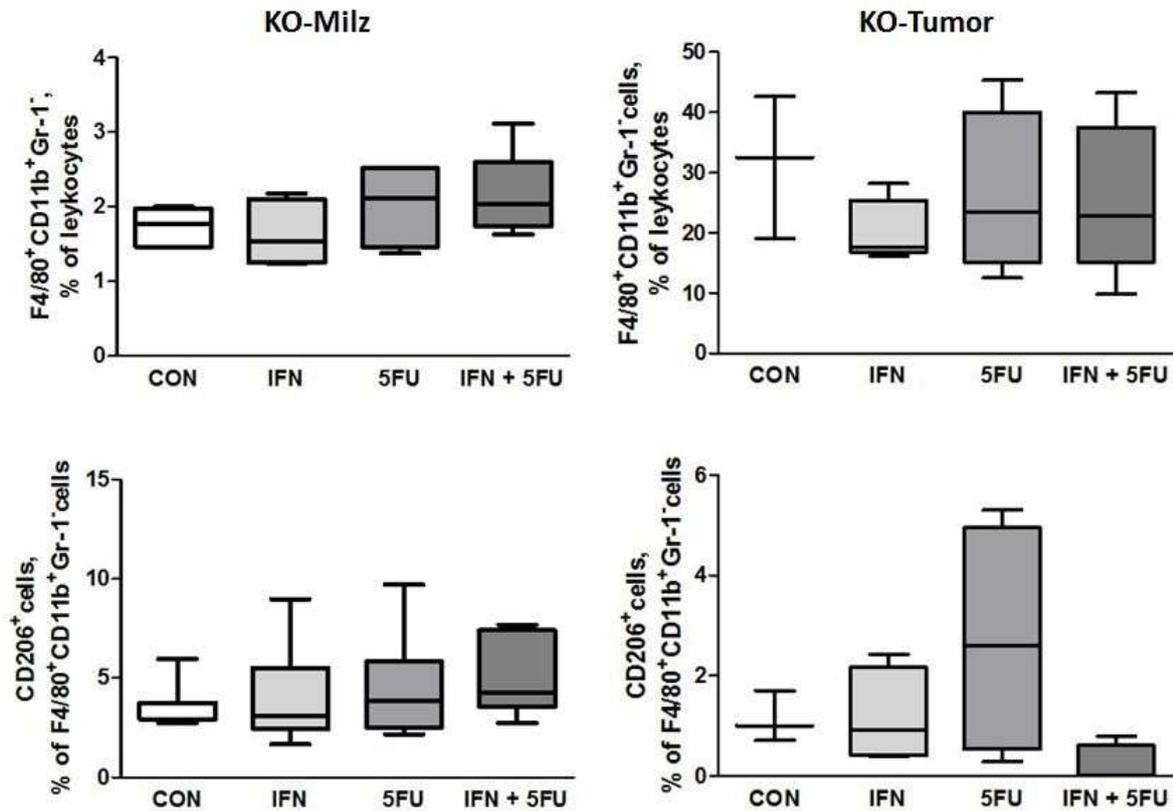


Abbildung 17: Anteile an Makrophagen und CD206⁺-Makrophagen in Milzen und Tumoren von mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten KO-Mäusen. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=3-9).

Tabelle 19: Zusammenfassende Veränderungen der Immunzellexpression in tumortragenden KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe

Therapie	↑ KO-Milz	↓ KO-Milz	↑ KO-Tumor	↓ KO-Tumor
IFN		Leukozyten B-Zellen F4/80 ⁺ -MDSC	emT-CD4 ⁺ - Zellen Ly6C ⁺ -MDSC	Leukozyten CD4 ⁺ - cmT-CD4 ⁺ - naive CD8 ⁺ -T- Zellen
5FU	cmT-CD4 ⁺ -Zellen	Naive CD4 ⁺ -T- Zellen	T _{Rag}	
IFN+5FU	cmT-CD4 ⁺ -Zellen MDSC	B-Zellen		

Dargestellt sind die signifikant erhöhten oder verringerten Zellpopulationen dieses Ergebnisteils im Vergleich zur Kontrollgruppe

3.1.3 Vergleich der in vivo untersuchten Immunzellexpression in Milzen und Tumoren tumortragender WT- und KO-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

Nachfolgend wurden die Ergebnisse aus 3.1.1 und 3.1.2 mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (two-way ANOVA) ausgewertet, um zeitgleich den Einfluss des Maustyp (WT-, KO-Maus), der Therapie (IFN, 5FU, IFN+5FU) sowie deren Interaktion auf die Immunzellexpression auszuwerten. Insbesondere sollte hierbei der Einfluss der Mauslinie herausgestellt werden. Für den Einfluss der Therapien wird auf die Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 verwiesen. Wie zuvor beschrieben war der Stichprobenumfang durch geringe Mauszahlen (KO-Mäuse) sowie geringes Tumorwachstum unter Einfluss der Therapien und daraus resultierend niedrigere Zellzahlen limitiert.

In Abbildung 18 konnte ein signifikanter Einfluss der Therapien (Therapieeffekt, T) auf die CD3⁺-T-Zellexpression in Milzen dargestellt werden. Im Hinblick auf den Anteil der CD8⁺-T-Zellsubpopulation konnte wiederum ein Mauseffekt (M) gezeigt werden. Hierbei war der Anteil in KO-Mäusen unabhängig von der Therapie stets höher. In Bezug auf die Anteile an CD4⁺-T-Zellen konnten keine Effekte festgestellt werden.

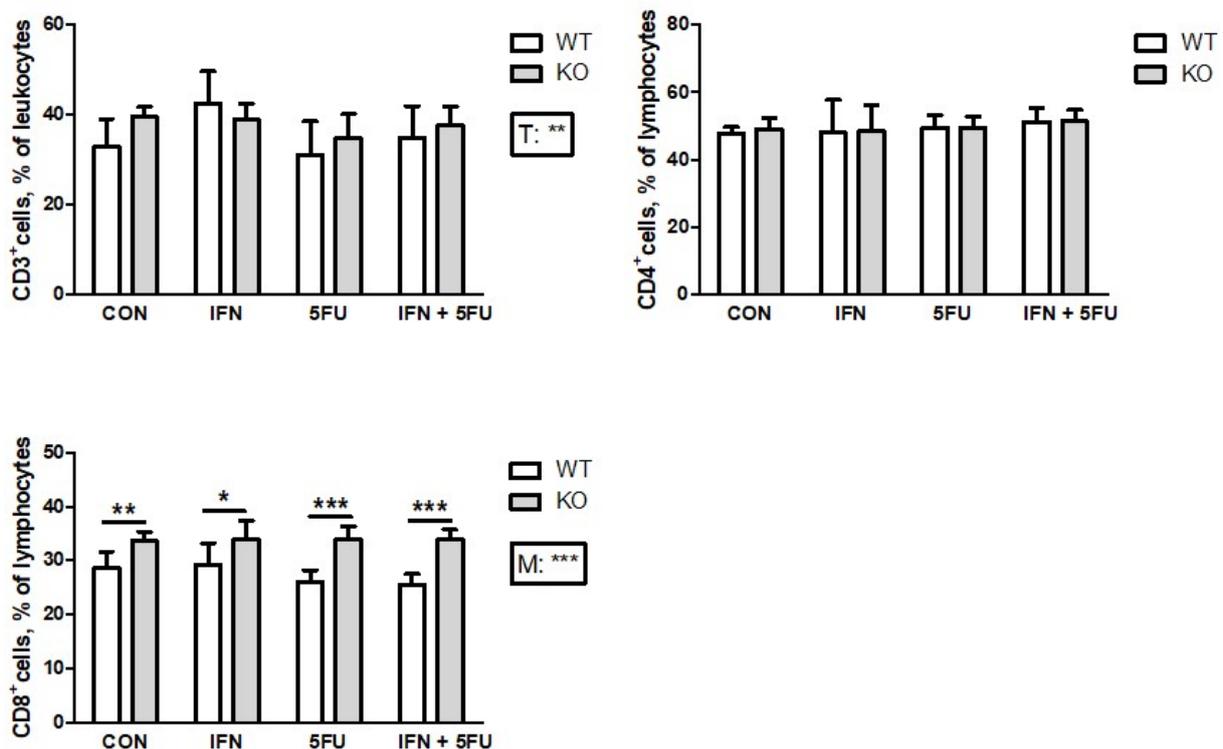


Abbildung 18: Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD3⁺-Lymphozyten, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=5-10); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

Ergebnisse

Betrachtet man die Expression der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen in Milzen tumortragender WT- und KO-Mäuse (Abbildung 19), waren signifikant höhere Anteile an effT-CD4⁺-Zellen unabhängig von der jeweiligen Therapie in WT-Mäusen vorhanden. Es zeigten sich hier ein signifikanter Maus- und Therapieeffekt sowie eine Interaktion zwischen diesen beiden Faktoren (M×T). Bei Betrachtung der naiven CD4⁺-T-Zellen konnte eine signifikant verringerte Zellexpression in WT-Mäusen unter Behandlung mit IFN sowie eine Wechselwirkung zwischen Therapie und Maustypen dargestellt werden. Im Hinblick auf den Anteil der emT-CD4⁺- sowie cmT-CD4⁺-Zellen zeigten sich ein Maus- und ein Therapieeffekt mit signifikant höheren Anteilen an emT-CD4⁺-Zellen in WT-Mäusen und cmT-CD4⁺-Zellen in KO-Mäusen.

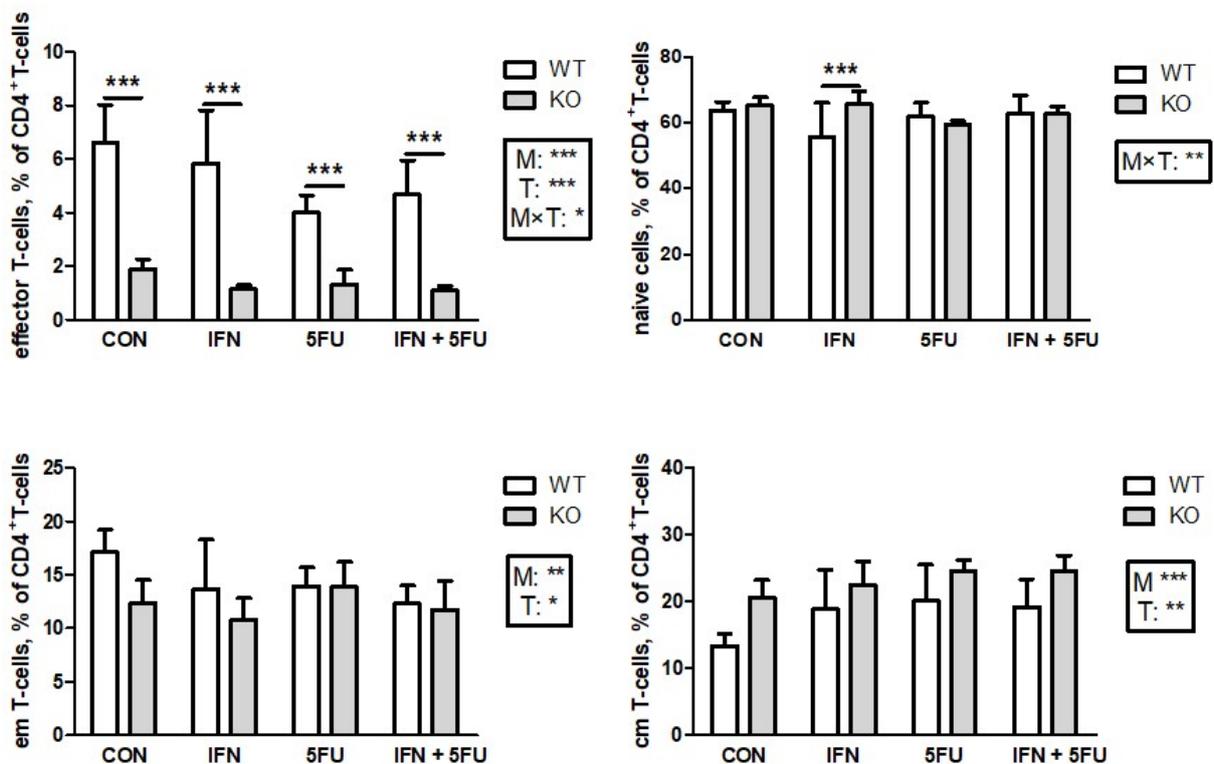


Abbildung 19: Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen an gesamten CD4⁺-T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=5-9); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, M×T – Interaktion, *** - P < 0,001.

Die Abbildung 20 zeigt die Expression von CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen in Milzen tumortragender WT- und KO-Mäusen. Hier bestanden ein Mauseffekt, ein Therapieeffekt sowie eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren, die sich durch signifikant höhere Expression von effT-CD8⁺-Zellen in WT-Mäusen in der Kontrollgruppe sowie unter Einfluss der Therapie mit

IFN und IFN+5FU als in KO-Mäusen zeigte. In naiven CD8⁺-T-Zellen bestand ein signifikanter Mauseffekt sowie eine Wechselwirkung zwischen Therapie und Maustypen. Hier zeigten sich die Anteile an naiven CD8⁺-T-Zellen unabhängig von der gewählten Therapie in WT-Mäusen signifikant höher als in KO-Mäusen. Die Expression der cmT-CD8⁺-Zellen zeigte sich wiederum in KO-Mäusen unabhängig der Therapie signifikant erhöht, was auf einen Mauseffekt schließen ließ. EmT-CD8⁺-Zellen waren signifikant in Milzen tumortragender WT-Mäuse unter Einfluss der Therapie mit 5FU verringert und zeigten einen Mauseffekt sowie auch eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren.

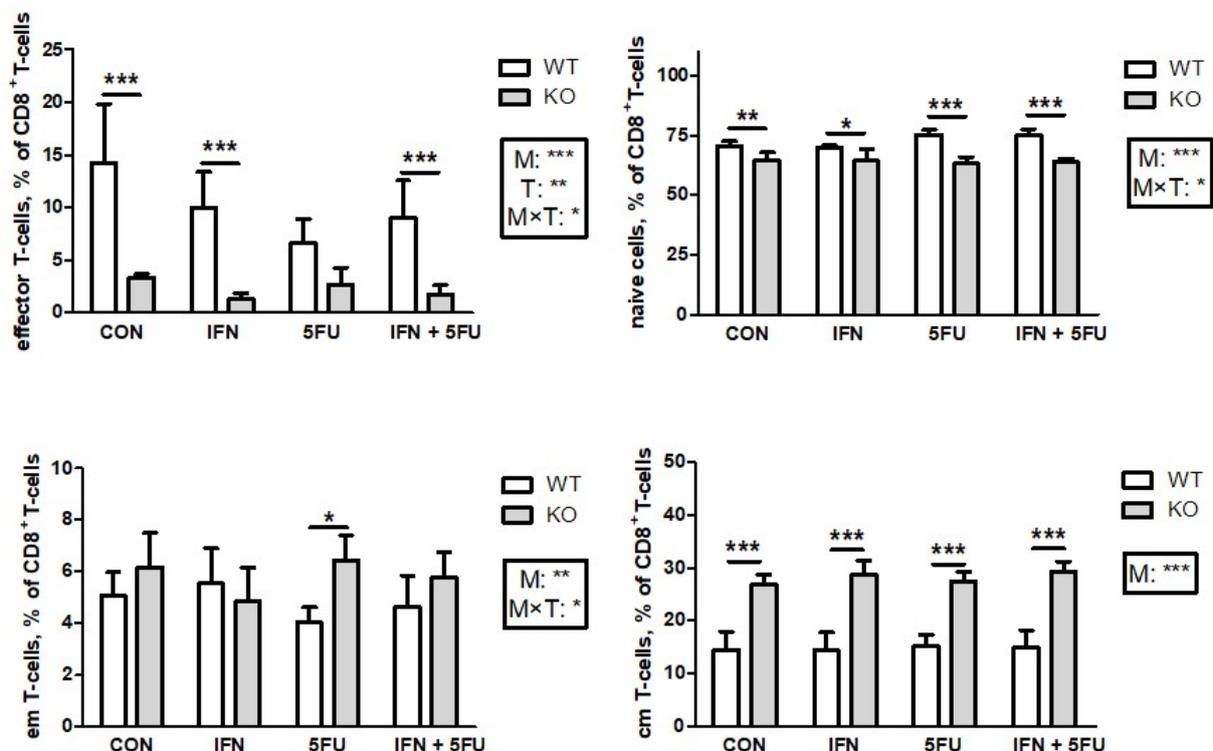


Abbildung 20: Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen an gesamten CD8⁺-T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=4-9); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, M×T – Interaktion, * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

Betrachtet man die T_{Reg}-Expression in Milzen zeigte sich ein Mauseffekt mit signifikant höheren Anteilen an T_{Reg}-Zellen in KO-Mäusen (Abbildung 21). Der Anteil an T_{Conv} war wiederum in WT-Mäusen signifikant höher als in KO-Mäusen. Die B-Zellexpression war unter Einfluss der Therapie mit IFN+5FU in Milzen aus tumortragenden WT-Mäusen signifikant höher. Hier

Ergebnisse

bestanden ein signifikanter Maus- und Therapieeffekt sowie eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren.

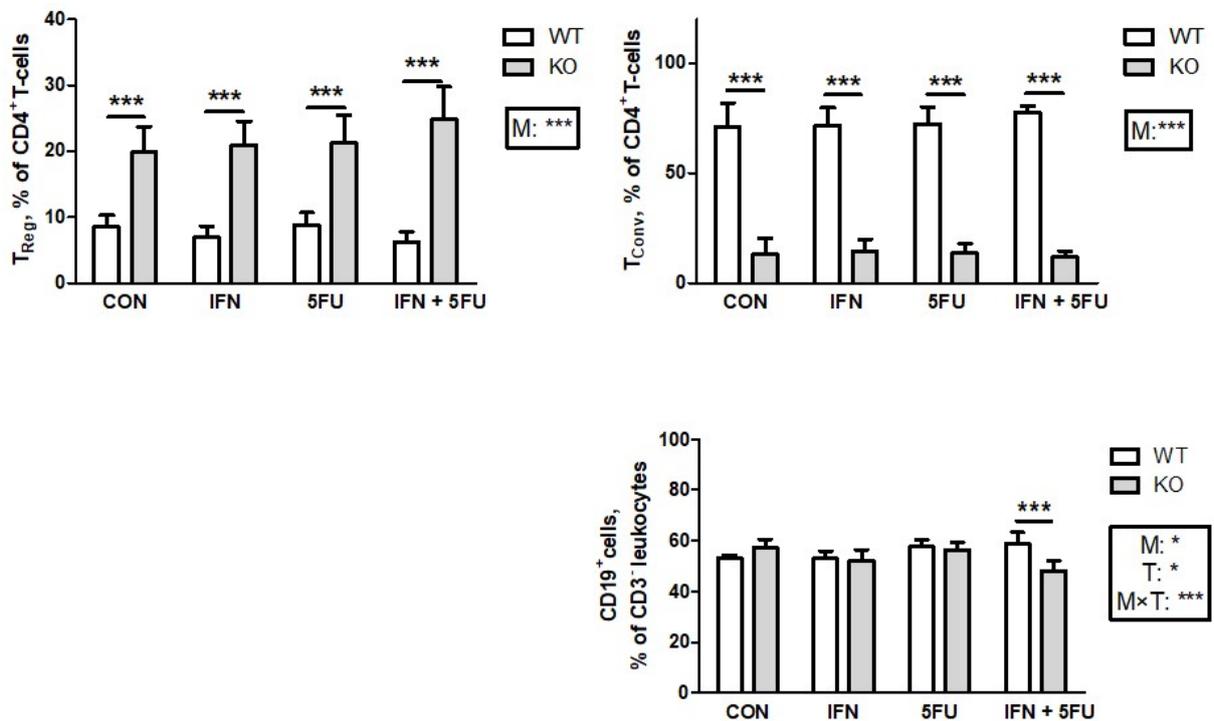


Abbildung 21: Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden T_{Reg}, T_{Conv} und B-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=4-9); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, M×T – Interaktion, *** - P < 0,001.

Abbildung 22 zeigt die Expression von MDSC und Makrophagen samt ihrer Subpopulationen in Milzen. Im Hinblick auf die MDSC-Expression zeigten sich ein Maus- und ein Therapieeffekt sowie eine Wechselwirkung zwischen diesen. Dabei lagen signifikant höhere Anteile in WT-Mäusen unter Einfluss von 5FU, IFN+5FU sowie in der Kontrollgruppe vor. Unabhängig der jeweiligen Therapie (signifikanter Mauseffekt) war die CD206⁺-MDSC-Expression in WT-Milzen ebenfalls signifikant höher als in KO-Mäusen. F4/80⁺-MDSC zeigten in der Kontrollgruppe signifikant niedrigere Anteile in Milzen tumortragender WT- als in KO-Mäusen bei zugleich bestehender Interaktion zwischen Therapie und Maustypen. Bei der monozytären sowie granulozytären MDSC-Expression konnte ein signifikanter Mauseffekt gezeigt werden. Unabhängig von den Therapien waren in WT-Milzen signifikant höhere Anteile an CD206⁺Makrophagen vorhanden mit signifikantem Maus- und Therapieeffekt sowie einer Wechselwirkung zwischen den Faktoren. Die Makrophagen-Expression zeigte keine signifikanten Veränderungen.

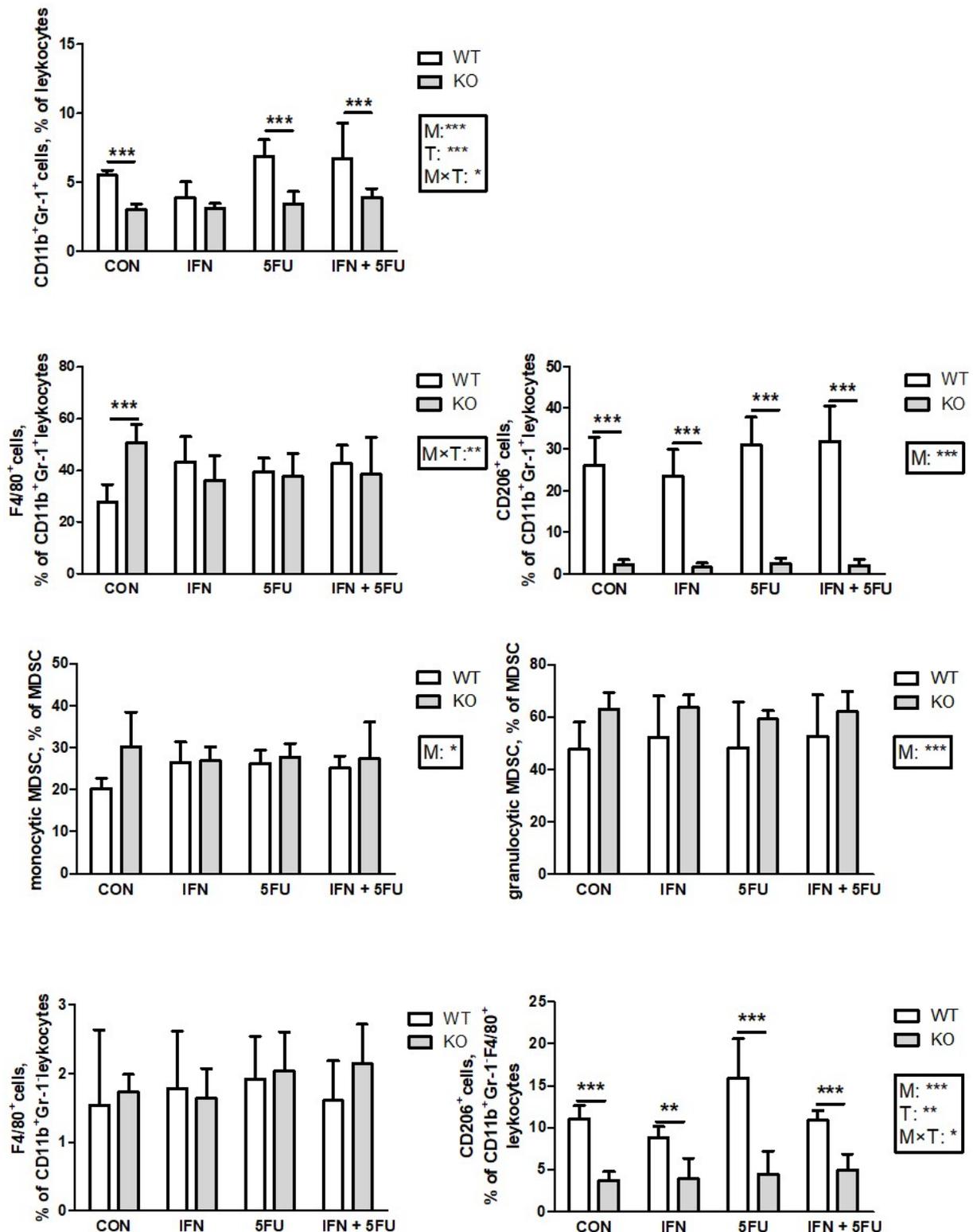


Abbildung 22: Vergleich der in Milzen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen stammenden MDSC, MDSC-Subpopulationen sowie Makrophagen und deren Subpopulation unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=4-9); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, M×T – Interaktion, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

Ergebnisse

Da diese Ergebnisse vorrangig nun den Einfluss des Maustyps sowie die Wechselwirkung zwischen Maustypen und Therapie darstellen sollten, wurden diese in Tabelle 20 noch einmal zusammenfassend im Hinblick auf den Einfluss auf die Immunzellexpression in Milzen dargestellt. Dabei zeigte sich in fast allen Zellpopulationen ein signifikanter Mauseffekt. Ausnahmen waren hierbei CD3⁺-, CD4⁺-, naive CD4⁺-T-Zellen sowie F4/80⁺-MDSC und Makrophagen. Alle CD8⁺-T-Zellsubpopulationen zeigten einen signifikanten Mauseffekt. Hierbei waren naive CD8⁺-T-Zellen signifikant in WT-Mäusen unabhängig von der Therapie erhöht und CD8⁺- und cmT-CD8⁺-Zellen in KO-Mäusen erhöht. Interaktionen konnten in der effT-CD4⁺-, naiven CD4⁺-T-, effT-CD8⁺-, naiven CD8⁺-T- und emT-CD8⁺-Zellen sowie in B-Zellen, MDSC, F4/80⁺-MDSC und CD206⁺-Makrophagen gezeigt werden.

Tabelle 20: Zusammenfassende Darstellung der Mauseffekte sowie Wechselwirkungen von Maustypen und Therapie im Hinblick auf die Immunzellexpression in Milzen aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU in vivo therapierten bzw. nicht therapierten (CON), tumortragenden WT- und KO-Mäusen

Faktor	Zellpopulation
Mauseffekt (M) WT > KO	effT-CD4 ⁺ -Zellen emT-CD4 ⁺ -Zellen effT-CD8 ⁺ -Zellen naive CD8 ⁺ -T-Zellen T _{Conv} B-Zellen MDSC CD206 ⁺ -MDSC CD206 ⁺ -Makrophagen
KO > WT	CD8 ⁺ -T-Zellen cmT-CD4 ⁺ -Zellen emT-CD8 ⁺ -Zellen cmT-CD8 ⁺ -Zellen T _{Reg} Ly6C ⁺ -MDSC Ly6C ⁻ -MDSC
Wechselwirkung (M x T)	
CON	effT-CD4 ⁺ -Zellen effT-CD8 ⁺ -Zellen

	naive CD8 ⁺ -T-Zellen MDSC F4/80 ⁺ -MDSC CD206 ⁺ -Makrophagen
IFN	effT-CD4 ⁺ -Zellen naive CD4 ⁺ -T-Zellen effT-CD8 ⁺ -Zellen naive CD8 ⁺ -T-Zellen CD206 ⁺ -Makrophagen
5FU	effT-CD4 ⁺ -Zellen effT-CD8 ⁺ -Zellen naive CD8 ⁺ -T-Zellen emT-CD8 ⁺ -Zellen MDSC CD206 ⁺ -Makrophagen
IFN+5FU	effT-CD4 ⁺ -Zellen effT-CD8 ⁺ -Zellen naive CD8 ⁺ -T-Zellen B-Zellen MDSC CD206 ⁺ -Makrophagen

Die Expression der CD3⁺-, CD4⁺ und CD8⁺-T-Zellen in Tumoren aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN und/oder 5FU ist in Abbildung 23 dargestellt. Es zeigte sich bei allen Populationen ein signifikanter Mauseffekt mit höheren Anteilen an CD3⁺-Zellen in WT-Mäusen und CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in KO-Mäusen.

Bei Betrachtung der CD4⁺- sowie der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen (Abbildung 24) zeigten sich lediglich in der emT- und cmT-CD4⁺-Zellexpression eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Maustypen und der Therapie. Dabei war der Anteil an emT-CD4⁺-Zellen signifikant in WT-Mäusen unter Therapie mit IFN verringert. In KO-Mäusen war der Anteil an cmT-CD4⁺-Zellen signifikant in der Kontrollgruppe erhöht.

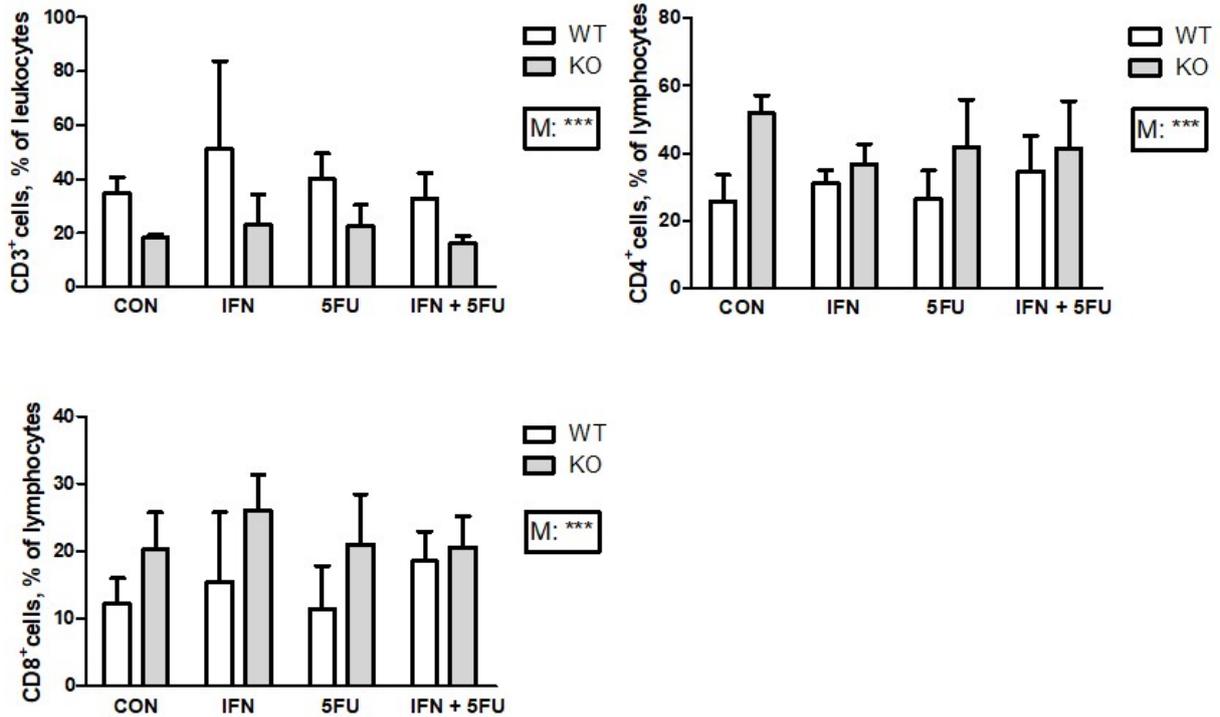
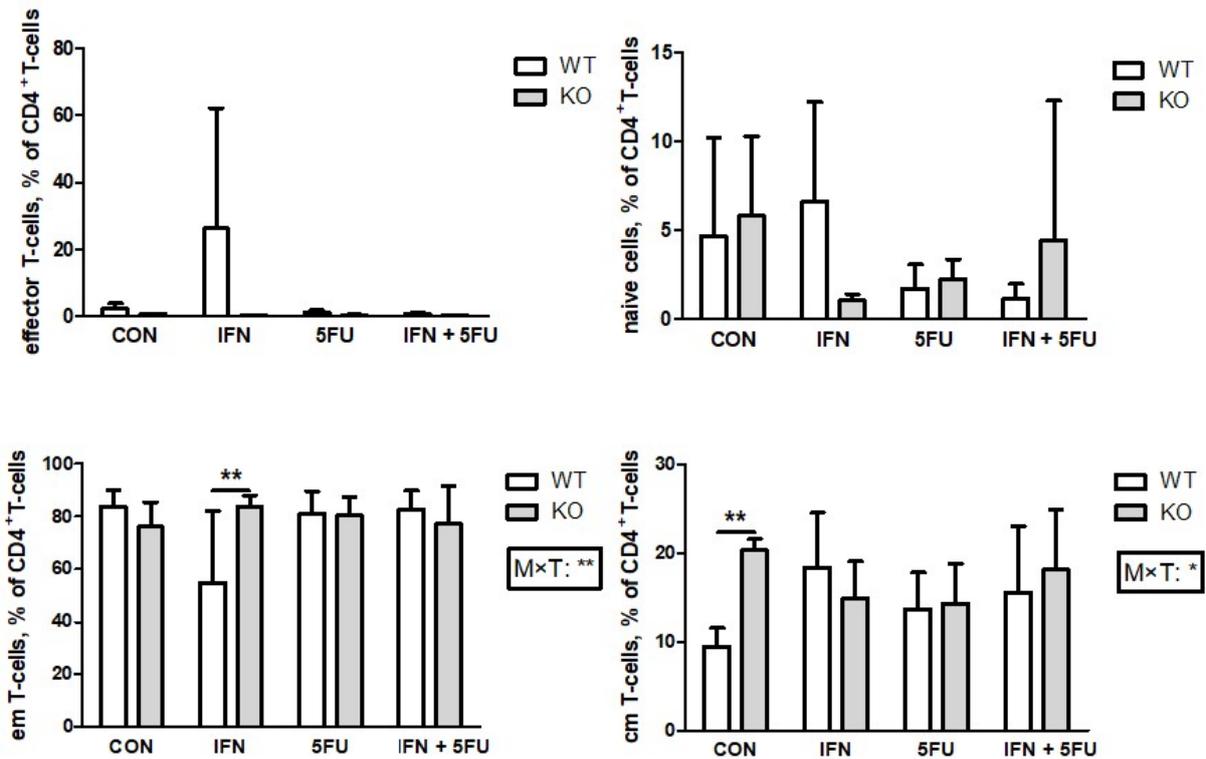


Abbildung 23: Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden T-Lymphozyten, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=4-7); M – Faktor Mauslinie.



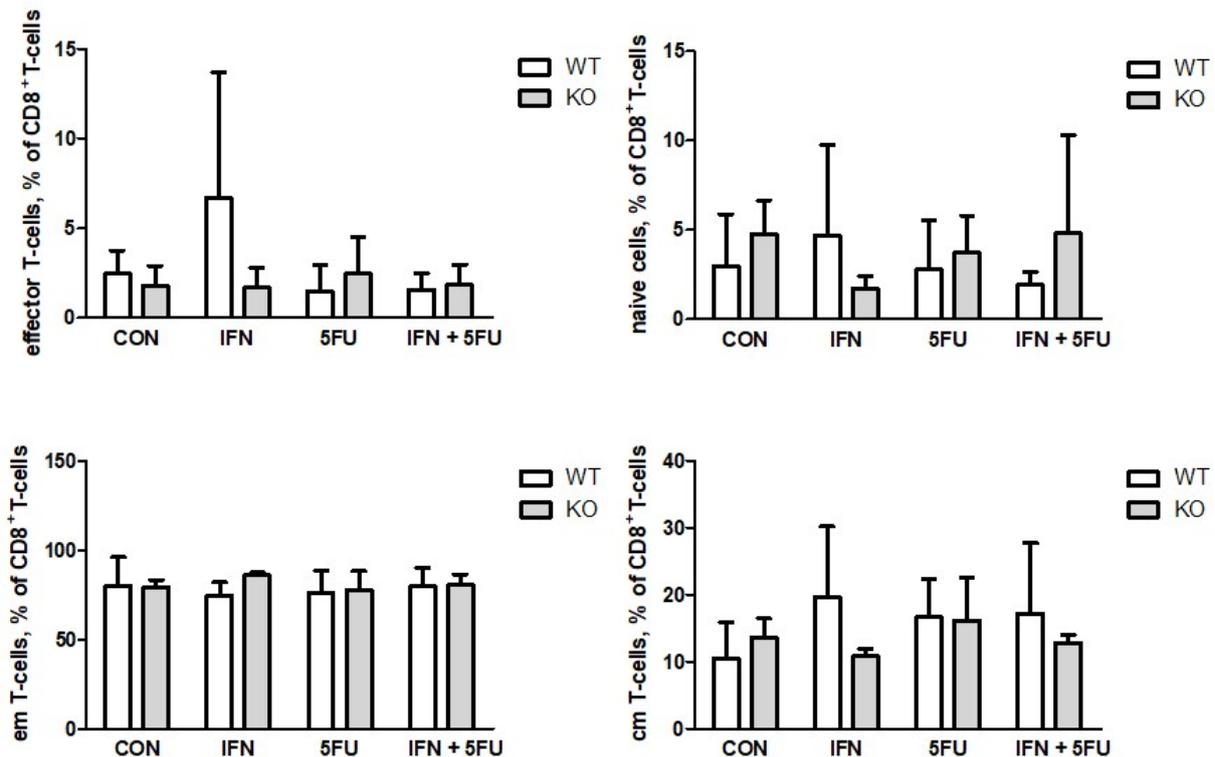


Abbildung 24: Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden Anteile an CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen an den gesamten CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen an gesamten CD8⁺-T-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=4-7); M×T – Interaktion, ** - P < 0,01.

Es zeigte sich ein signifikanter Mauseffekt in der Expression von T_{Reg} und T_{Conv}. Dabei waren die Anteile an T_{Reg} in WT-Mäusen unter Therapie mit IFN+5FU sowie in der Kontrollgruppe signifikant höher als in KO-Mäusen (Abbildung 25). Umgekehrt verhielt es sich mit den Anteilen an T_{Conv}. Die B-Zell-Expression zeigte keine signifikanten Veränderungen.

Die Zellexpression der MDSC- sowie Makrophagensubpopulationen sind in Abbildung 26 dargestellt. Hier zeigte sich ein signifikanter Mauseffekt in der MDSC-, CD206⁺- sowie F4/80⁺-MDSC-Expression. Der Anteil an MDSC war hierbei in KO-Mäusen und die Anteile an CD206⁺- und F4/80⁺-MDSC in WT-Mäusen erhöht. Im Hinblick auf die monozytäre-MDSC-Expression bestand eine Wechselwirkung zwischen dem Maustypen und der Therapie; die Expression zeigte sich signifikant unter Therapie mit IFN in WT-Mäusen erhöht. Die Makrophagen-Expression zeigte einen Maus- und Therapieeffekt sowie eine Interaktion zwischen den Faktoren und war in der Kontrollgruppe der WT-Mäuse sowie unter Therapie mit 5FU signifikant erhöht. Bei Betrachtung der Anteile der CD206⁺-Makrophagen zeigte sich ein signifikanter Mauseffekt mit höheren Anteilen in WT-Mäusen.

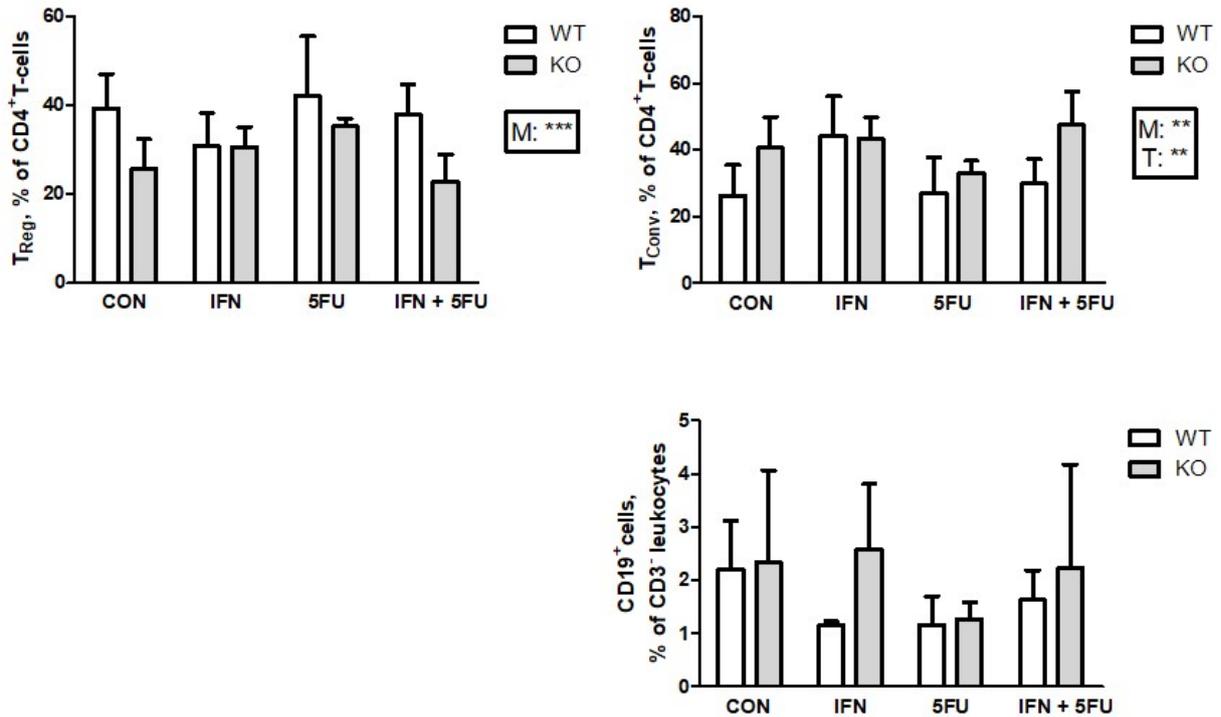
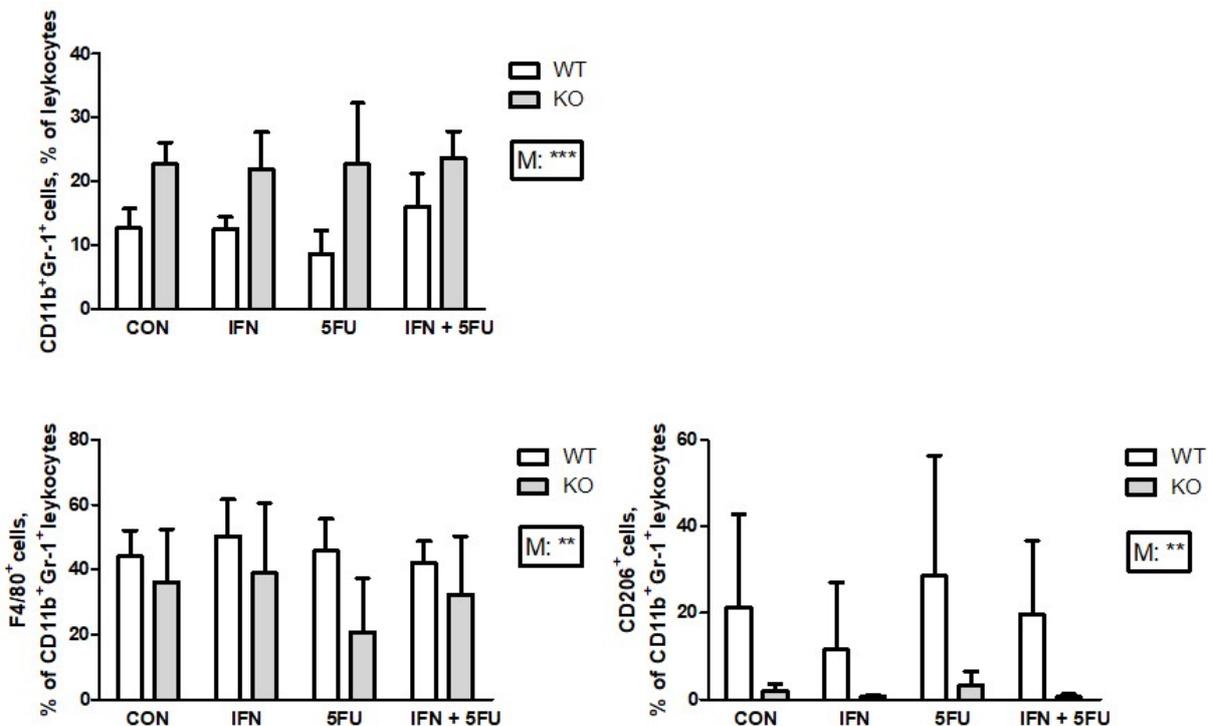


Abbildung 25: Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden T_{Reg}, T_{Conv}, aktivierten T_{Conv} (act T_{Conv}) und B-Zellen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n= 4-8 (n=2 IFN-Gruppe B-Zellen)); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie.



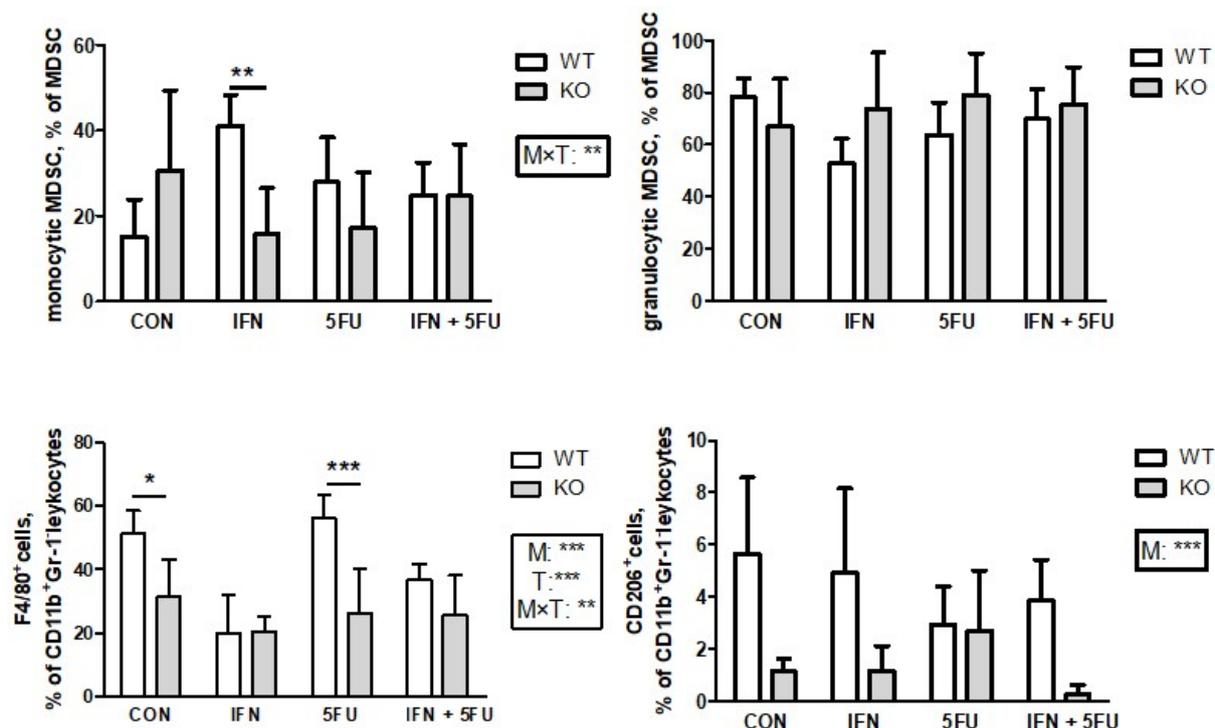


Abbildung 26: Vergleich der in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen stammenden MDSC, MDSC-Subpopulationen sowie Makrophagen und deren Subpopulation unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU. Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=3-9); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, M×T – Interaktion, * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

Nachfolgend wurden die Mauseffekte und Interaktionen auf die Zellexpression in Tumoren aus in vivo therapierten WT- und KO-Mäusen mit IFN und/oder 5FU bzw. keiner Therapie (CON) zusammenfassend in Tabelle 21 dargestellt. Es zeigten sich hier deutlich weniger signifikante Veränderungen bzw. Einflüsse wie in den Ergebnissen in Milzen vorab gezeigt werden konnte. Wechselwirkungen zeigten sich lediglich in der Expression von emT-CD4⁺, cmT-CD4⁺-Zellen, monozytären MDSC und Makrophagen. Die Mauseffekte konnten in den CD3⁺-T-, CD4⁺-T- und CD8⁺-T-Zellpopulationen, jedoch in keiner ihrer Subpopulation gezeigt werden. T_{Reg} und T_{Conv} zeigten auch in Tumoren signifikante Mauseffekte mit in der Kontrollgruppe und der IFN+5FU-Therapiegruppe signifikanten Veränderungen, jedoch gegensätzlich zu denen in Milzen (T_{Reg}-Expression in WT-Mäusen und T_{Conv}-Expression in KO-Mäusen signifikant erhöht).

Weiterhin vergleichend betrachtet zeigte sich in WT-Mäusen in Milzen wie in Tumoren in der Kontrollgruppe der Anteil an CD206⁺-Makrophagen höher als in KO-Mäusen. Diese wiederum zeigten in der Kontrollgruppe in Milzen und Tumoren im Vergleich zu WT-Mäusen höhe-

Ergebnisse

re Anteile an cmT-CD4⁺-Zellen. Unter Einfluss der Therapie mit IFN waren in WT-Mäusen effT-CD4⁺-Zellen, effT-CD8⁺-Zellen sowie CD206⁺-Makrophagen signifikant erhöht exprimiert. Die Therapie mit 5FU sowie mit IFN+5FU zeigte in WT-Mäusen einen einheitlich höheren Anteil an CD206⁺-Makrophagen.

Tabelle 21: Zusammenfassende Darstellung der Mauseffekte sowie Wechselwirkungen von Maustypen und Therapie im Hinblick auf die Immunzellexpression in Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU in vivo therapierten bzw. nicht therapierten (CON), tumortragenden WT- und KO-Mäusen

Faktor	Zellpopulation
Mauseffekt (M)	
WT > KO	CD3 ⁺ -T-Zellen T _{Reg} CD206 ⁺ -MDSC F4/80 ⁺ -MDSC Makrophagen CD206 ⁺ -Makrophagen
KO > WT	CD4 ⁺ -T-Zellen CD8 ⁺ -T-Zellen T _{Conv} MDSC
Wechselwirkung (M x T)	
CON	cmT-CD4 ⁺ -Zellen Makrophagen
IFN	emT-CD4 ⁺ -Zellen Ly6C ⁺ -MDSC
5FU	Makrophagen
IFN+5FU	

3.1.4 In-vivo-Untersuchung der B7-H1-Expression tumortragender WT-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

Die mittels FACS erfasste und in der FlowJo-Software ausgewertete B7-H1-Expression auf den verschiedenen untersuchten Immunzellen ist beispielhaft in Abbildung 27 dargestellt.

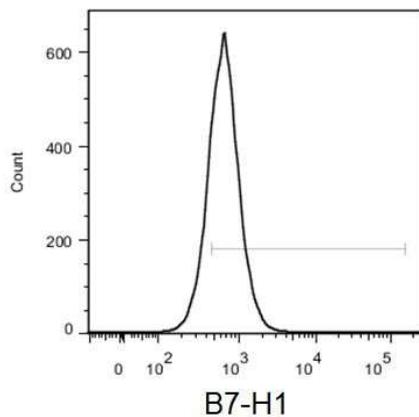
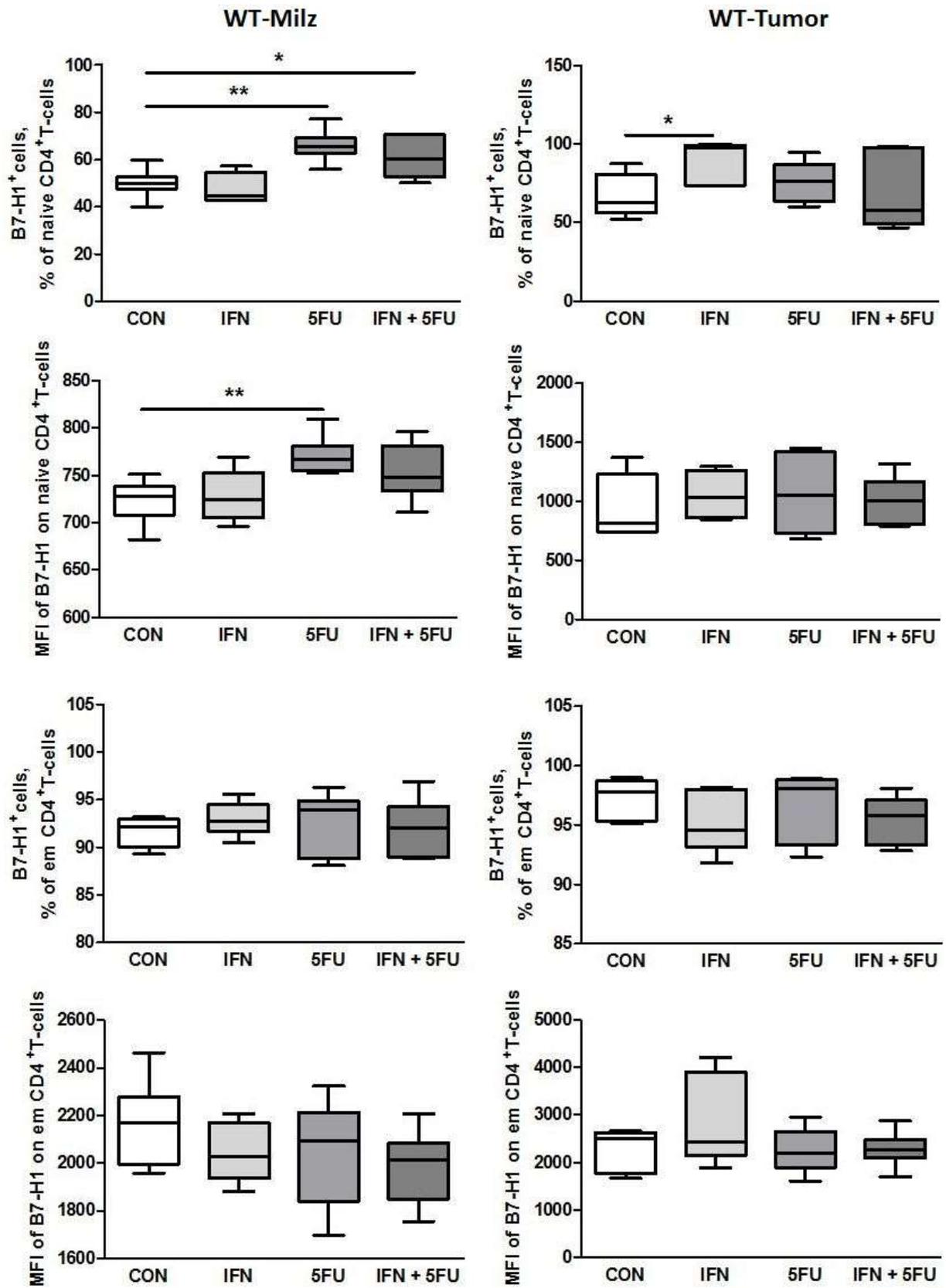


Abbildung 27: Auswertung der B7-H1-Expression auf den untersuchten Immunzellen aus Tumoren und Milzen tumortragender und therapierter WT-Mäuse. Diese Abbildung dient beispielhaft ebenfalls für die Auswertung von B7-DC auf Zellen aus KO-Mäusen in 3.2.5.

Die B7-H1-Expression sowie die zugehörigen MFI-Werte (*median fluorescence intensity*) der Subpopulationen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Tumoren und Milzen tumortragender WT-Mäuse unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. keiner Therapie (CON) sind in den Abbildungen 28 und 29 erfasst. Lagen signifikante Veränderungen vor, bezogen sich diese auf die Kontrollgruppe (CON).

Die in den Abbildungen 28 erfasste B7-H1-Expression auf CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen zeigte in WT-Milzen einige signifikante Veränderungen. So war die Expression von B7-H1 auf naiven CD4⁺-T-Zellen signifikant unter Therapie mit IFN+5FU und 5FU erhöht. Ebenfalls signifikant erhöht war die zugehörige MFI unter Therapie mit 5FU. Eine signifikant erhöhte B7-H1-Expression zeigten auch die cmT-CD4⁺-Zellen in jeder Therapiegruppe, jedoch keine signifikanten Veränderungen in ihrer MFI. Die Expression auf emT-CD4⁺-Zellen war nicht signifikant verändert. In WT-Tumoren zeigte sich die B7-H1-Expression auf naiven CD4⁺-T-Zellen signifikant unter Therapie mit IFN erhöht. Ansonsten bestanden bei der Betrachtung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen keine weiteren Veränderungen in WT-Tumoren.



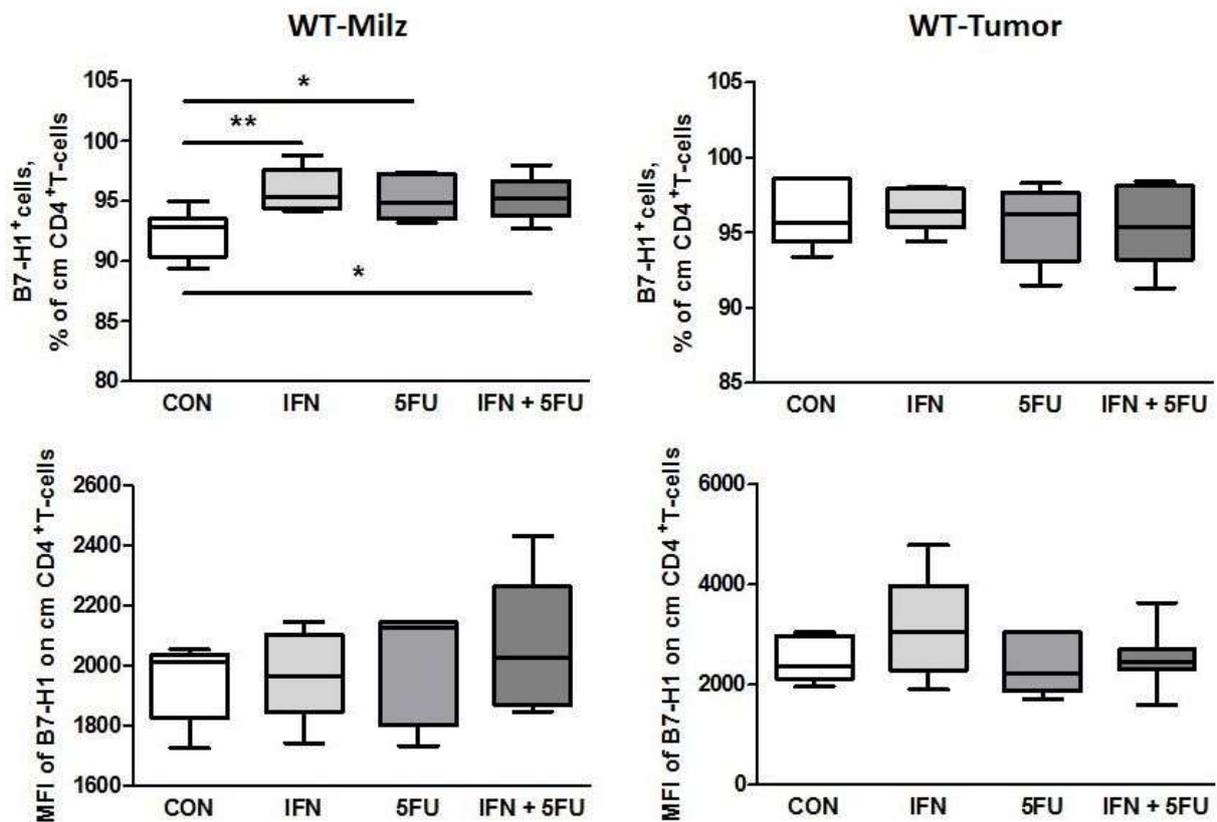


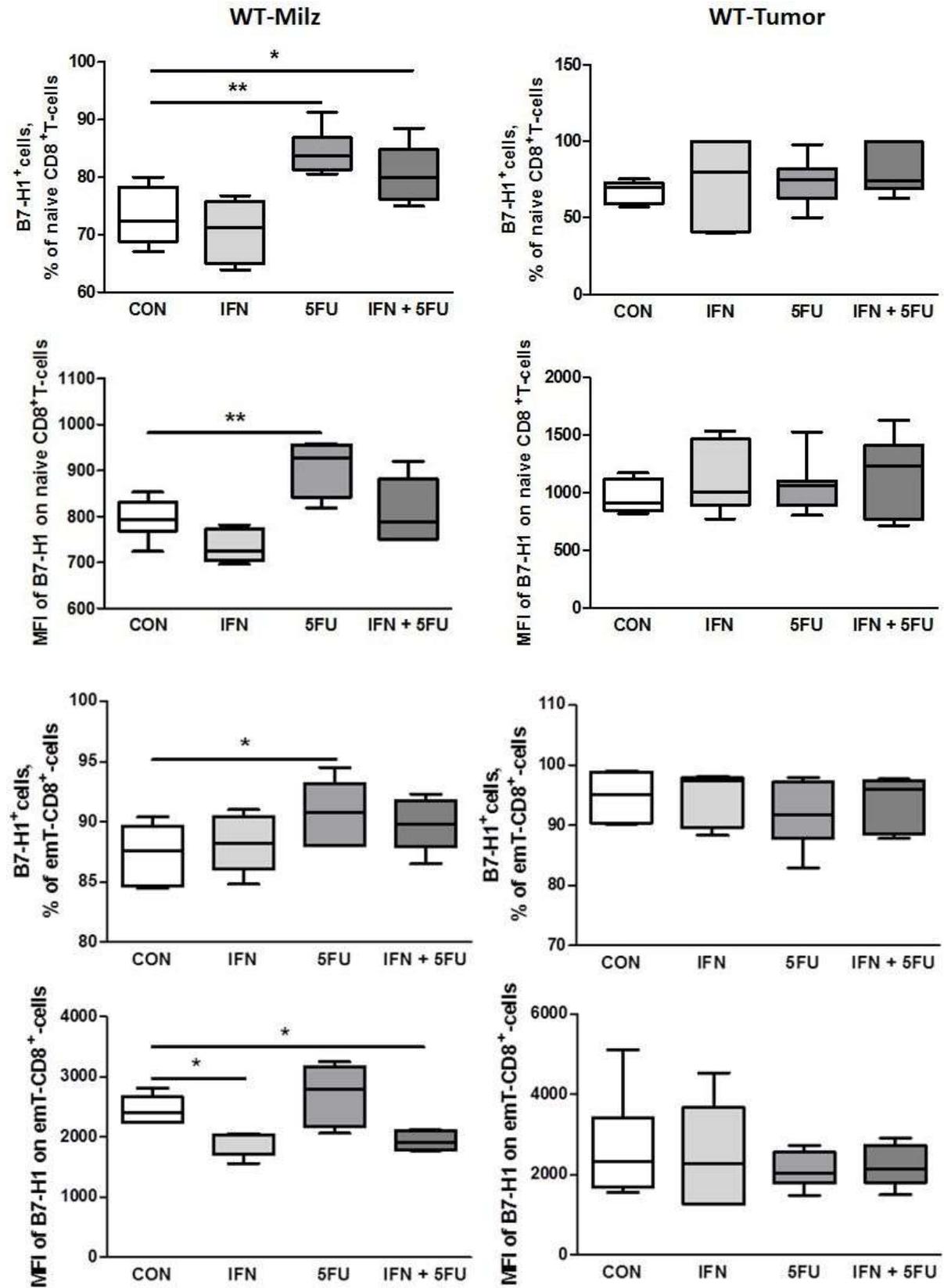
Abbildung 28: B7-H1-Expression auf CD4⁺T-Zell-Subpopulationen (naive, emT- und cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=5-7); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

Die B7-H1-Expression unter Therapie mit 5FU zeigte sich in allen CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen in WT-Milzen signifikant erhöht (Abbildung 29). Die zugehörigen MFI von naiven CD8⁺-T-Zellen sowie cmT-CD8⁺-T-Zellen waren ebenfalls signifikant erhöht. Unter der Therapie mit IFN+5FU zeigten naive und cmT-CD8⁺-T-Zellen eine signifikant höhere B7-H1-Expression in WT-Milzen. Die MFI der emT-CD8⁺-Zellen war unter Therapie mit IFN+5FU signifikant erhöht.

Betrachtet man hingegen die B7-H1-Expression auf den gleichen Zellpopulationen in WT-Tumoren war lediglich eine signifikant höhere MFI auf cmT-CD8⁺-Zellen unter Therapie mit IFN festzustellen.

Signifikant höhere Expression von B7-H1 fanden sich zusammenfassend fast ausschließlich in WT-Milzen unter dem Einfluss von 5FU. In WT-Tumoren waren lediglich die B7-H1-Expression naiver CD4⁺-T-Zellen sowie die MFI auf cmT-CD8⁺-Zellen signifikant unter The-

rapie mit IFN erhöht. In WT-Milzen war zudem die MFI B7-H1⁺emT-CD8⁺-Zellen unter Therapie mit IFN und IFN+5FU signifikant verringert.



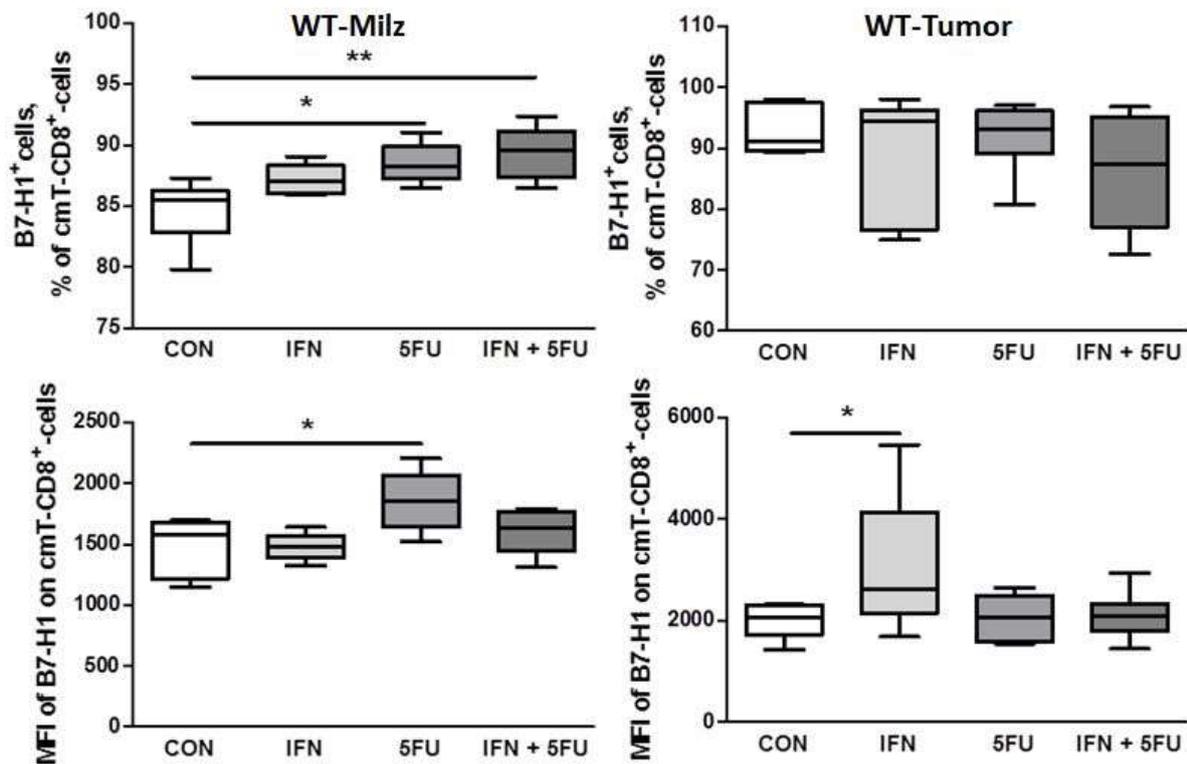
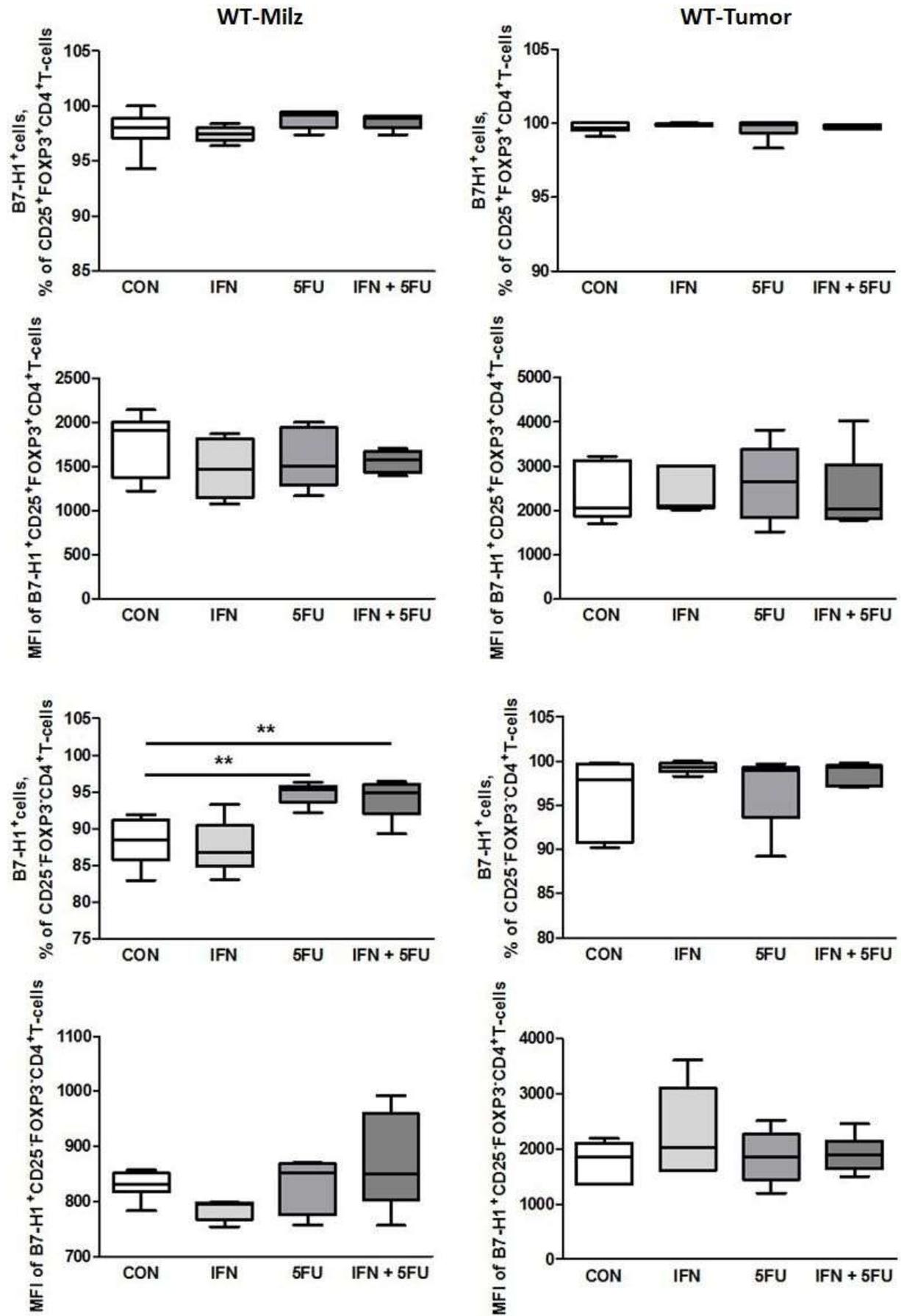


Abbildung 29: B7-H1-Expression auf CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen (naive, emT- und cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=5-7); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

Die B7-H1-Expression auf T_{Reg}, T_{Conv} sowie B-Zellen in Tumoren und Milzen tumortragender WT-Mäuse unter Einfluss der Therapie von IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Therapie (CON) sind in der Abbildung 30 dargestellt. Signifikant erhöht war dabei die Expression von B7-H1 auf T_{Conv} in WT-Milzen unter Therapie mit IFN+5FU und 5FU. Sonst lagen keine weiteren signifikanten Veränderungen vor.



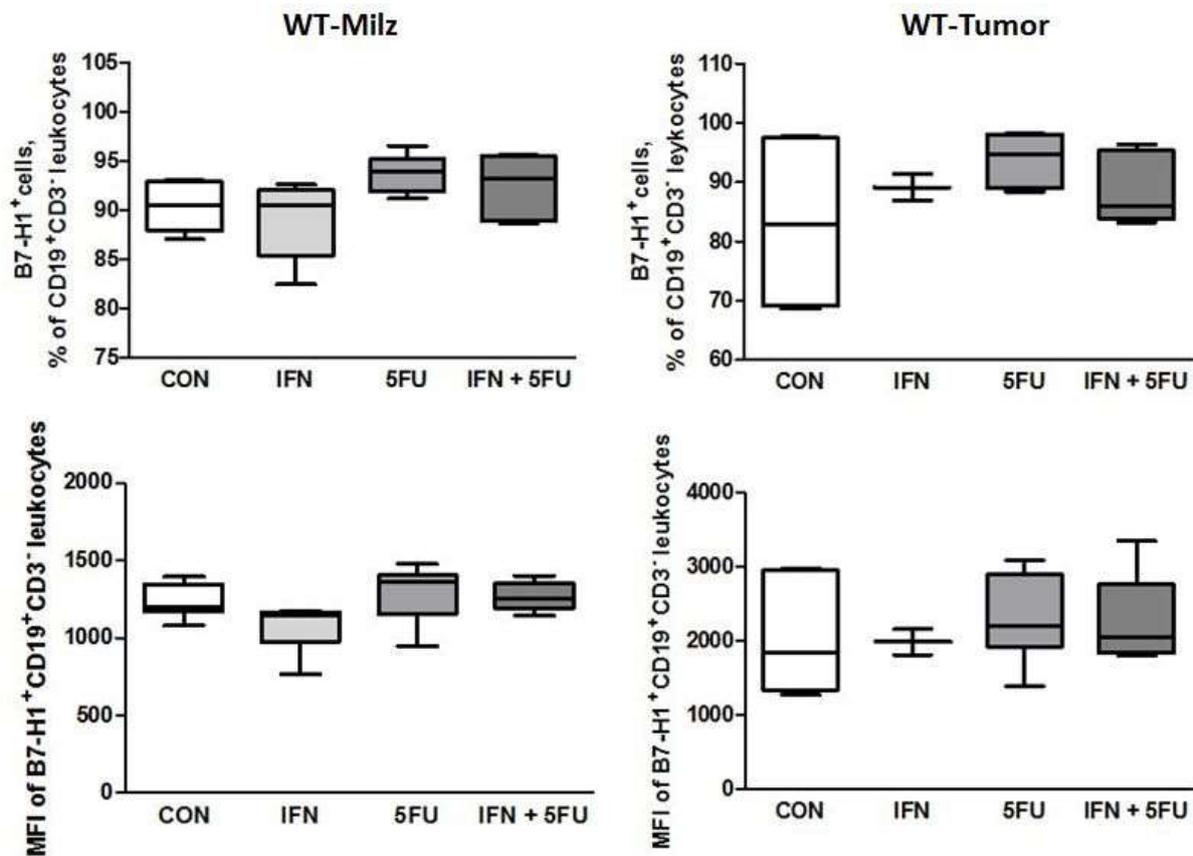


Abbildung 30: B7-H1-Expression auf T_{Reg}, T_{Conv} und B-Zellen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=4-7 (n=2 IFN-Gruppe B-Zellen)); ** - P < 0,01.

In den Abbildungen 31 und 32 sind die Ergebnisse der B7-H1-Expression auf MDSC und deren Subpopulationen aus Milzen und Tumoren tumortragender WT-Mäuse dargestellt. In WT-Milzen war die Expression von B7-H1 auf MDSC und F4/80⁺-MDSC nicht signifikant verändert, jedoch war die MFI B7-H1⁺F4/80⁺-MDSC in jeder Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Der Anteil monozytärer und granulozytärer MDSC mit ihrer B7-H1-Expression war durch die angewandten Therapien in WT-Milzen nicht signifikant verändert, jedoch zeigte die B7-H1-MFI in granulozytären MDSC unter Therapie mit IFN eine signifikante Erhöhung. Die MFI der B7-H1⁺monozytären MDSC war unter der Therapie mit IFN+5FU signifikant erniedrigt.

In WT-Tumoren war lediglich eine signifikante Erhöhung der B7-H1-Expression auf monozytären MDSC unter Therapie mit IFN zu erkennen. Zudem zeigte sich eine signifikant erhöhte MFI in MDSC, F4/80⁺- sowie monozytären MDSC unter Therapie mit IFN. In F4/80⁺-

und granulozytären MDSC zeigt sich eine signifikant höhere MFI unter Therapie mit IFN+5FU.

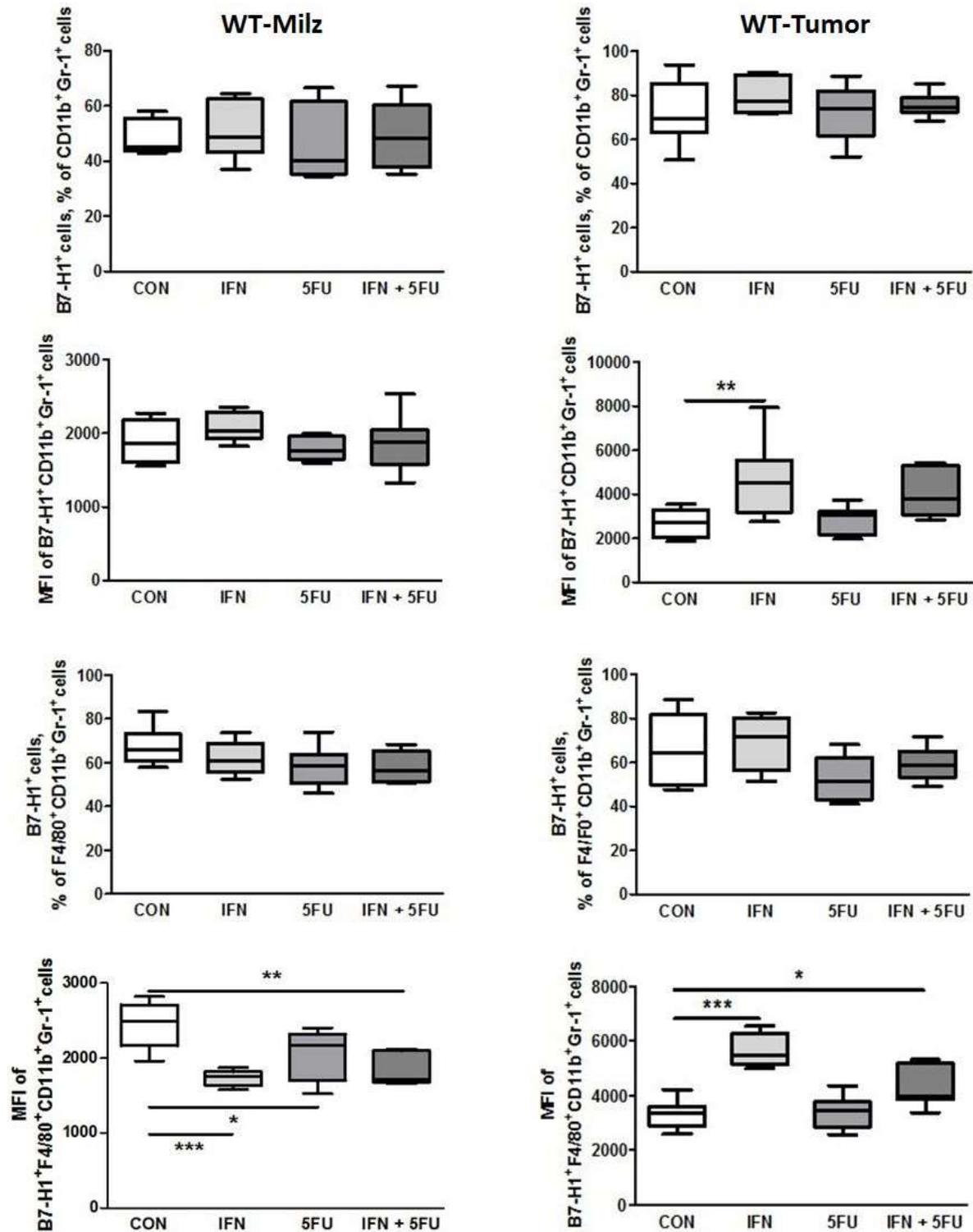


Abbildung 31: B7-H1-Expression auf MDSC und F4/80+MDSC aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=6-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

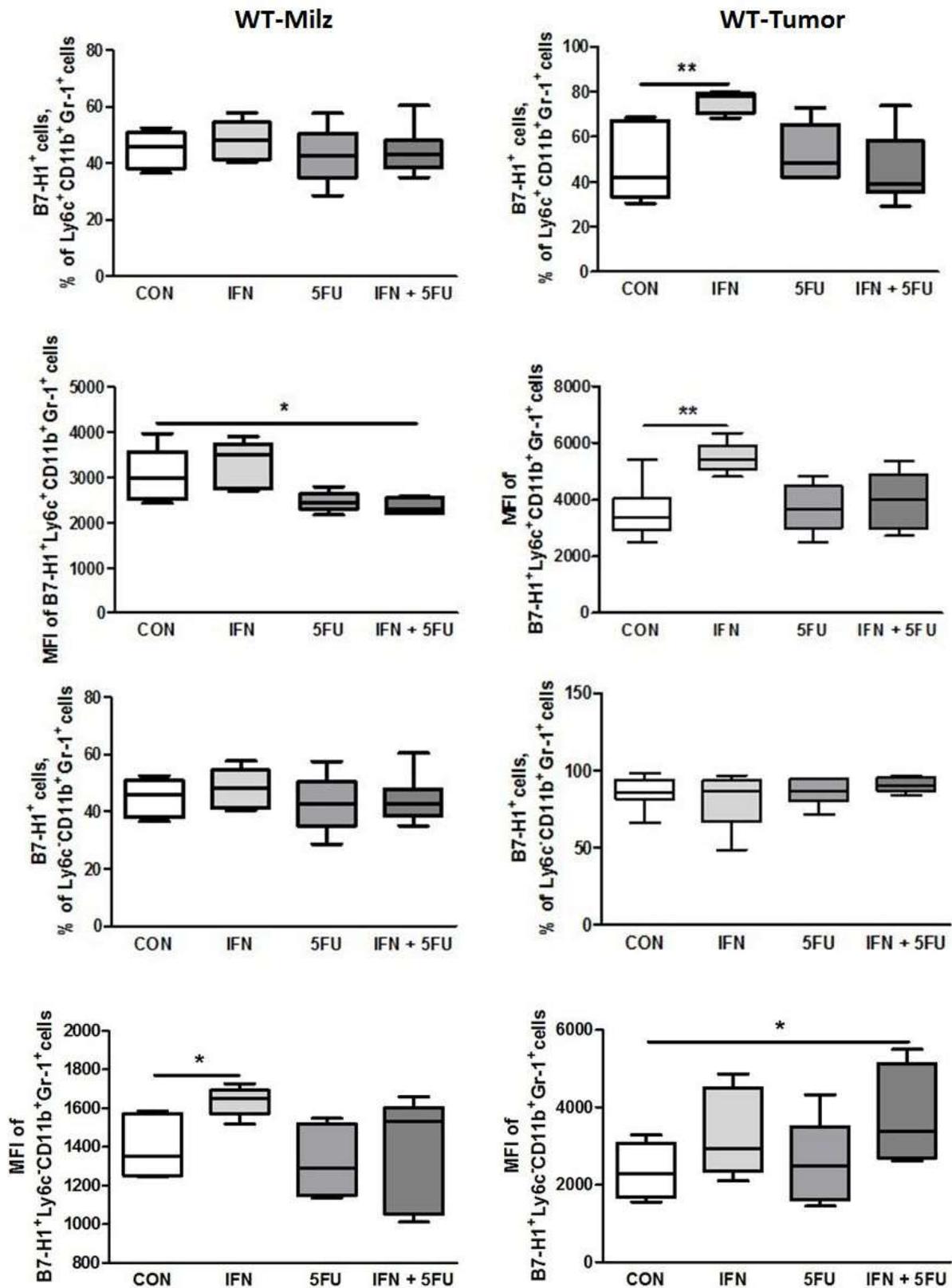


Abbildung 32: B7-H1-Expression auf monozytäre und granulozytäre MDSC aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=6-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

Zusammenfassend zeigte sich keine veränderte B7-H1-Expression auf MDSC und MDSC-Subpopulationszellen in WT-Milzen und lediglich eine signifikant erhöhte Expression auf monozytären MDSC unter der Therapie mit IFN in WT-Tumoren. Eine signifikant niedrigere MFI zeigte sich in F4/80⁺-MDSC unter allen Therapien und in monozytären Granulozyten unter Therapie mit IFN+5FU in WT-Milzen.

Die Ergebnisse der B7-H1-Expressionen auf Makrophagen und auf CD206⁺-Makrophagen sind in der Abbildung 33 dargestellt. In WT-Milzen zeigten sich dabei keinerlei signifikante Veränderungen in der Expression und der MFI von B7-H1 unter Einfluss der Therapien. In WT-Tumoren war der Anteil B7-H1-exprimierender Makrophagen unter Therapie mit IFN sowie IFN+5FU signifikant erhöht. Die MFI dieser Zellen erhöhte sich ebenfalls signifikant in der IFN-Therapiegruppe. Auf CD206⁺-Makrophagen war die MFI der B7-H1⁺-Zellen in IFN-therapierten Mäusen signifikant erhöht.

Die signifikanten Veränderungen in der B7-H1-Expression aus 3.1.4 sind in Tabelle 22 zusammenfassend dargestellt. Signifikante Veränderungen beziehen sich immer die zugehörige Kontrollgruppe.

Insgesamt war der Einfluss der Therapien auf die B7-H1-Expression und deren MFI in WT-Milzen stärker und auffällig steigernd vorhanden als in WT-Tumoren. Die B7-H1-Expression konnte mit keiner Therapie in WT-Tumoren signifikant gesenkt werden, unter der Therapie mit IFN erhöhte sich die B7-H1-Expression auf naiven CD4⁺-T-Zellen sowie monozytären MDSC sogar. In WT-Milzen zeigten die Therapien den größten steigernden Einfluss auf die B7-H1-Expression sowie die MFI unter der Therapie mittels 5FU, den geringsten in IFN-therapierten Splenozyten. Die Kombinationstherapie zeigte im Vergleich zu 5FU keinen signifikant steigernden Einfluss auf die B7-H1-Expression in emT-CD8⁺-Zellen. Alle Therapien hatten positiven Effekt auf die Expression von B7-H1 in cmT-CD4⁺-Zellen in WT-Milzen.

Die MFI in WT-Milzen zeigte unter allen Therapien eine signifikante Verringerung in F4/80⁺-MDSC sowie unter IFN und IFN+5FU, aber nicht unter 5FU alleine, in emT-CD8⁺-Zellen.

Betrachtet man die Zellpopulationen noch einmal näher, wurde die B7-H1-Expression in granulozytären MDSC weder in WT-Milzen noch in WT-Tumoren beeinflusst. Es zeigen lediglich die Therapien mit IFN in WT-Milzen sowie mit IFN+5FU in WT-Tumoren eine signifikante Erhöhung der MFI auf diesen Zellen. F4/80⁺-MDSC werden in WT-Milzen durch die Therapien negativ in Bezug auf ihre B7-H1-MFI beeinflusst. In WT-Tumoren zeigt sich unter IFN und IFN+5FU der gegenteilige Effekt.

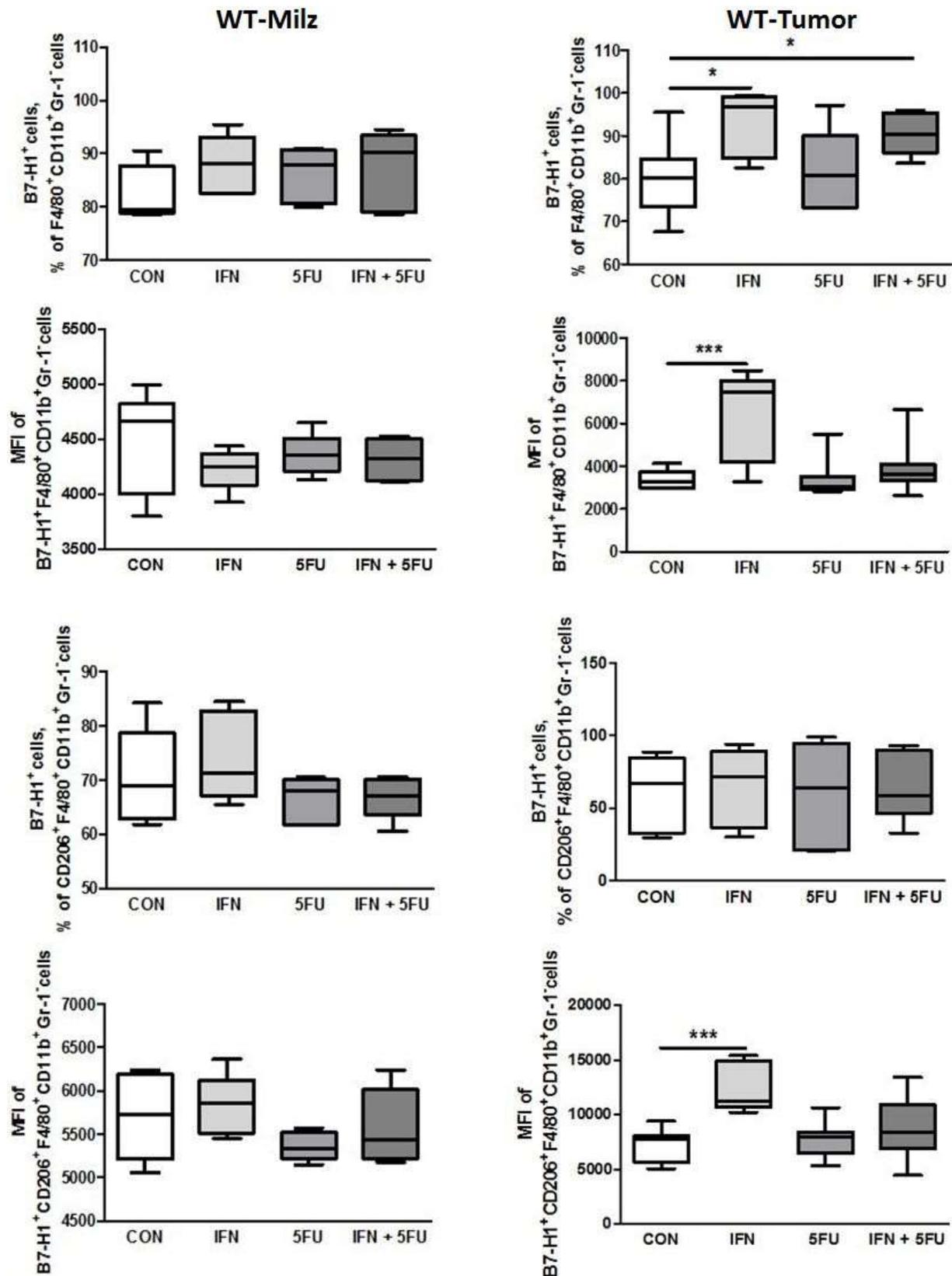


Abbildung 33: B7-H1-Expression auf Makrophagen und CD206⁺Makrophagen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) WT-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=6-9); * - P < 0,05, * - P < 0,001.**

Ergebnisse

Tabelle 22: Zusammenfassende Darstellung aller signifikanten Ergebnisse der B7-H1-Expression auf Immunzellen in Milzen und Tumoren aus in vivo therapierten bezogen auf nicht therapierte tumortragende WT-Mäuse

Therapie	WT-Milz		WT-Tumor	
	↑	↓	↑	↓
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">B7-H1⁺</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">IFN</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MFI</div>	cmT-CD4 ⁺ -Zellen Ly6C ⁻ -MDSC	emT-CD8 ⁺ -Zellen F4/80 ⁺ -MDSC	naive CD4 ⁺ -T-Zellen Ly6C ⁺ -MDSC cmT-CD8 ⁺ -Zellen MDSC F4/80 ⁺ -MDSC Ly6C ⁺ -MDSC	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">B7-H1⁺</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">5FU</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MFI</div>	naive CD4 ⁺ - cmT-CD4 ⁺ - naive CD8 ⁺ - emT-CD8 ⁺ - cmT-CD8 ⁺ -Zellen T _{Conv} naive CD4 ⁺ -T- naive CD8 ⁺ - cmT-CD8 ⁺ -Zellen	F4/80 ⁺ -MDSC		
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">B7-H1⁺</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 5px;">IFN+5FU</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">MFI</div>	naive CD4 ⁺ -T- cmT-CD4 ⁺ - naive CD8 ⁺ - cmT-CD8 ⁺ -Zellen T _{Conv}	emT-CD8 ⁺ -Zellen F4/80 ⁺ -MDSC Ly6C ⁺ -MDC	F4/80 ⁺ -MDSC Ly6C ⁻ -MDSC	

Neben der B7-H1-Expression wurde zudem die MFI der jeweiligen B7-H1⁺-Zellpopulation berücksichtigt. Signifikant erhöhte Expressionen bzw. MFI sind mit roten, sinkende Expressionen bzw. MFI mit grünen Pfeilen gekennzeichnet.

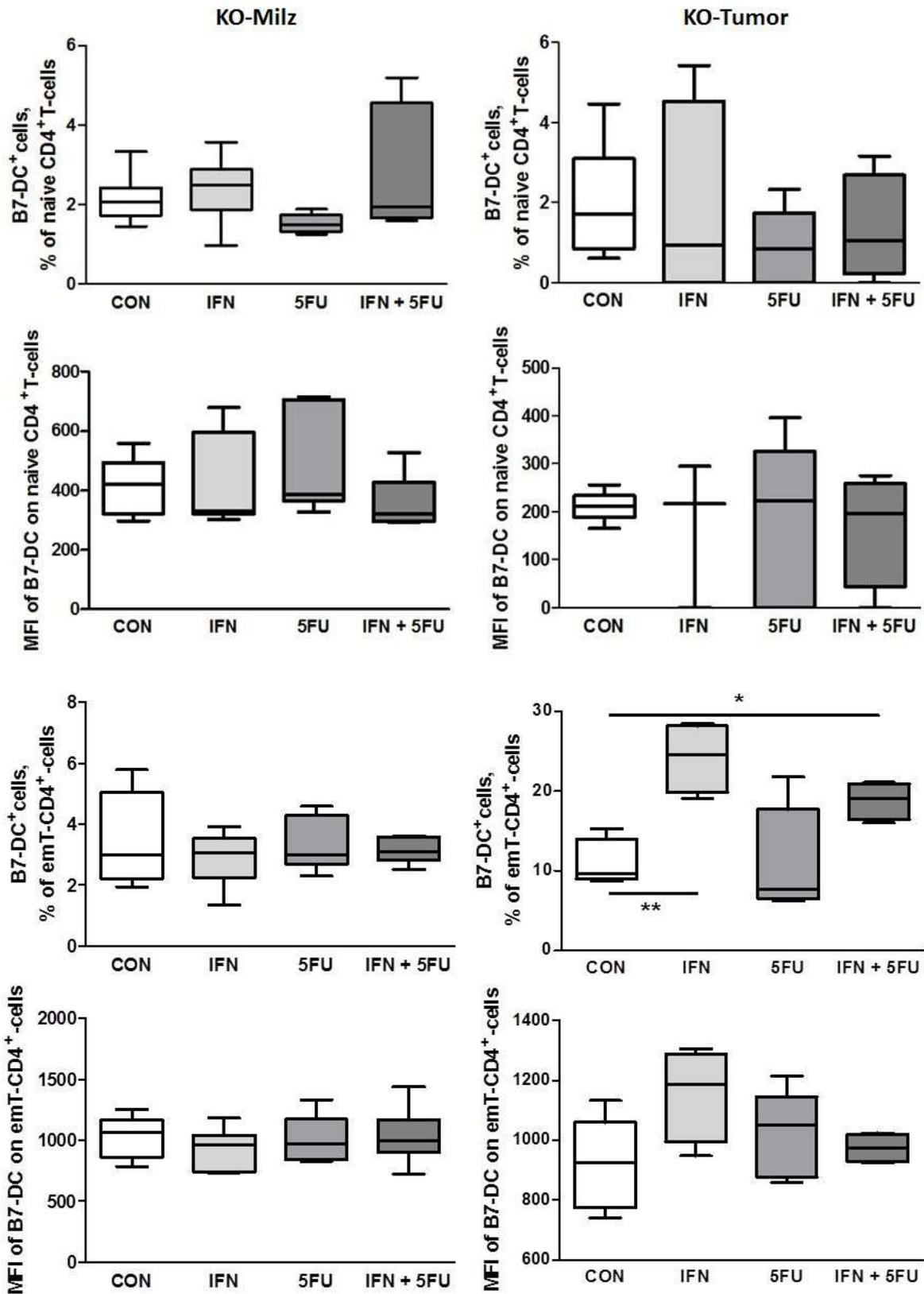
3.1.5 In-vivo-Untersuchung der B7-DC-Expression in Milzen und Tumoren tumortragender KO-Mäuse unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

B7-DC ist ebenfalls wie B7-H1 Ligand für den PD-1-Rezeptor. Da in KO-Mäusen, wie sie im Vergleich zu WT-Mäusen in den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, kein B7-H1 exprimiert wird, kann der Einfluss von B7-H1 (3.1.2) sowie B7-DC unter den Therapien mit IFN und 5FU auf die Immunzellexpression unmittelbar verglichen werden und die Hypothese geprüft werden, dass B7-DC unter Abwesenheit von B7-H1 dessen immunsupprimierende Funktion übernimmt. Bekannt ist hierbei bereits, dass B7-DC auf PDA-Tumorzellen vermehrt exprimiert wird (Loos *et al.* 2008) und bei Betrachtung der B7-DC-Expression auf MDSC in gesunden WT- und KO-Mäusen konnten lediglich auf granulozytären MDSC in KO-Mäusen signifikante Veränderungen gezeigt werden (Bazhin *et al.* 2014).

Wie in 3.1.4 bereits für die Ermittlung der Expression von B7-H1 beschrieben, wurde auch die B7-DC-Expression mittels FACS auf den nachfolgend dargestellten Zellpopulationen gemessen und mittels FlowJo ausgewertet. Der so ermittelte Anteil an B7-DC⁺-Zellen in Tumoren und Milzen tumortragender KO-Mäuse sowie deren MFI sind in den Abbildungen 34-39 erfasst.

In der Abbildung 34 sind die Anteile an B7-DC⁺-CD4⁺-T-Zellsubpopulationen dargestellt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der B7-DC-Expressionen in KO-Milzen. In KO-Tumoren stieg der Anteil an B7-DC⁺-emT- und cmT-Zellen signifikant unter Therapie mit IFN sowie IFN+5FU an. In naiven CD4⁺-T-Zellen in KO-Tumoren waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Selbiges gilt für die MFI aller CD4⁺-T-Zellsubpopulationen in KO-Milzen und Tumoren.

In KO-Milzen waren keine signifikanten Veränderungen in der B7-DC-Expression in den CD8⁺-T-Zellsubpopulationen zu erkennen (Abbildung 35), jedoch zeigte die MFI B7-DC⁺-emT-Zellen eine signifikante Zunahme unter Therapie mit IFN+5FU. In KO-Tumoren erhöhte sich lediglich die B7-DC-Expression auf emT-Zellen unter Therapie mit IFN signifikant.



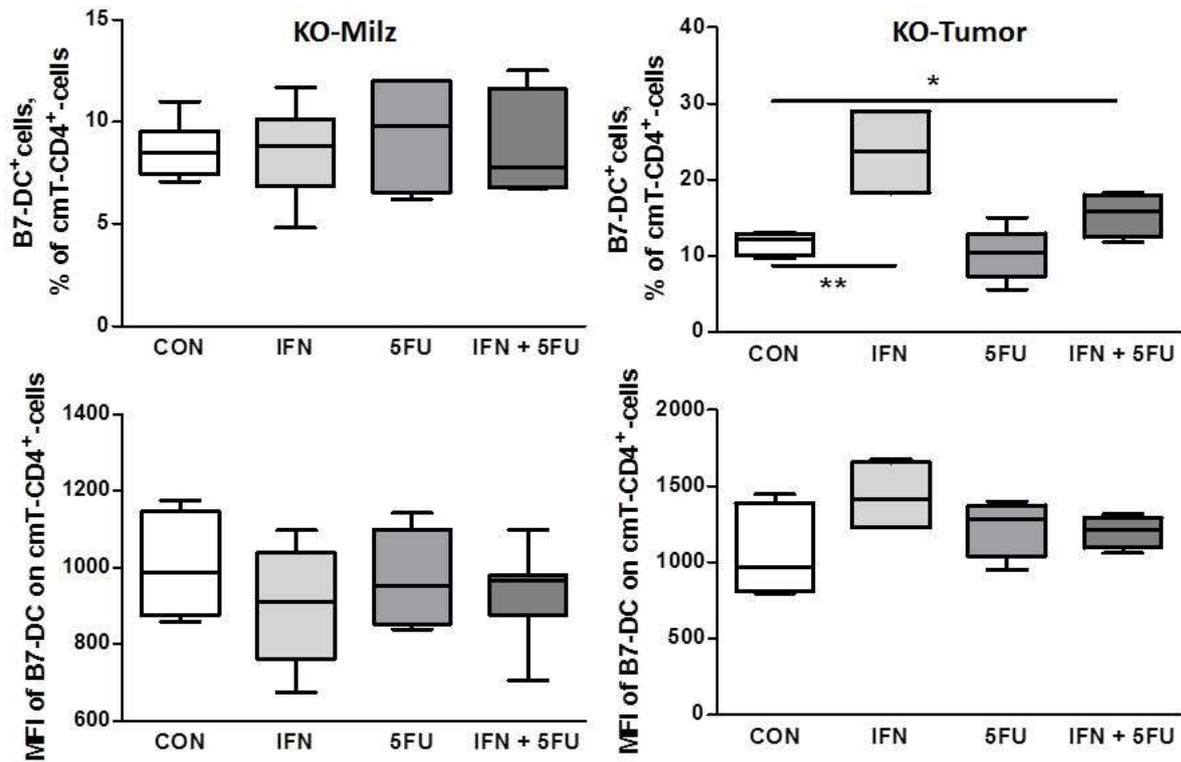
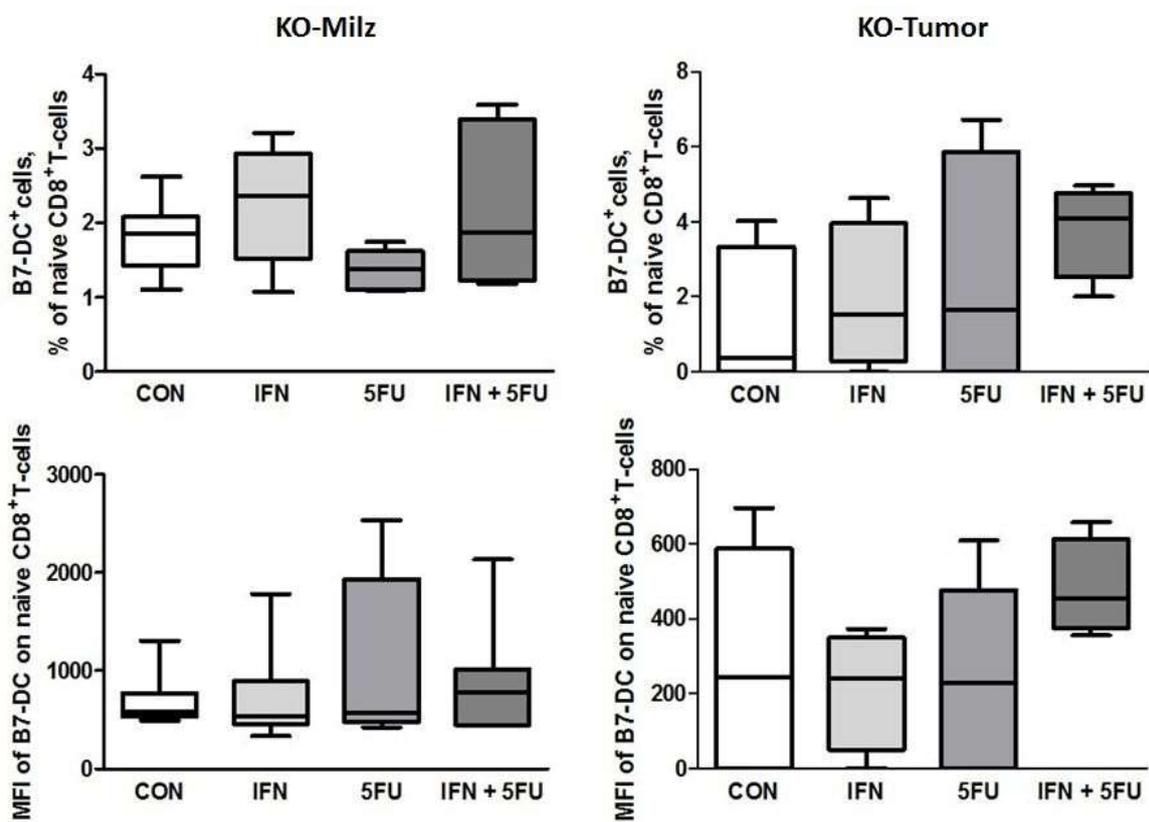


Abbildung 34: B7-DC-Expression auf CD4⁺T-Zell-Subpopulationen (naive-, emT-, cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=4-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.



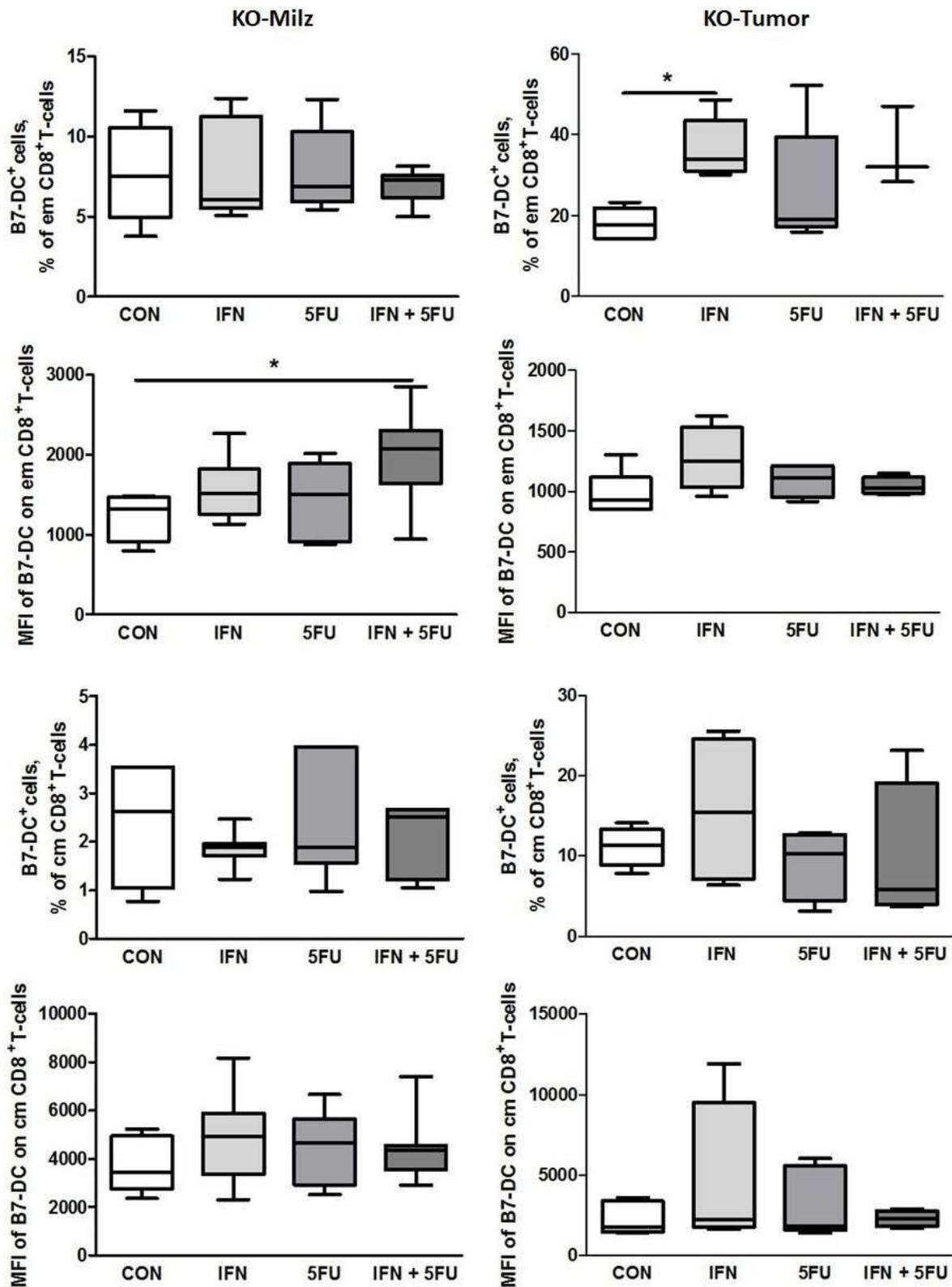


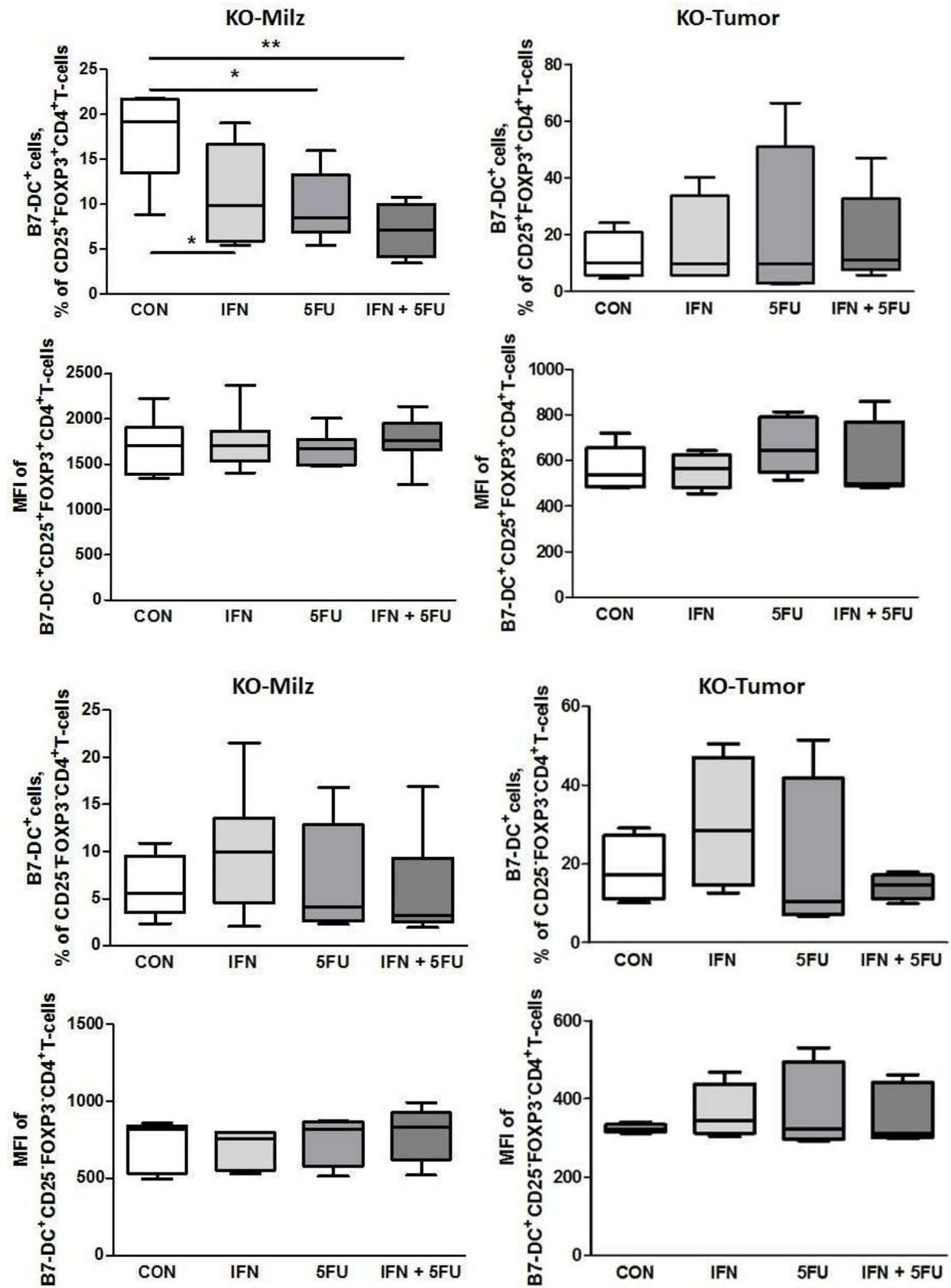
Abbildung 35: B7-DC-Expression auf CD8⁺T-Zell-Subpopulationen (naive-, emT-, cmT-Zellen) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=4-9); * - P < 0,05.

Die Expression von B7-DC auf T_{Reg}, T_{Conv} und B-Zellen in KO-Milzen und Tumoren ist in der Abbildung 36 dargestellt. Dabei waren signifikante Verringerungen der B7-DC⁺-T_{Reg} in KO-Milzen unter der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU zu erkennen. In der Expression von T_{Conv} und B-Zellen waren keine signifikanten Veränderungen in KO-Milzen festzustellen, was auch für die Expression von B7-DC⁺-T_{Reg}, -T_{Conv} und -B-Zellen in KO-Tumoren galt. Es bestand bei Betrachtung von T_{Reg}, T_{Conv} und B-Zellen demnach lediglich ein die B7-DC-Expression senkender Einfluss auf T_{Reg} in KO-Milzen, jedoch kein Einfluss auf die MFI.

In Abbildung 37 ist die B7-DC-Expression auf MDSC und F4/80⁺-MDSC dargestellt. In KO-Milzen war in jeder Therapiegruppe eine signifikante Abnahme der B7-DC⁺-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Zudem erhöhte sich die MFI von B7-DC⁺-F4/80⁺-MDSC unter Therapie mit IFN+5FU. In KO-Tumoren waren keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

Der Anteil an B7-DC⁺-Ly6C⁺-MDSC war in KO-Milzen unter Therapie mit IFN signifikant verringert (Abbildung 38). Die MFI von B7-DC⁺-Ly6C⁺-MDSC war in KO-Tumoren nach Einfluss der Therapie mit IFN+5FU signifikant verringert. Ly6C⁺-MDSC in KO-Tumoren sowie Ly6C⁺-MDSC in KO-Milzen zeigten keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich ihrer Expression von B7-DC. Makrophagen und CD206⁺Makrophagen zeigten in KO-Milzen und Tumoren ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der B7-DC-Expression (Abbildung 39).

Insgesamt war festzustellen, dass die B7-DC-Expression auf Makrophagen in Milzen und Tumoren aus in vivo therapierten tumortragenden KO-Mäusen keine signifikanten Veränderungen zeigten. Die B7-DC-Expressionen auf MDSC dieser KO-Milzen zeigten signifikante Abnahmen in jeder Therapiegruppe. B7-DC⁺F4/80⁺-MDSC in KO-Milzen und B7-DC⁺-granulozytäre MDSC in KO-Tumoren zeigten unter Therapie mit IFN+5FU eine signifikante Abnahme ihrer MFI. Zusammenfassend sind die Ergebnisse in Tabelle 23 dargestellt.



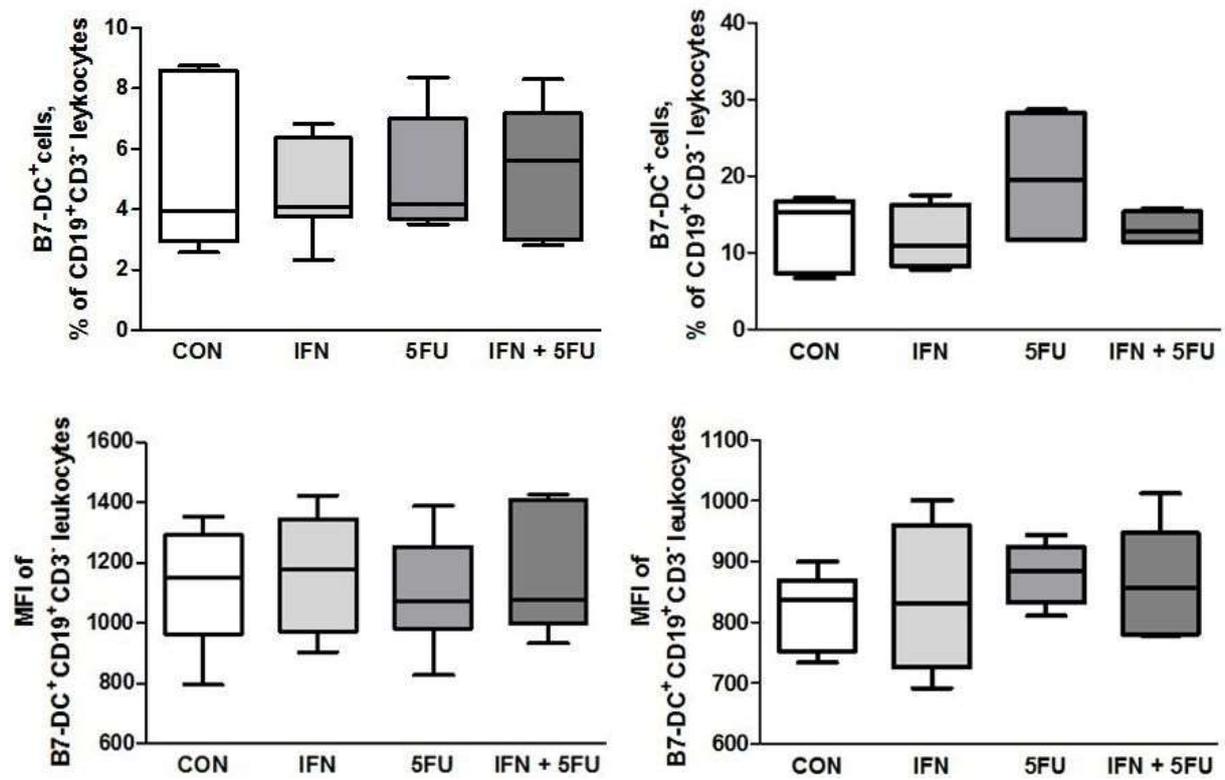


Abbildung 36: B7-DC-Expression auf T_{Reg}, T_{Conv} und B-Zellen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=4-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

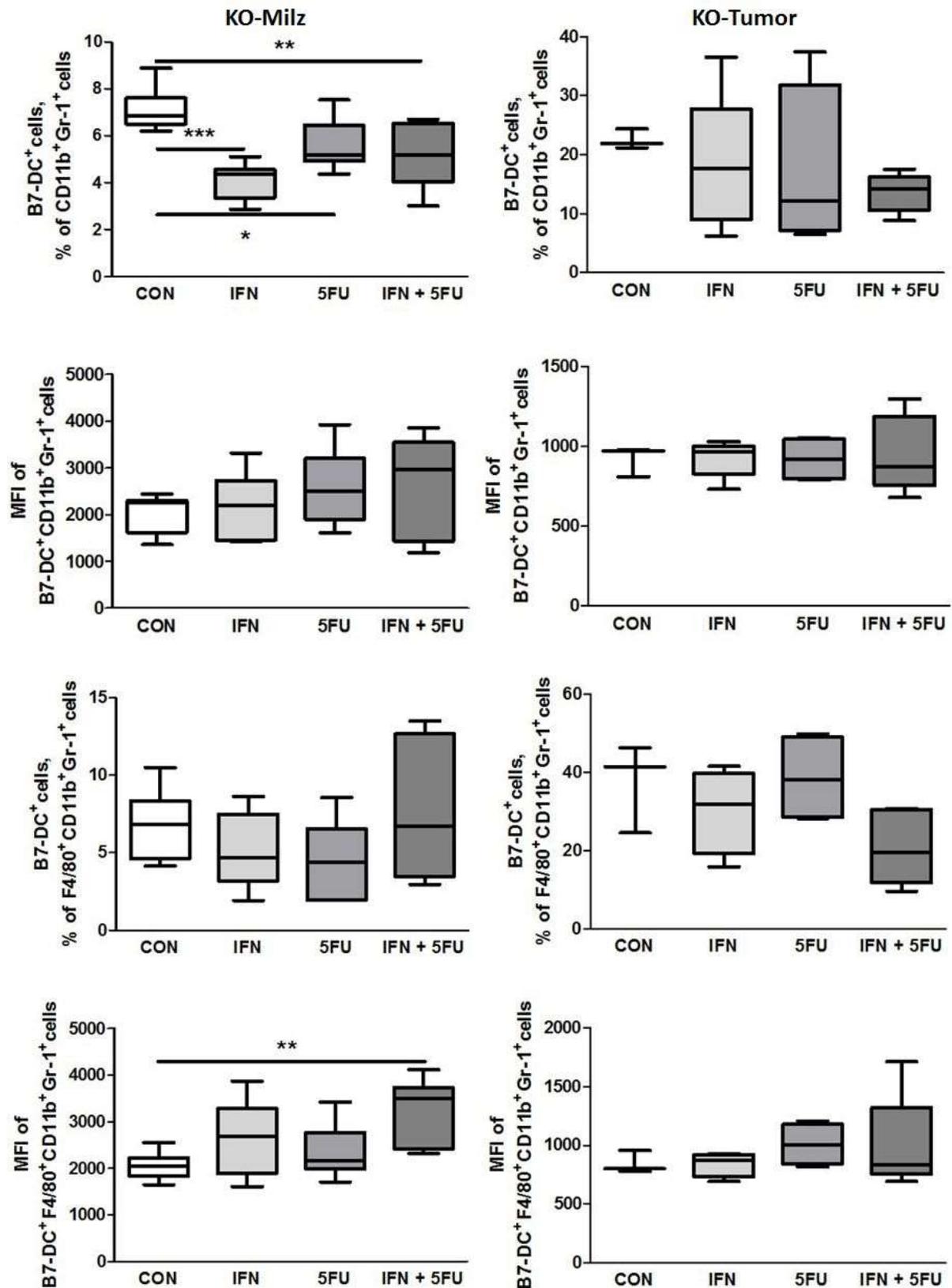


Abbildung 37: B7-DC-Expression auf MDSC und F4/80⁺-MDSC aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=3-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

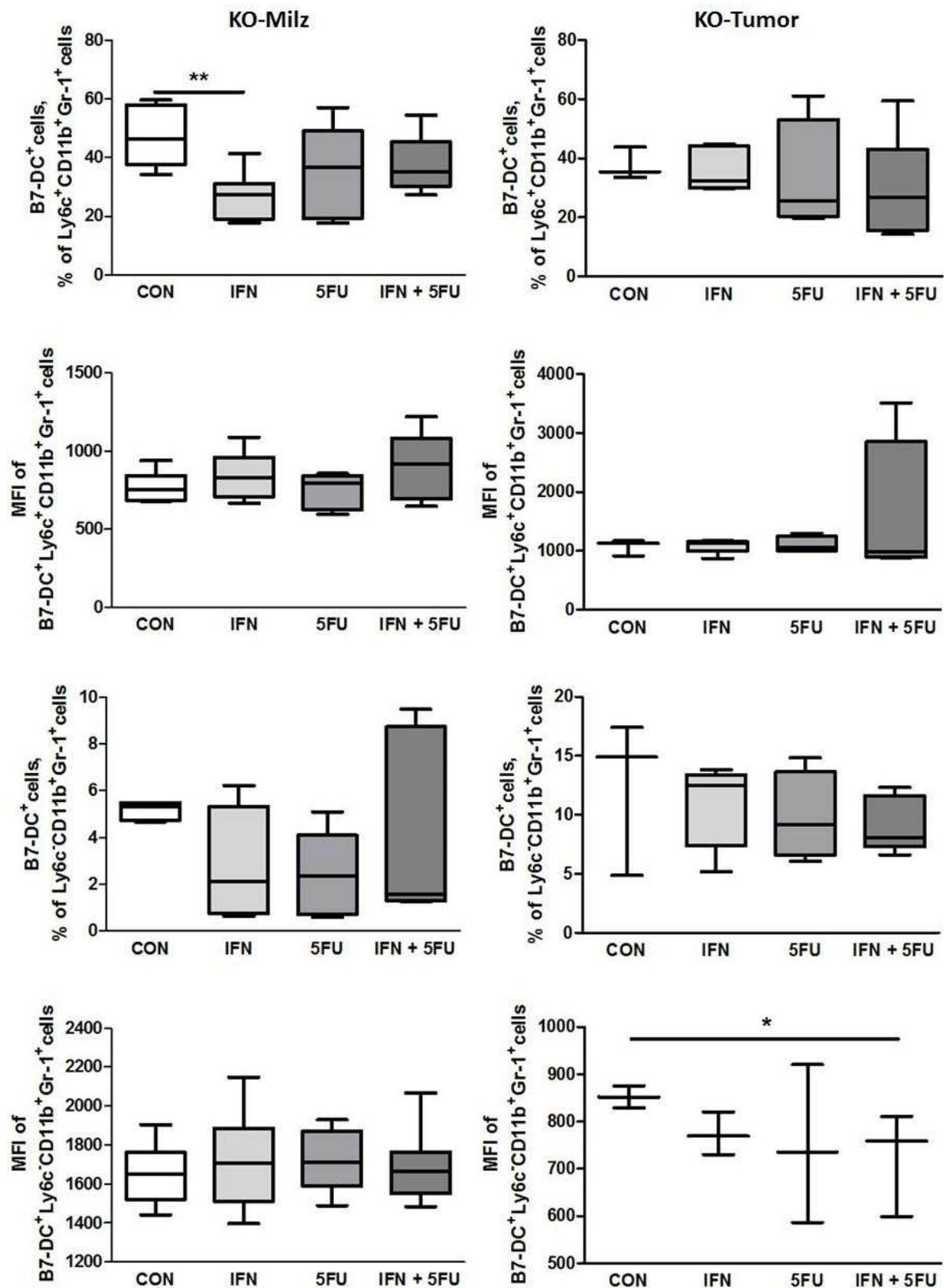


Abbildung 38: B7-DC-Expression auf MDSC-Subpopulationen (monozytäre und granulozytäre MDSC) aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=3-9); * - P < 0,05, ** - P < 0,01.

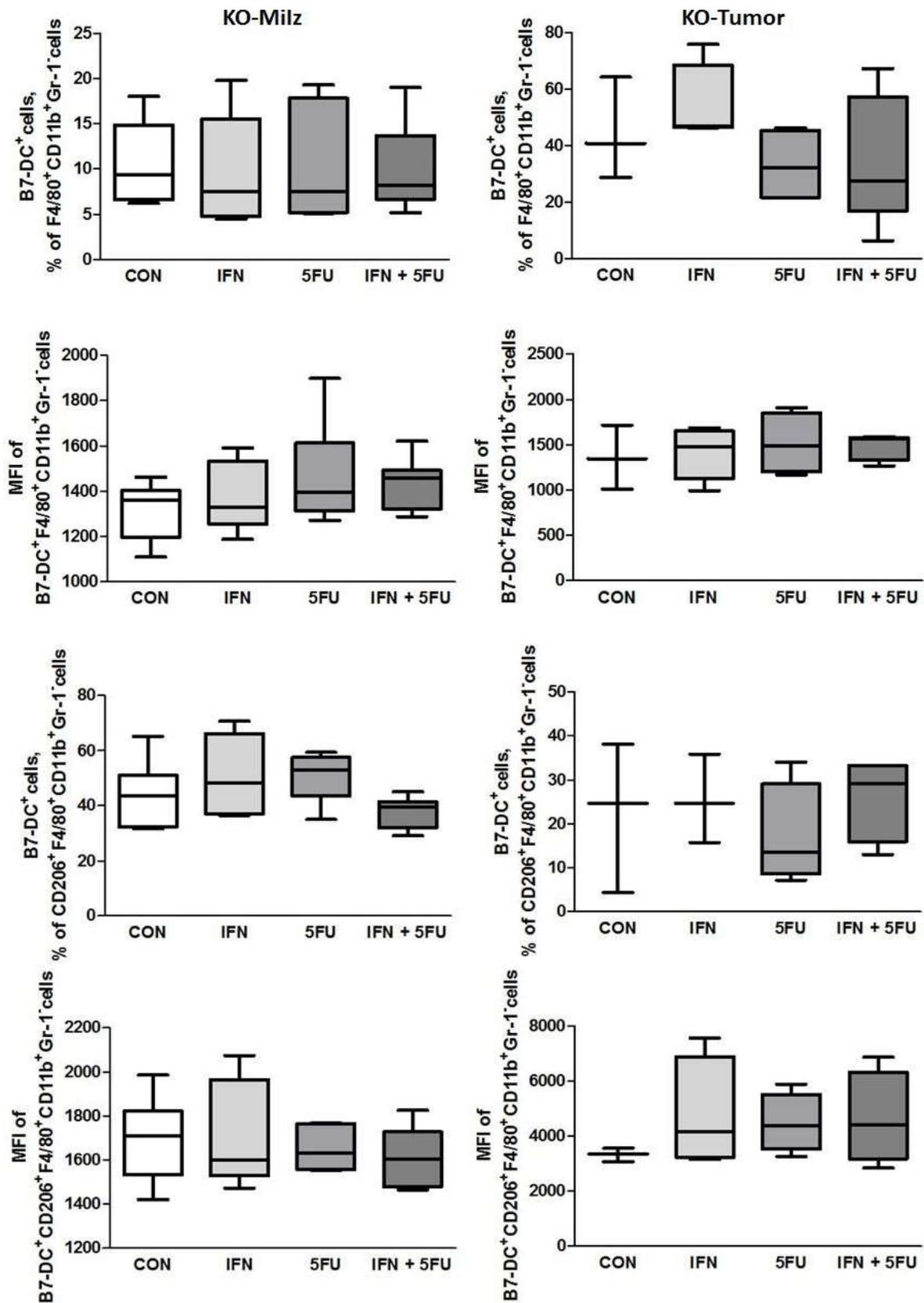


Abbildung 39: B7-DC-Expression auf Makrophagen und CD206⁺Makrophagen aus Milzen und Tumoren aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU therapierten bzw. unbehandelten (CON) KO-Mäusen im FACS. Die Daten wurden mittels FlowJo-Software ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=3-9).

Tabelle 23: Zusammenfassende Darstellung aller signifikanten Ergebnisse der B7-DC-Expression auf Immunzellen in Milzen und Tumoren aus in vivo therapierten bezogen auf nicht therapierte tumortragende KO-Mäuse

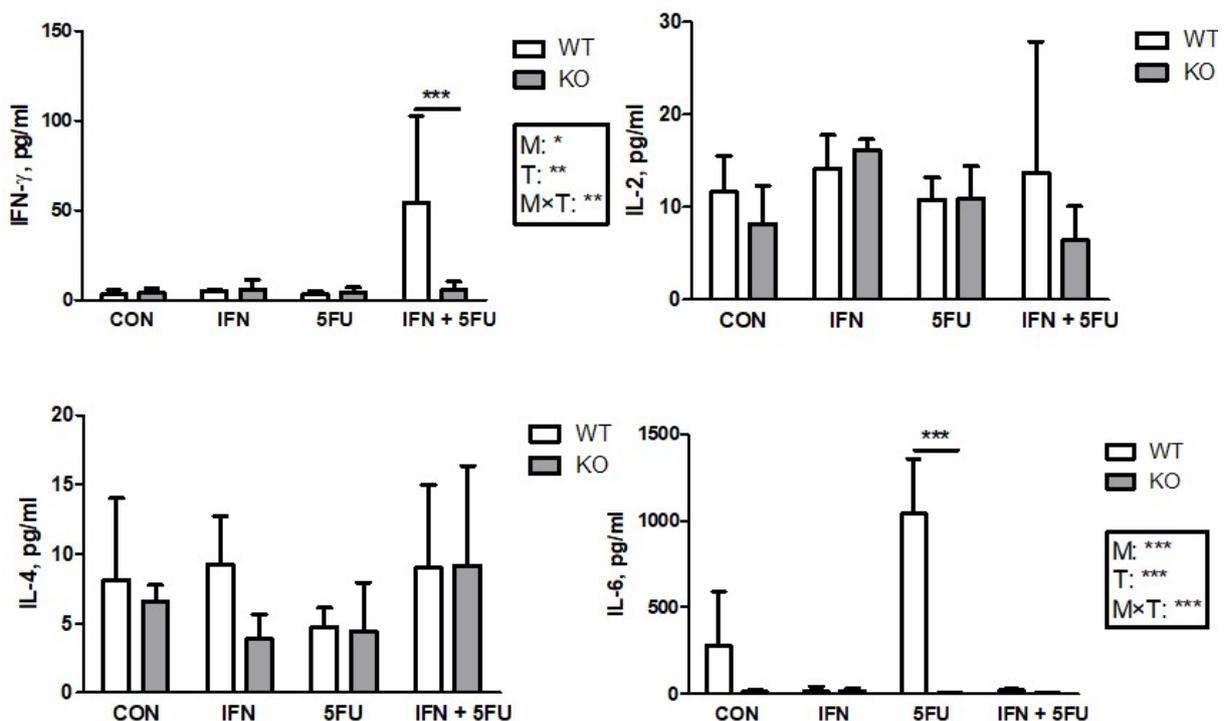
Therapie	KO-Milz		KO-Tumor	
	↑	↓	↑	↓
B7-DC ⁺		T _{Reg} MDSC Ly6C ⁺ MDSC	emT-CD4 ⁺ - cmT-CD4 ⁺ - emT-CD8 ⁺ - Zellen	
IFN				
MFI				
B7-DC ⁺		T _{Reg} MDSC		
5FU				
MFI				
B7-DC ⁺		T _{Reg} MDSC	emT-CD4 ⁺ - cmT-CD4 ⁺ - Zellen	
IFN+5FU	emT-CD8 ⁺ - Zellen			Ly6C-MDSC
MFI	F4/80 ⁺ MDSC			

Neben der B7-DC-Expression wurde zudem die MFI der jeweiligen B7-DC⁺-Zellpopulation berücksichtigt. Signifikant erhöhte Expressionen bzw. MFI sind mit roten, sinkende Expressionen bzw. MFI mit grünen Pfeilen gekennzeichnet.

3.1.6 Zytokinspiegel tumortragender WT- und KO-Mäuse unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU

Die Analyse der Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels Luminex-Technologie und die statistische Auswertung mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (Abbildung 40).

Betrachtet man die Zytokinkonzentrationen unter Einfluss der Mauslinie und der Therapie mit IFN und/oder 5FU zeigten sich bei IFN- γ , IL-6, KC und VEGF signifikante Mauseffekte mit höheren Konzentrationen in WT-Mäusen als in KO-Mäusen. Im Rahmen einer Maus \times Therapie-Interaktion zeigte sich dabei die Konzentration von IFN- γ in WT-Mäusen unter der Therapie von IFN+5FU signifikant höher als in KO-Mäusen. Ebenfalls signifikant erhöht war die Konzentration von IL-6 in WT-Mäusen unter Therapie mit 5FU. Ein Effekt der Therapie im Hinblick auf die Konzentration zeigte sich bei der Analyse von IFN- γ , IL-6 und IL-12. Eine Interaktion der Einflussfaktoren ergab sich bei der Betrachtung der Konzentration von IFN- γ und IL-6. Die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, TGF- β und TNF- α zeigten keine signifikanten Veränderungen. Die Auswertung von IL-1 β war aufgrund fehlender Daten (limitierender Faktor KO-Mauszahlen) im two-way ANOVA nicht möglich und wurde daher nicht dargestellt. Andere Auswertungsstrategien ergaben keine signifikanten Veränderungen (Daten nicht abgebildet).



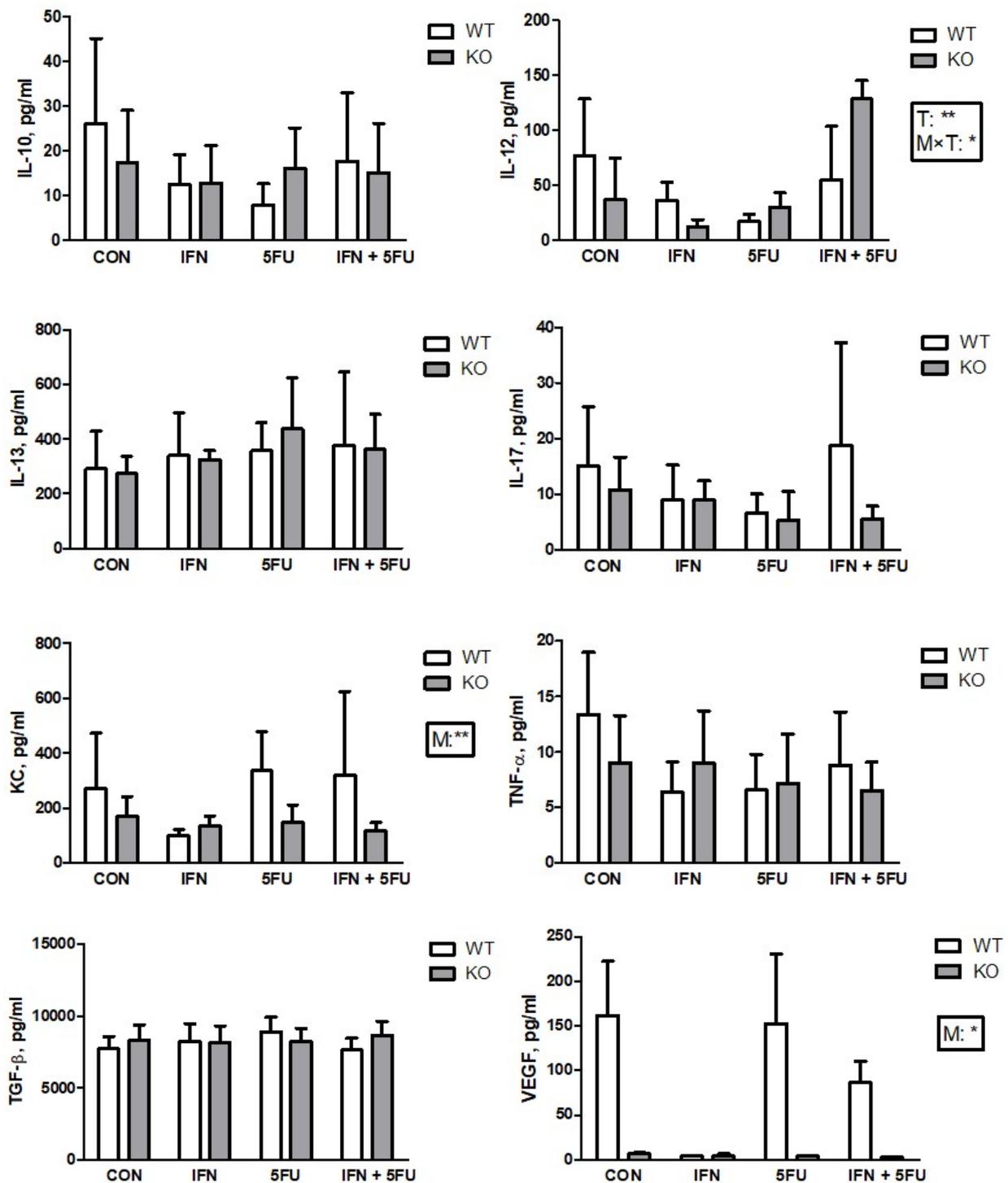


Abbildung 40: Vergleich der Zytokinkonzentrationen in tumortragenden WT- und KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Therapieeinfluss (CON). Die Analyse erfolgte im FACS und mittels FlowJo-Software. Die statistische Auswertung erfolgte mittels two-way ANOVA und Bonferroni Test (n=3-7); M – Faktor Mauslinie, T – Faktor Therapie, M×T – Interaktion, *** - P < 0,001.

3.2 Untersuchung der Tumorumfänge therapierter WT- und KO-Mäuse mit IFN, 5FU und IFN+5FU

In dieser Versuchsreihe wurden die Tumorumfänge therapierter WT- und KO-Mäuse untersucht. Hierbei sollte der Einfluss des Chemotherapeutikums 5FU und/oder des Immuntherapeutikums IFN auf das Tumorstadium und seine Metastasierung bewertet werden. Zudem wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der Konzentration an im Tumor enthaltenen Makrophagen besteht, da sich vorab in Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 Veränderungen in den Anteilen der untersuchten Immunzellpopulationen unter Einfluss der oben genannten Therapien gezeigt hatten. Aus diesem Grund wurde der Anteil an Makrophagen ebenfalls wie in Kapitel 3.1 relativ zur Gesamtheit an Leukozyten dargestellt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde vorab bereits ein positiv linearer Zusammenhang zwischen Tumorstadium und Konzentration an MDSC festgestellt (Karakhanova *et al.* 2014, Von Ahn 2015). Andere Immunzellgruppen zeigten dies nicht. Da Makrophagen derselben Zelllinie entspringen wie MDSC und im PDA ebenfalls immunsuppressive Funktionen einnehmen können, wurden diese in der vorliegenden Arbeit näher untersucht und in diesem Versuchsteil hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit dem Tumorstadium betrachtet.

In Abbildung 41 sind das Tumorstadium sowie die Metastasierungsneigung tumortragender WT-Mäuse dargestellt, die mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. nicht (CON) therapiert wurden. Der Vergleich der Tumorumfänge zeigte ein signifikant niedrigeres Stadium der IFN-Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Statistisch erfasst wurden zudem Metastasen der Bauchwand, der Leber und des Darms. Hierbei waren jedoch keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

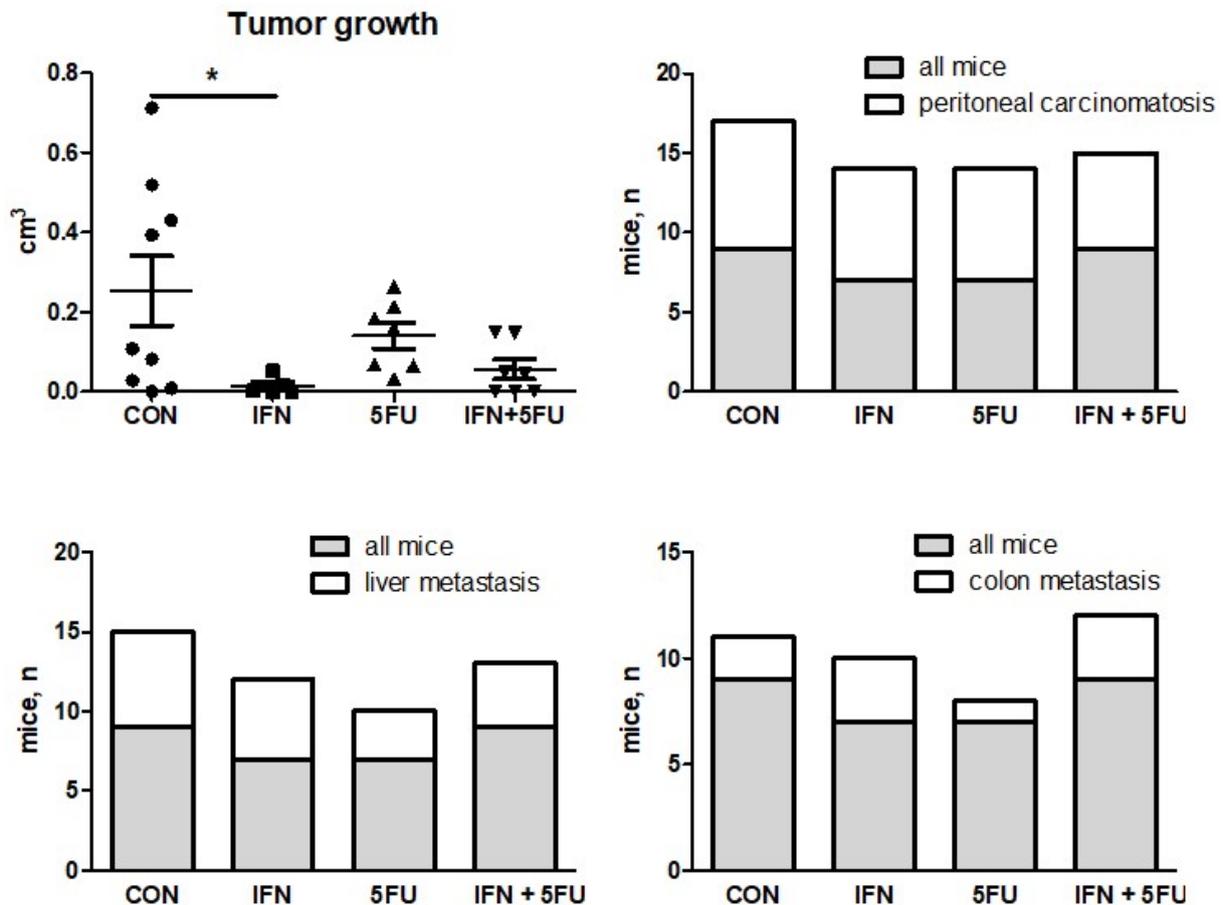


Abbildung 41: Tumorzellen und Metastasierung in WT-Mäusen unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe (CON). Die Erfassung des Tumorzellen (A) erfolgte mittels Messschieber (Länge x Höhe x Breite):6 in cm. Makroskopisch sichtbare Metastasen der Bauchorgane sind in B bis D erfasst. Hier sind einerseits die Gesamtzahl der Mäuse und zusätzlich der Anteil dieser Mäuse, bei denen Metastasen auftraten (weiß), dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte für das Tumorzellen mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test und mittels χ^2 -Test für Metastasen (n=5-9); * - P < 0,05.

Die Korrelationsanalyse in Abbildung 42 zeigte einen positiven, linearen Zusammenhang zwischen dem Tumorzellen und dem Anteil an Makrophagen (CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen) sowie zwischen dem Tumorzellen und dem Anteil an CD206⁺F4/80⁺-Makrophagen in den Tumoren, ungeachtet der angewandten Therapie.

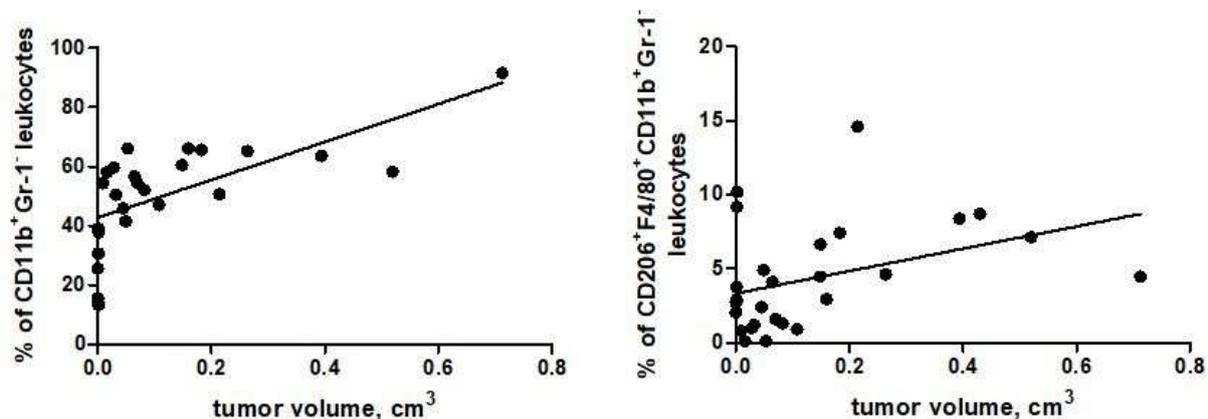


Abbildung 42: Korrelation zwischen Tumorumfängen und Konzentration an (Makrophagen) CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen bzw. CD206⁺-Makrophagen in WT-Mäusen (Darstellung der Ergebnisse „all mice“ aus Tabelle 24). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Spearman-Korrelation (links n=25; rechts n=27).

Tabelle 24 zeigt noch einmal im Detail die *Spearman*-Korrelation von CD11b⁺Gr-1⁻- sowie CD206⁺-Makrophagen der Kontrollgruppe, der Therapiegruppen und ungeachtet der verschiedenen Gruppen mit dem Tumorumfang. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen CD206⁺-Makrophagen unter Therapie mit 5FU sowie Makrophagen unter Therapie mit IFN+5FU bezogen auf das Tumorumfang. Betrachtet man die Gesamtheit untersuchter Mäuse zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Makrophagenkonzentration und dem Tumorumfang.

Tabelle 24: Korrelation zwischen Tumorumfängen und Konzentration an Makrophagen (CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen) bzw. CD206⁺-Makrophagen in WT-Mäusen unter Einfluss der Therapien mit IFN und/oder 5FU.

	CON		IFN		5FU		IFN + 5FU		All mice	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CD11b ⁺ Gr ⁻	0.6667	0.0831	0.9487	0.0833	0.3929	0.3956	0.9276	0.0167	0.7674	<0.0001
CD206 ⁺ F4/80 ⁺ CD11b ⁺ Gr ⁻	0.7143	0.0576	-0.6316	0.2333	0.7857	0.0480	0.0901	0.8397	0.3935	0.0383

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Spearman-Korrelation (n=25; 27). Signifikante Veränderungen wurden zusätzlich grau unterlegt (P < 0,05).

Vergleichend zu Abbildung 41 sind in Abbildung 43 das Tumorumfang und die Metastasierungsneigung in tumortragenden KO-Mäusen unter Einfluss der Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU dargestellt. Zwischen den Tumorumfängen der Therapie- und Kontrollgruppe ließen sich keine signifikanten Veränderungen feststellen. Ebenfalls nicht signifikant waren therapiebedingte Unterschiede in den aufgetretenen Metastasen der tumortragenden KO-Mäuse.

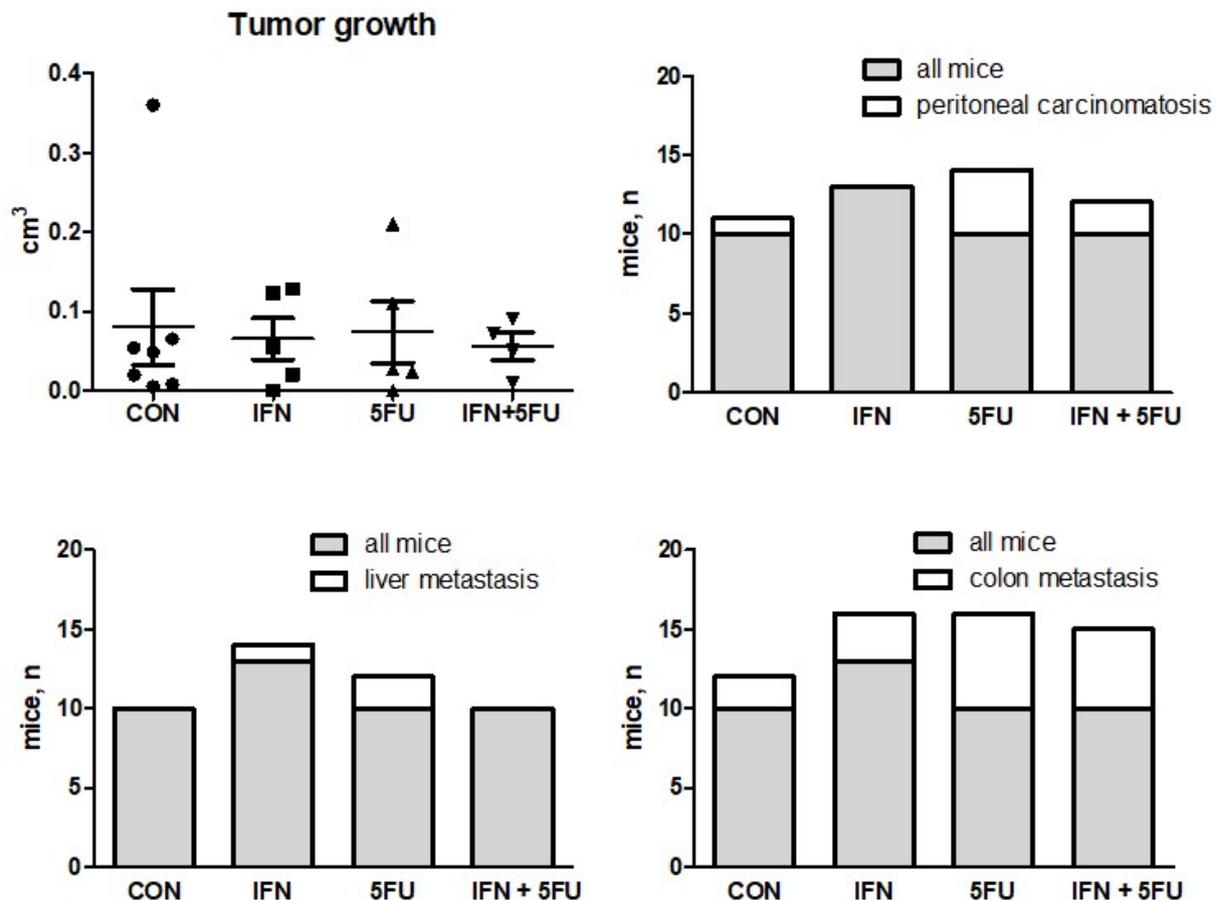


Abbildung 43: Tumorzellen und Metastasierung in KO-Mäusen unter Therapie mit IFN, 5FU und IFN+5FU im Vergleich zur Kontrollgruppe (CON). Die Erfassung des Tumorzellen (A) erfolgte mittels Messschieber (Länge x Höhe x Breite):6 in cm). Makroskopisch sichtbare Metastasen der Bauchorgane sind in B bis D erfasst. Hier sind einerseits die Gesamtzahl der Mäuse und zusätzlich der Anteil dieser Mäuse, bei denen Metastasen auftraten (weiß), dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte für das Tumorzellen mittels *one-way ANOVA* und *Dunnnett's test* und mittels χ^2 -Test für Metastasen (n=4-13).

Eine Korrelation zwischen Tumorzellen und Makrophagenkonzentration in tumortragenden KO-Mäusen konnte nicht nachgewiesen werden (Daten sind nicht abgebildet).

Es bestand demnach ein signifikant niedrigeres Tumorzellen in tumortragenden WT-Mäusen unter der Therapie mit IFN. In tumortragenden KO-Mäusen konnten hingegen keine signifikanten Veränderungen beim Vergleich von Tumorzellen unter Einfluss der angewandten Therapien beobachtet werden.

In WT-Mäusen bestand im Gegensatz zu KO-Mäusen eine Korrelation zwischen Tumorzellen und der Konzentration an Makrophagen bzw. CD206⁺-Makrophagen, wodurch ein Einfluss von Makrophagen auf das Tumorzellen in WT-Mäusen bestehen könnte.

3.3 Ex-vivo-Untersuchung der Aktivität CD11b⁺-Zellen aus tumortragenden WT- und KO-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse des Verhaltens von CD11b⁺-Phagozyten im PDA. Zu dieser Zellgruppe gehören Makrophagen (CD11b⁺Gr-1⁺F4/80⁺-Zellen) und MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen). In wie weit Chemo- und Immuntherapien Einfluss auf die Aktivität dieser Zellen haben, wurde vergleichend mit (WT) und ohne (KO) Einfluss von B7-H1 untersucht.

Es wurden WT- und KO-Mäuse im Alter von 8 Wochen Panc02-Zellen orthotop implantiert. Nach 28 Tagen p.op. wurden die Mäuse euthanasiert und ihre Primärtumoren entnommen. Diese wurden in Einzelzellsuspensionen überführt, CD11b⁺-Zellen (Makrophagen und MDSC) isoliert und insgesamt 12 Stunden lang kultiviert (Kapitel 2.3.11 und 2.3.13). Hierbei wurden 4 Gruppen unterteilt (CON, IFN, 5FU, IFN+5FU) und bis auf die unbehandelte Kontrollgruppe (CON) mit dem jeweiligen Therapeutikum zwei Stunden nach Beginn der Kultivierung behandelt (Kapitel 2.3.14).

Einem Teil der CD11b⁺-Zellen jeder Gruppe wurde eine Stunde vor Untersuchung der Zellen Phagozytose-Beads hinzugefügt (Kapitel 2.3.19), mittels derer im FACS die Phagozytoseaktivität dieser Zellen ermittelt wurde. Zudem wurden die Proben auf ihre Expression von B7-H1/B7-DC untersucht. Aus nach der Kultivierung entnommenen Medienüberständen wurden Zytokine mittels Luminex analysiert.

3.3.1 Makrophagenkonzentrationen in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen

Die Analyse der Zielzellpopulationen (Makrophagen und MDSC) erfolgte mittels FACS und FlowJo-Software, wie nachfolgend in Abbildung 44 dargestellt.

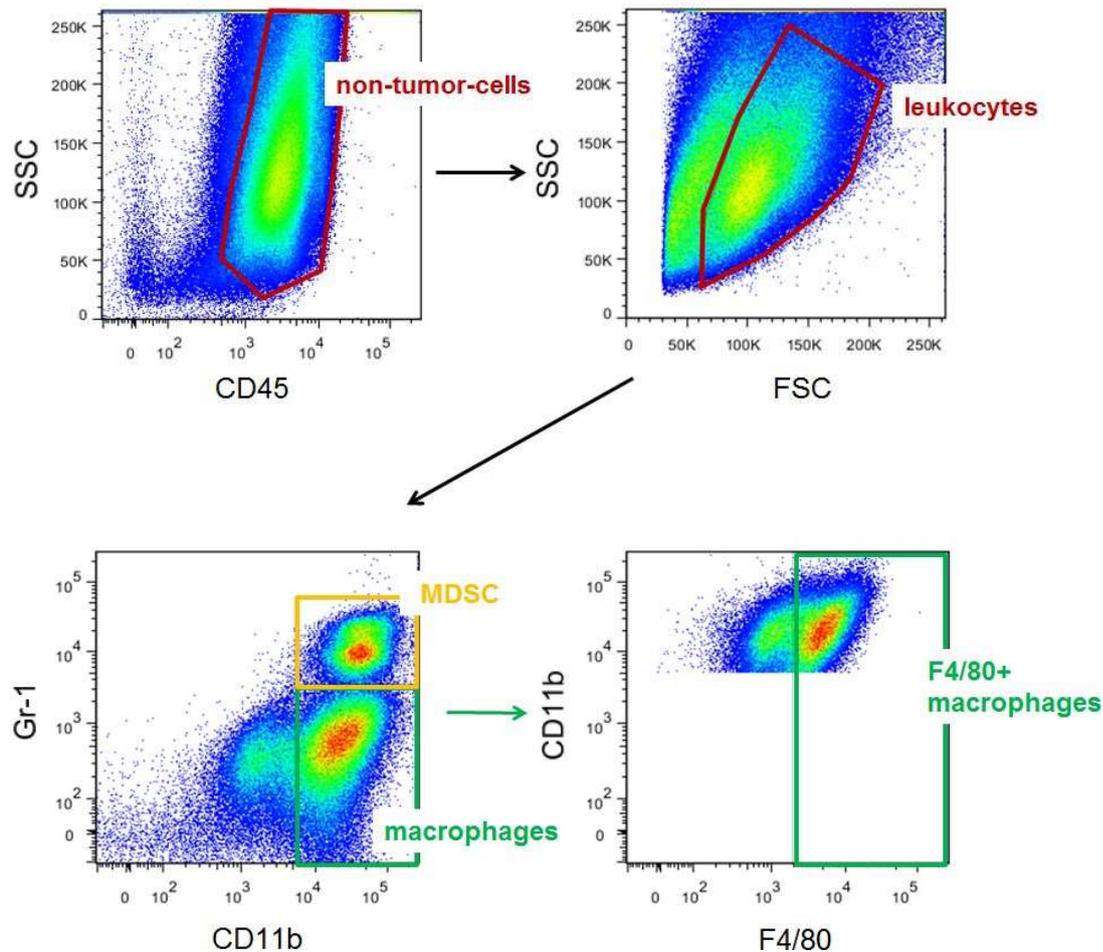


Abbildung 44: Auswertungsstrategie zur Erfassung von Makrophagen und MDSC ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen im FACS mittels FlowJo-Software. CD45⁺-Leukozyten wurden durch die Betrachtung der CD11b- und Gr-1-Expression in Makrophagen und MDSC geteilt.

Die im FACS ermittelten Anteile an Makrophagen in WT- und KO-Mäusen sind statistisch in Abbildung 45, die Makrophagenanteile bezogen auf die jeweilige Therapie in Abbildung 46 dargestellt. Dabei konnten höhere Anteile an Makrophagen in WT- als in KO-Mäusen vermutet, aber aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfangs nicht statistisch abgesichert werden. Betrachtet man die WT- und KO-Untersuchungen getrennt voneinander, waren zwischen den Behandlungs- und Kontrollgruppen keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

len. Diese Befunde lassen zumindest vermuten, dass Makrophagen in WT-Mäusen unter Einfluss von B7-H1 unabhängig von der Behandlung in höherem Maße vorkommen.

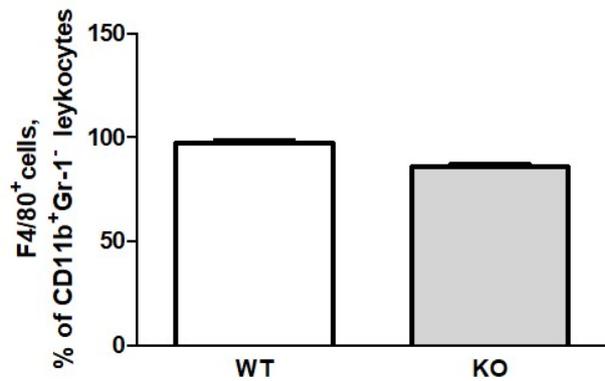


Abbildung 45: Gesamtanteile an Makrophagen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (n=2-3).

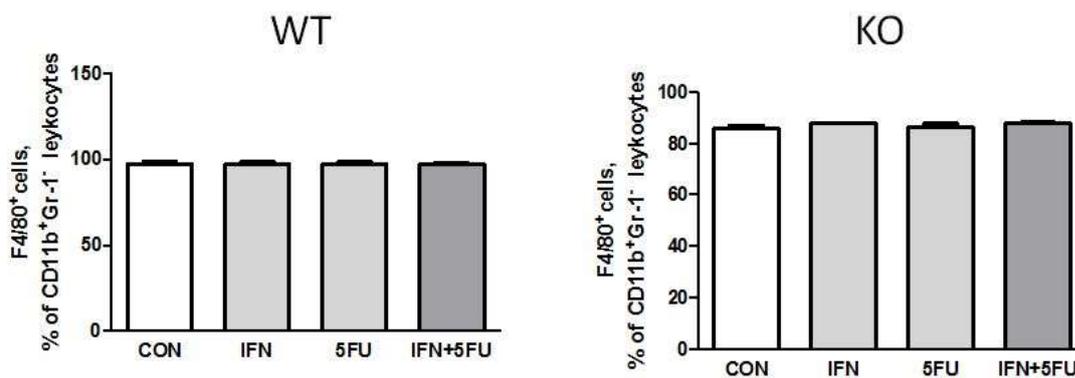


Abbildung 46: Anteile an Makrophagen aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON). Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Therapiegruppen gegen CON) (n=2-3).

3.3.2 MDSC-Konzentrationen in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren von WT-/KO-Mäusen

Beim Vergleich der analysierten MDSC-Konzentrationen in WT- und KO-Mäusen, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied dargestellt werden (Abbildung 47). Der Anteil an MDSC hatte sich folglich im Gegensatz zum Anteil der Makrophagen nicht signifikant unter Einfluss von B7-H1 (WT-Maus) erhöht.

Die in Abbildung 48 dargestellten Anteile an MDSC in jeweils WT- und KO-Mäusen unter Einfluss von den oben genannten Behandlungen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

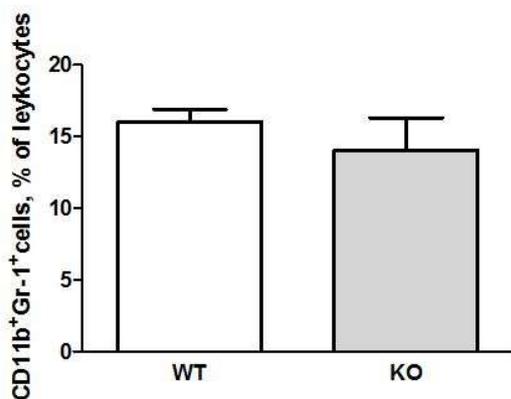


Abbildung 47: Gesamtanteile an MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich. Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (n=2-3).

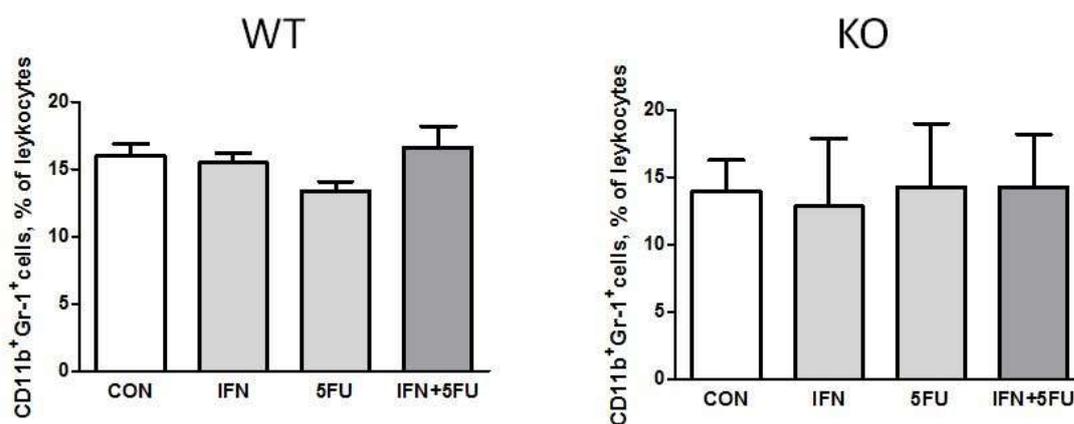


Abbildung 48: Anteile an MDSC aus mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON). Die Analyse der Zellen erfolgte im FACS. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Therapiegruppen gegen CON; n=2-3).

3.3.3 B7-H1-/B7-DC-Expression auf mit IFN-, 5FU- und IFN+5FU-behandelter Makrophagen in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen

Auf den ermittelten Makrophagen der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde mittels FlowJo weiterhin die B7-H1-Expression auf Zellen aus WT-Mäusen, bzw. die B7-DC-Expression auf Zellen aus KO-Mäusen ermittelt (Abbildung 49).

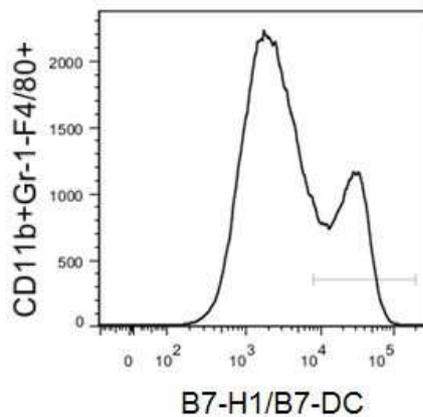


Abbildung 49: Auswertungsstrategie zur Erfassung von B7-H1/B7-DC auf Makrophagen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im FACS. Auf den vorab analysierten Makrophagen wurde die Expression von B7-H1 (WT-Mäuse) bzw. B7-DC (KO-Mäuse) mittels FlowJo-Software erfasst.

Dabei war kein signifikanter Unterschied in der Konzentration B7-H1-exprimierender Makrophagen im Hinblick auf die angewandten Therapeutika festzustellen (Abbildung 50). Betrachtet man die MFI dieser Zellpopulationen waren ebenfalls keine Veränderungen festzustellen. Auch die Ergebnisse in KO-Mäusen waren nicht signifikant unterschiedlich.

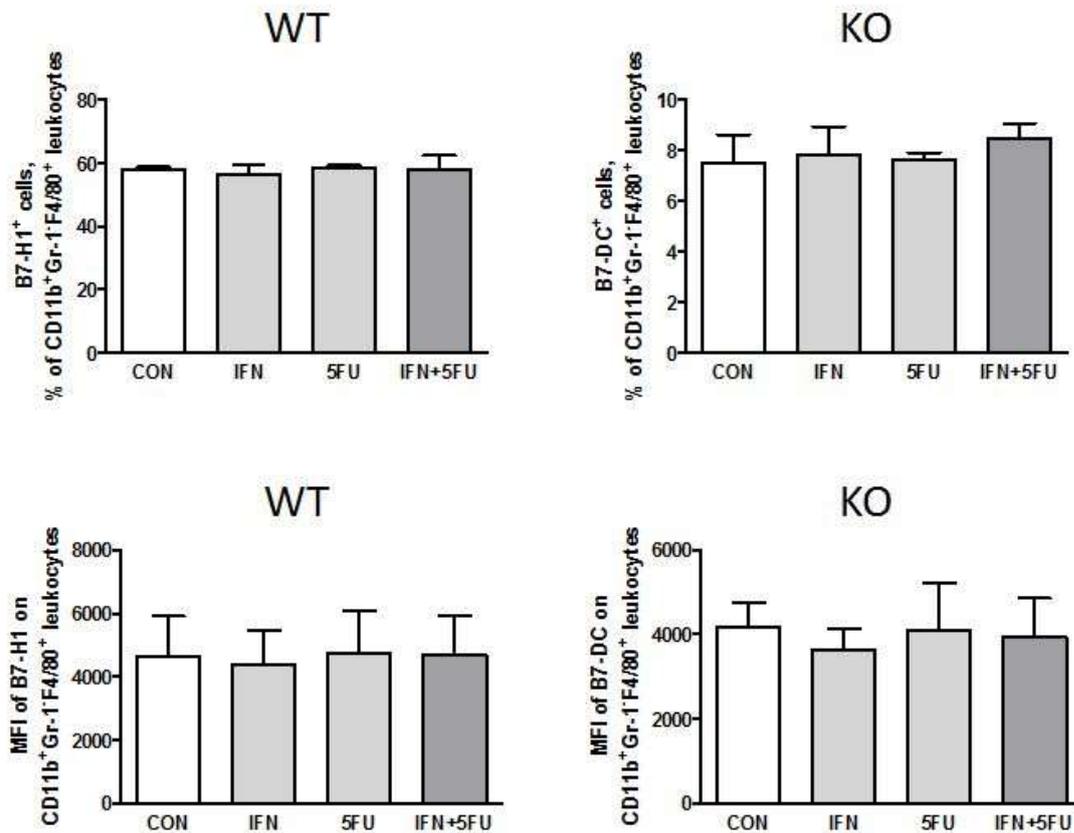


Abbildung 50: B7-H1-/B7-DC-Expression auf mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Makrophagen aus Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON) im FACS. Durch Inkubation aus Tumoren isolierter CD11b⁺-Zellen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper wurde die Expression von B7-H1/B7-DC auf Makrophagen quantifiziert (Anteil der exprimierenden Zellen sowie die Höhe der Expression (MFI)). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Therapiegruppen gegen CON; n=2-3).

3.3.4 B7-H1-/B7-DC-Expression mit IFN-, 5FU- und IFN+5FU-behandelter MDSC in Tumoren aus WT- und KO-Mäusen

Vergleichend zu 3.3.3 ist in Abbildung 51 die Expression von B7-H1 bzw. B7-DC auf MDSC dargestellt. Betrachtet man die Ergebnisse, ließen sich weder in WT- noch in KO-Mäusen und unabhängig von der angewandten Behandlung signifikante Unterschiede in der Expression von B7-H1/B7-DC feststellen.

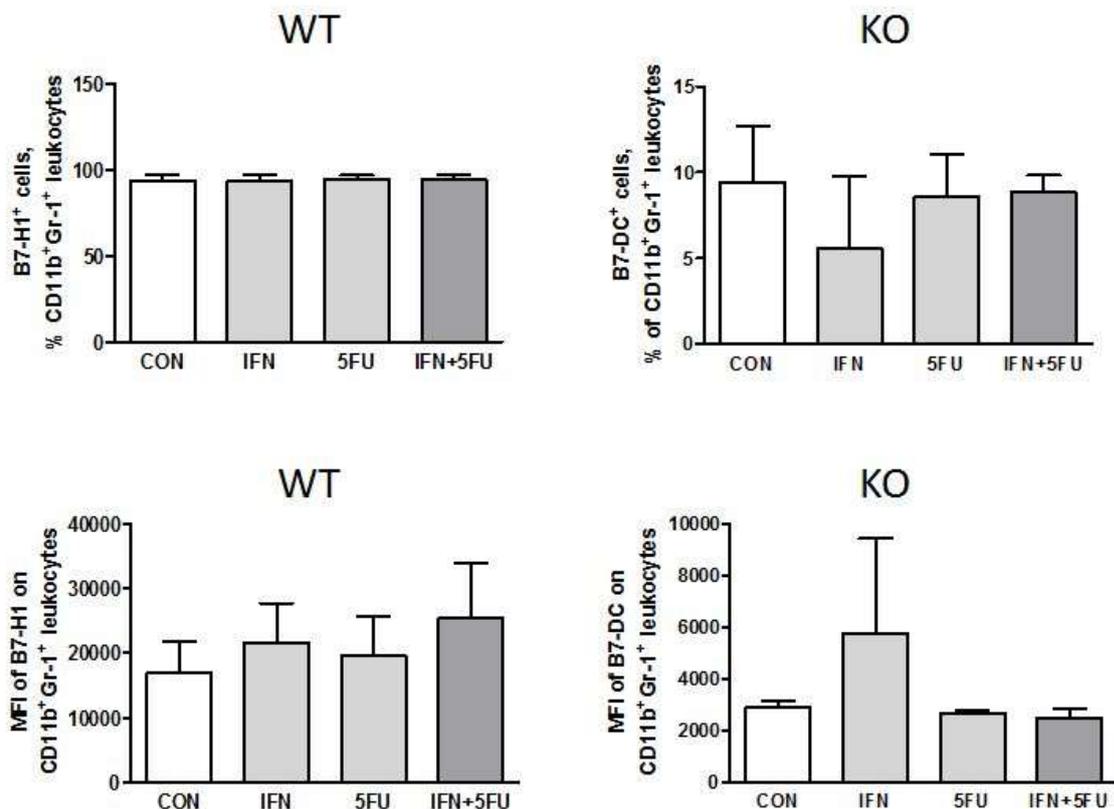


Abbildung 51: B7-H1-/B7-DC-Expression auf mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten MDSC aus Tumoren von WT-/KO-Mäusen bzw. ohne Behandlung (CON) im FACS. Durch Inkubation aus Tumoren isolierter CD11b⁺-Zellen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper wurde die Expression von B7-H1/B7-DC auf MDSC quantifiziert (Anteile der exprimierenden Zellen sowie die Höhe der Expression (MFI)). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Therapiegruppen gegen CON; n=2-3).

3.3.5 Phagozytoseaktivität von Makrophagen in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen

Die Erfassung der Anteile an phagozytierenden Makrophagen erfolgte im FACS, durch Messung spezieller fluoreszierender Beads, welche während einstündiger Inkubation von den Makrophagen phagozytiert wurden. Die Darstellung und Auswertung in der FlowJo-Software sind beispielhaft in Abbildung 52 dargestellt. Jeder Peak stellt dabei die Phagozytose eines Beads dar, die Höhe der Peaks die Zahl an Makrophagen, die entsprechend einen, zwei oder mehr Beads phagozytiert haben. Es wurde bei der statistischen Auswertung jedoch nur die Summe aller phagozytotisch aktiven Makrophagen betrachtet ohne qualitative Betrachtung der Phagozytose-Intensität des Einzelmakrophagen.

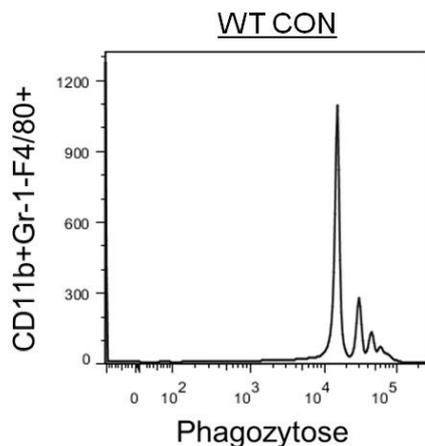


Abbildung 52: Beispiel für die Auswertung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen aus tumortragenden WT-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. keiner Behandlung (CON) im FACS. Die Darstellung erfolgte mittels FlowJo-Software. Die Peaks stellen die Anzahl phagozytierter Beads pro Zelle dar. Die Konzentration an phagozytierenden Makrophagen wird durch die Amplitude des Peaks dargestellt.

Der Anteil phagozytierender Makrophagen zeigte sich in KO- signifikant höher als in WT-Tumoren (Abbildung 53). Die Experimente mit WT-Mäusen zeigten einen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der 5FU-Gruppe mit signifikant höherem Anteil phagozytierender Makrophagen unter Therapie mit 5FU. Die in Abbildung 54 dargestellten Ergebnisse ließen keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Phagozytoseaktivität in KO-Mäusen unter Einfluss der verschiedenen Behandlungen erkennen.

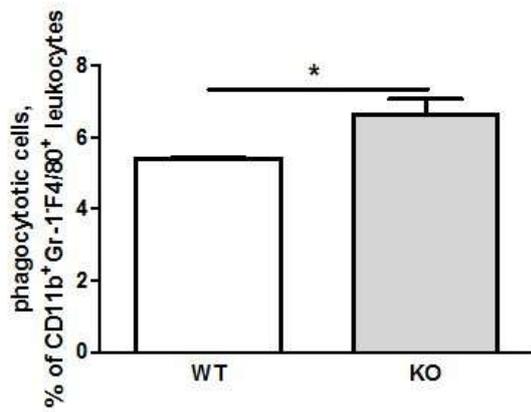


Abbildung 53: Gesamtanteile phagozytotisch aktiver Makrophagen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich. Die Analyse erfolgte im FACS nach Inkubation aus Tumoren isolierter CD11b⁺-Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (n=3), * - P < 0,05.

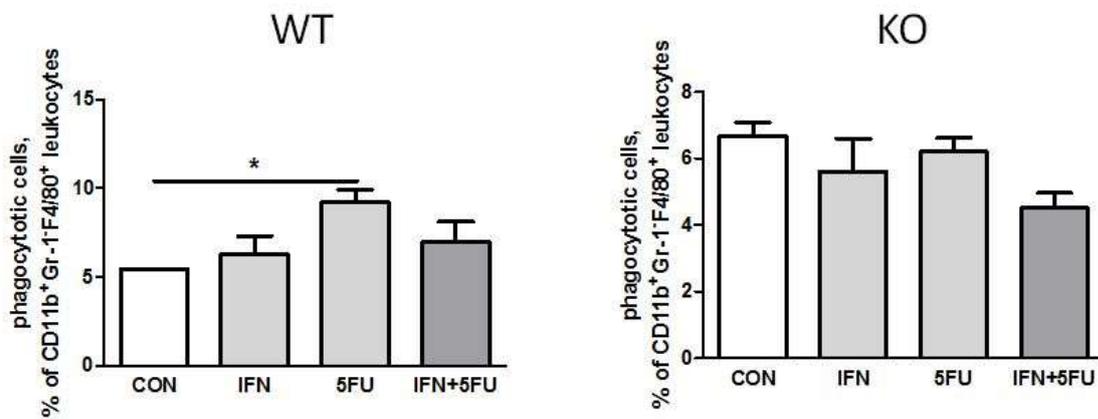


Abbildung 54: Anteile phagozytotisch aktiver Makrophagen aus Tumoren von WT-/KO-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Behandlung (CON). Die Analyse erfolgte im FACS nach Inkubation aus Tumoren isolierter CD11b⁺-Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Therapiegruppen gegen CON; n=3), * - P < 0,05.

3.3.6 Phagozytoseaktivität von MDSC in mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten Tumoren aus WT- und KO-Mäusen

Betrachtet man die Anteile phagozytischer MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen, konnte ein signifikant höherer Anteil phagozytischer MDSC in KO-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 55). In WT-Mäusen zeigte sich ein signifikant höherer Anteil phagozytischer MDSC unter dem Einfluss der Therapie mit 5FU (Abbildung 56). Die gleiche Beobachtung konnte in KO-Mäusen gemacht werden.

Im Vergleich zum Anteil phagozytischer Makrophagen aus Kapitel 3.3.5 waren der Gesamtanteil an phagozytischer MDSC deutlich höher. Zudem zeigte sich bei Makrophagen und MDSC eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität in WT-Mäusen unter Behandlung mit 5FU, welche sich bei MDSC aber auch in KO-Mäusen zeigte.

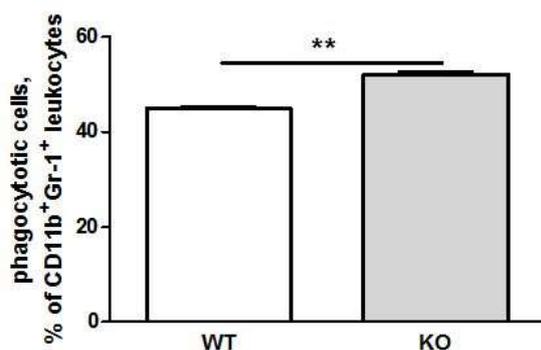


Abbildung 55: Gesamtanteile phagozytisch aktiver MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen im Vergleich. Die Analyse erfolgte im FACS nach Inkubation aus Tumoren isolierter CD11b⁺-Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (n=3), ** - P < 0,01.

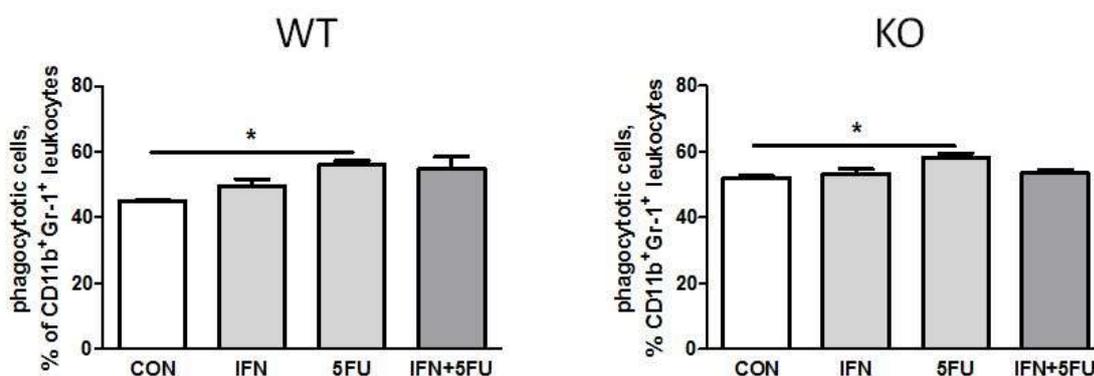


Abbildung 56: Anteile phagozytisch aktiver MDSC aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen unter Behandlung mit IFN, 5FU und IFN+5FU bzw. ohne Behandlung (CON). Die Analyse erfolgte im FACS nach Inkubation aus Tumoren isolierter CD11b⁺-Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (Therapiegruppen gegen CON; n=3), * - P < 0,05.

3.3.7 Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen der mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten CD11b⁺-Zellen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen

Die Analyse der Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels Luminex-Technologie. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 57-59 dargestellt.

In WT-Maus-Kulturansätzen (Abbildung 57) zeigte IL-2 einen signifikanten Anstieg zwischen der Kontroll- und der mit IFN behandelten Gruppe. Der Anteil an TGF- β war in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der IFN+5FU-behandelten Gruppe. Die Messungen von VEGF ergaben einen signifikanten Anstieg der Zytokinkonzentration unter Behandlung mit 5FU sowie eine signifikante Verringerung bei der Behandlung mit IFN. IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10 und IL-17 zeigten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Behandlungs- und der Kontrollgruppe. Die Analyse der Zytokinkonzentrationen in KO-Maus-Kulturansätzen (Abbildung 58) zeigte lediglich einen signifikant erhöhten Anteil an IL-6 unter Behandlung mit IFN+5FU.

Zusammenfassend sind die Veränderungen der Zytokinkonzentrationen unter Einfluss der Therapien im Vergleich zur WT-/KO-Kontrollgruppe in Tabelle 25 dargestellt. Es zeigten sich insgesamt nur wenig signifikante Veränderungen, die vorrangig in WT-Maus-Kulturansätzen zu beobachten waren. Die Therapie mit 5FU und IFN zeigte hierbei gegenteilige Wirkung auf die Konzentration von VEGF (erhöht unter Therapie mit 5FU, verringert unter IFN).

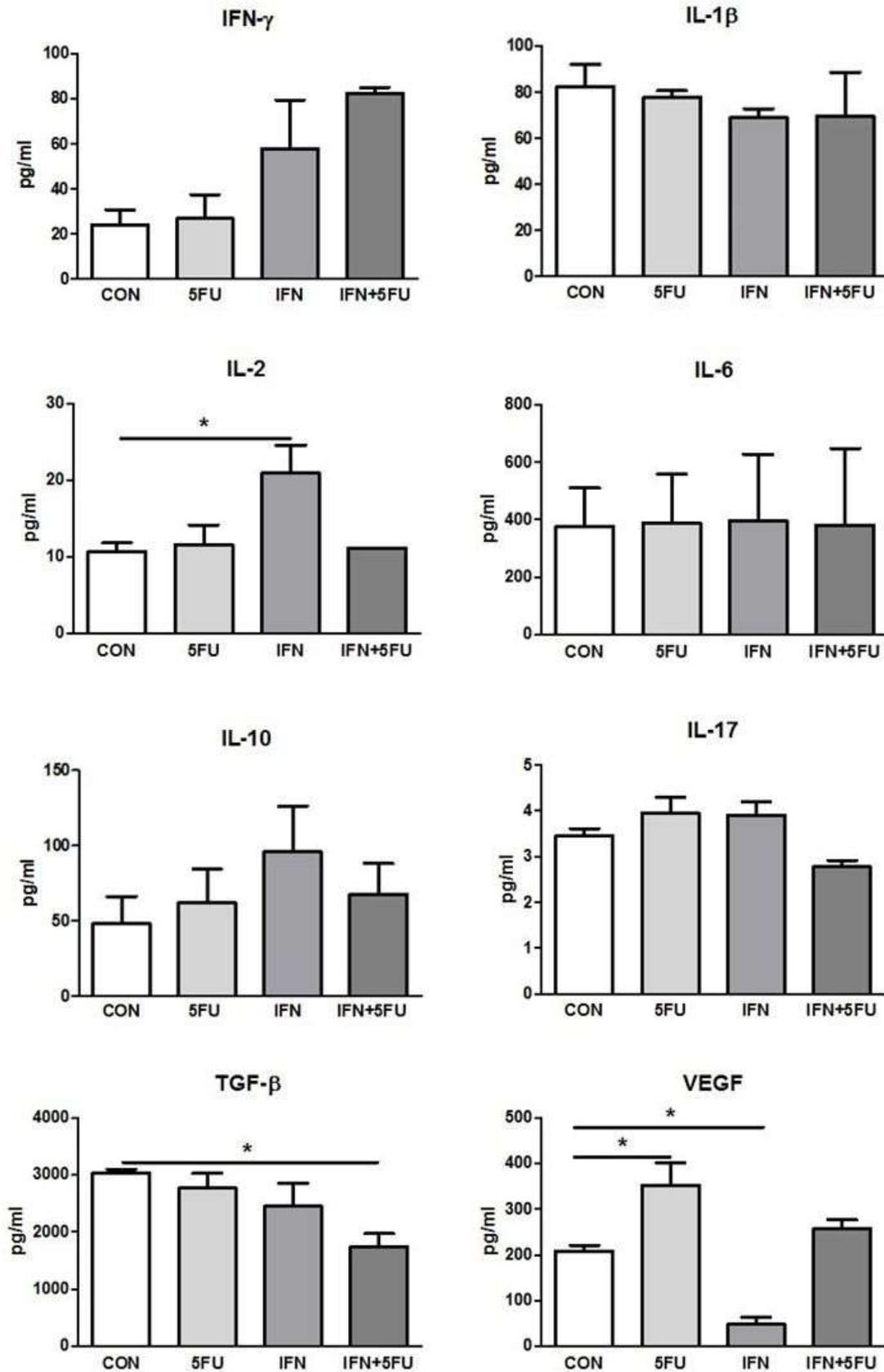


Abbildung 57: Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen von mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex vivo behandelten CD11b⁺-Zellen aus Tumoren von WT-Mäusen. Die Zytokinmessung erfolgte mittels Luminex. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON; n=4), * - P < 0,05.

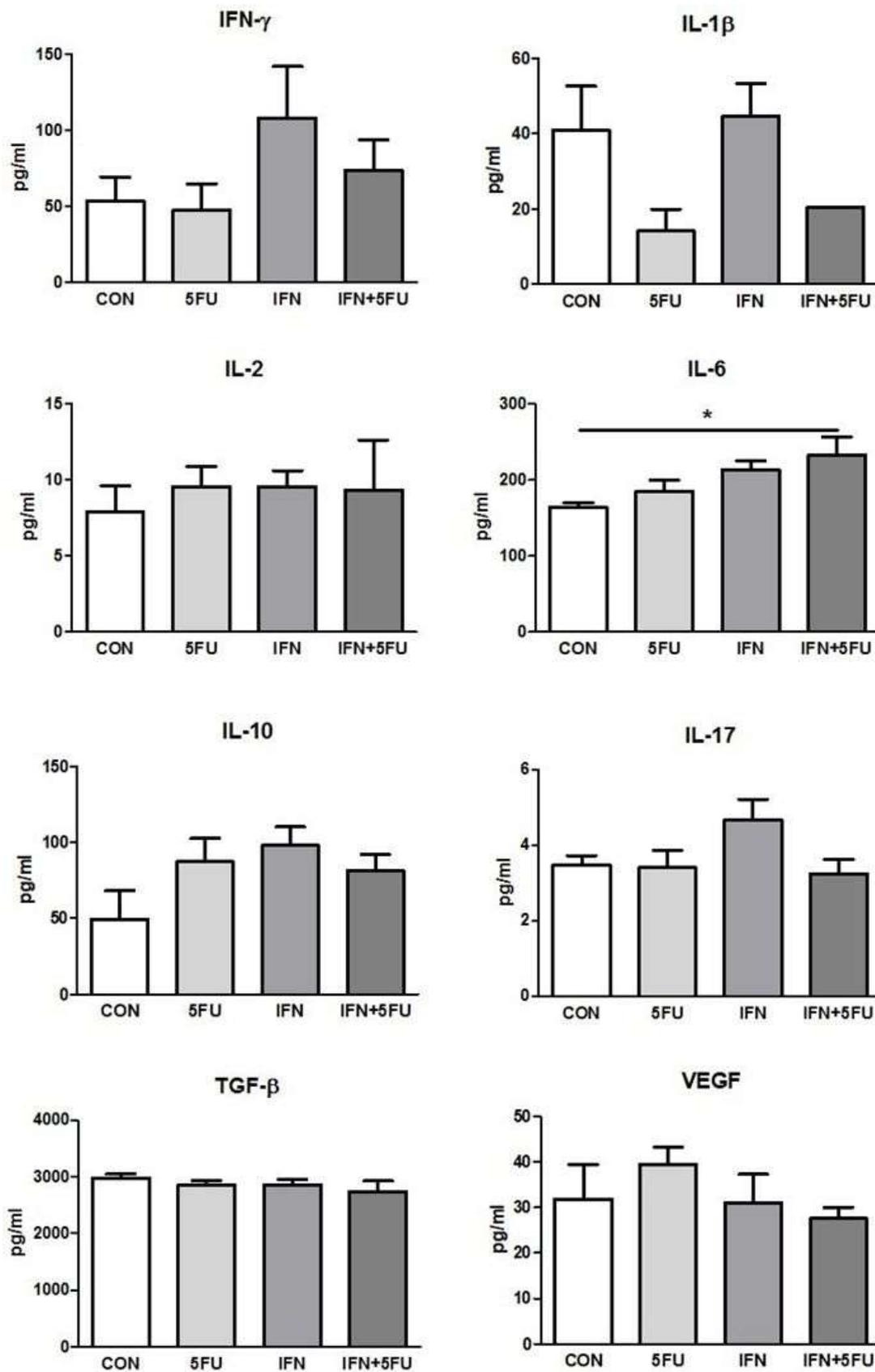


Abbildung 58: Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen von mit IFN, 5FU und IFN+5FU ex-vivo behandelten CD11b⁺-Zellen aus Tumoren von KO-Mäusen. Die Zytokinmessung erfolgte mittels Luminex. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (Therapiegruppen gegen CON; n=4), * - P < 0,05.

Tabelle 25: Vergleichende Darstellung der Zytokinkonzentrationen aus Abbildung 57 und 58

Therapiegruppe	WT	KO
5FU	VEGF ↑	
IFN	IL-2 ↑ VEGF ↓	
IFN+5FU	TGF-β ↓	IL-6 ↑

Dargestellt sind die im Vergleich zur WT-/KO-Kontrollgruppe signifikant erhöhten oder verringerten Anteile einzelner Zytokine.

Nachfolgend wurden die Zytokinmessungen der Kontrollgruppen (CON, ohne Therapie) von CD11b⁺-Zellen tumortragender WT- und KO-Mäusen mittels *t*-Test ausgewertet (Abbildung 59). Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an IFN-γ in KO-Maus-Kulturansätzen. IL-1β, IL-6 und VEGF zeigten hingegen eine signifikant geringere Konzentration in KO- als in WT-Maus-Kulturansätzen.

Zusammenfassend zeigte sich die Konzentration an VEGF ohne Einfluss von B7-H1 signifikant verringert. Unter der Behandlung mit IFN zeigte sich in CD11b⁺-Zellen tumortragender WT-Mäuse ebenfalls ein verringerter Anteil an VEGF und unter 5FU erhöhte sich dieser signifikant. Lediglich die Kombinationstherapie von IFN+5FU hatte in KO-Maus-Kulturansätzen Einfluss auf eine signifikant veränderte Zytokinexpression in CD11b⁺-Zellen. Diese erhöhte signifikant die Konzentration von IL-6.

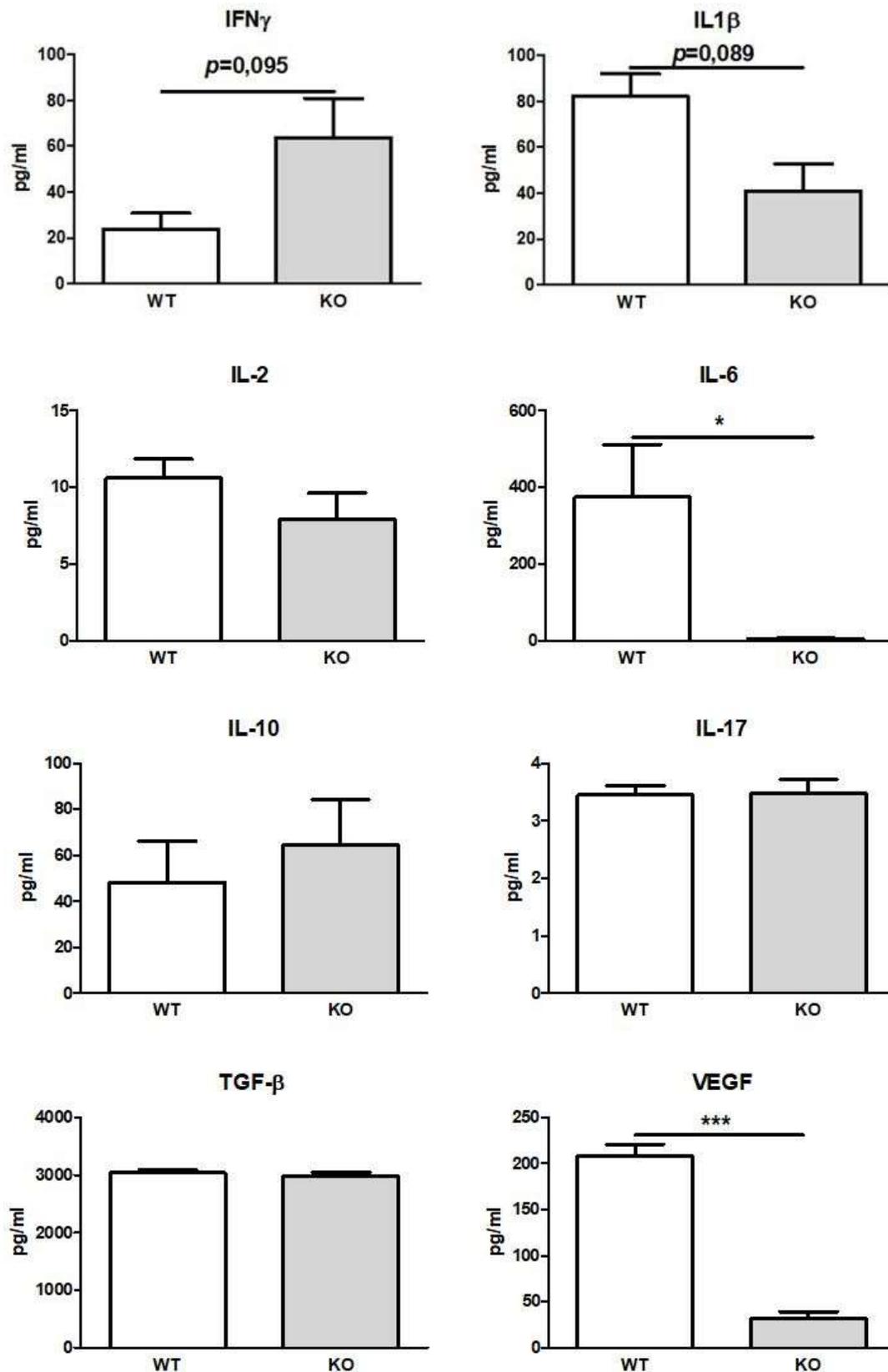


Abbildung 59: Vergleichende Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen der Kontrollgruppen (ohne Therapie) ex vivo behandelter CD11b⁺-Zellen aus Tumoren von WT- und KO-Mäusen. Die Zytokinmessung erfolgte mittels Luminex ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (n=4), - P = 0,095, - P = 0,089, * - P < 0,05, *** - P < 0,001.

3.4 Untersuchung des proliferativen Einflusses von CD11b⁺Gr-1-Zellen tumortragender WT-Mäuse auf naive CD4⁺-T-Zellen

Wie in Kapitel 3.3.5 und 3.3.7 bereits gezeigt, haben Makrophagen im PDA nicht nur eine hohe Phagozytoseaktivität, sie beeinflussen auch das Tumormilieu durch veränderte Expression von Zytokinen. Um den Einfluss von Makrophagen auf die Immunlage im PDA möglichst umfassend zu klären, beschäftigte sich diese Versuchsreihe mit dem Effekt von Makrophagen auf CD4⁺-T-Zellen. Genauer sollte dabei ein Einfluss auf deren Proliferation untersucht werden.

Es wurden 8 Wochen alten WT-Mäusen Panc02-Zellen implantiert. Nach weiteren 4 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und ihnen Primärtumoren entnommen. Es wurden ebenfalls gesunde, adulte WT-Mäuse euthanasiert und ihnen Milzen entnommen. Tumoren und Milzen wurden in Einzelzellsuspensionen überführt und aus den Tumoren CD11b⁺Gr-1-Zellen (Makrophagen) mittels MACS isoliert.

Splenozyten und Makrophagen wurden in Standard-Kulturmedium aufgenommen und in Kultur verbracht. Folgende Ansätze wurden dabei gewählt (siehe Tabelle 26):

Tabelle 26: Erläuterung der gewählten Kulturansätze und deren weiterfolgend verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Kulturansatz
- act	WT- Splenozyten nicht aktiviert
- act + m	WT-Splenozyten nicht aktiviert + WT-Makrophagen
+ act	Splenozyten aktiviert
+ act + m	WT-Splenozyten aktiviert + WT-Makrophagen

Nach einer Stunde Inkubation erfolgte die Aktivierung (siehe Kapitel 2.3.17). Die Kulturansätze wurden nach 72h Inkubation gewonnen und die Zellen mittels FACS analysiert. Aus Mediumüberständen der inkubierten Kulturansätze wurden Zytokinkonzentrationen mittels Luminex ermittelt.

3.4.1 Einfluss von CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen tumortragender WT-Mäuse auf CD4⁺-T-Zellen gesunder WT-Mäuse

Die Analyse der Zellkulturen auf CD4⁺-T-Zellen und ihre Subpopulationen erfolgte mittels FACS. Die Auswertungsstrategie mittels FlowJo-Software ist in Abbildung 60 dargestellt.

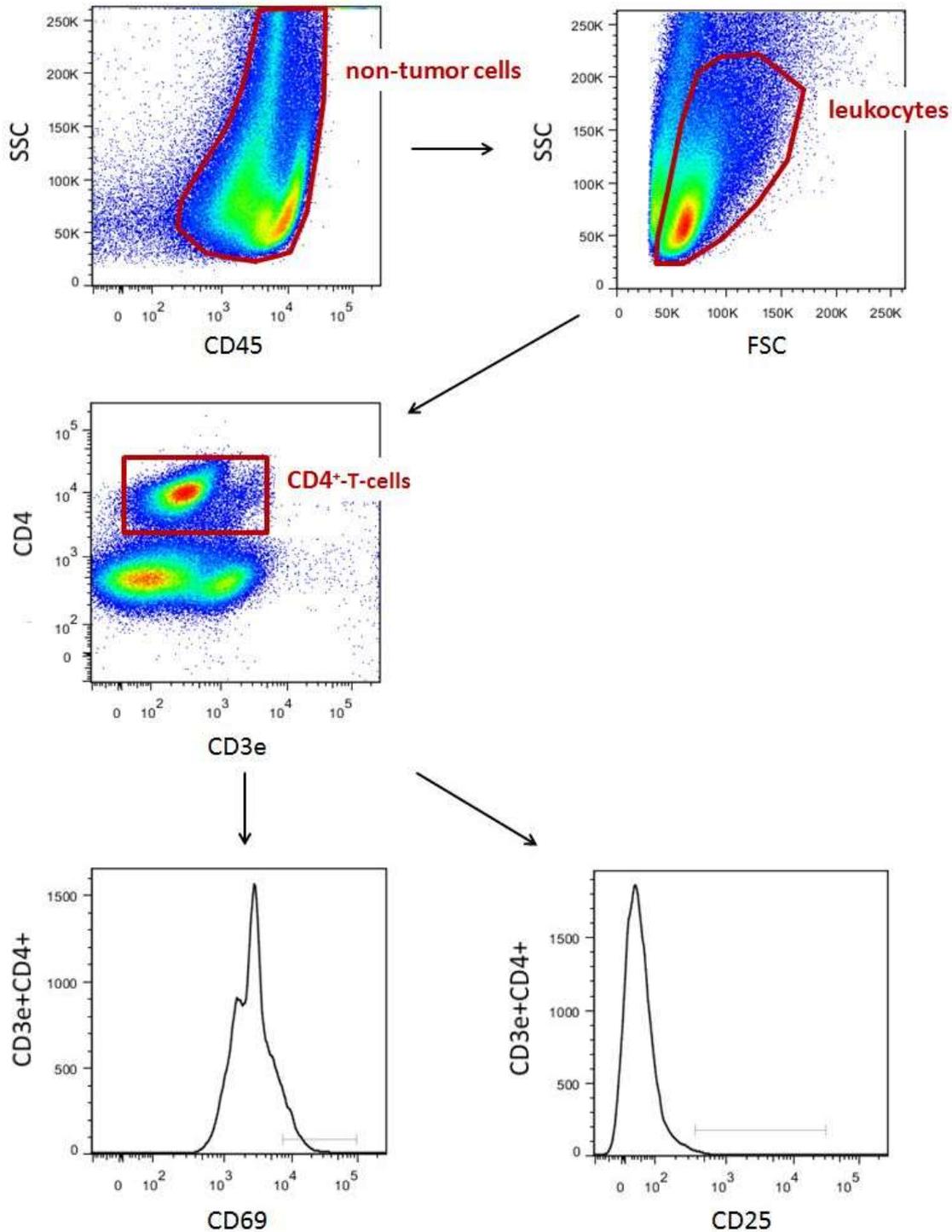


Abbildung 60: Auswertungsstrategie zur Erfassung von CD25 und CD69 auf CD4⁺-T-Zellen aus WT-Mäusen im FACS. Die Darstellung und Auswertung erfolgten mittels FlowJo-Software.

Der in Abbildung 61 dargestellte Anteil an CD4⁺-T-Zellen zeigte unter Einfluss der Aktivierung mittels CD3- und CD28-Antikörpern eine signifikante Erhöhung. Wurden aktivierte Splenozyten jedoch mit Makrophagen kokultiviert, verringerte sich der Anteil an CD4⁺-T-Zellen signifikant. Die Expression von CD25 auf CD4⁺-T-Zellen nahm ebenfalls signifikant bei Aktivierung zu, was sich auch im Vergleich aktivierter und nicht aktivierter Kokulturen mit Makrophagen zeigte. Sie erhöhte sich zusätzlich signifikant in der aktivierten Kokultur mit Makrophagen im Vergleich zur nicht aktivierten Splenozyten-Kultur. Es konnte eine Tendenz ($p=0.11$) hinsichtlich einer erhöhten CD25-Expression durch Kokultivierung aktivierter Splenozyten mit Makrophagen gezeigt werden. Es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD69, weder unter Einfluss der Aktivierung noch unter Kokultur mit Makrophagen tumortragender WT-Mäuse.

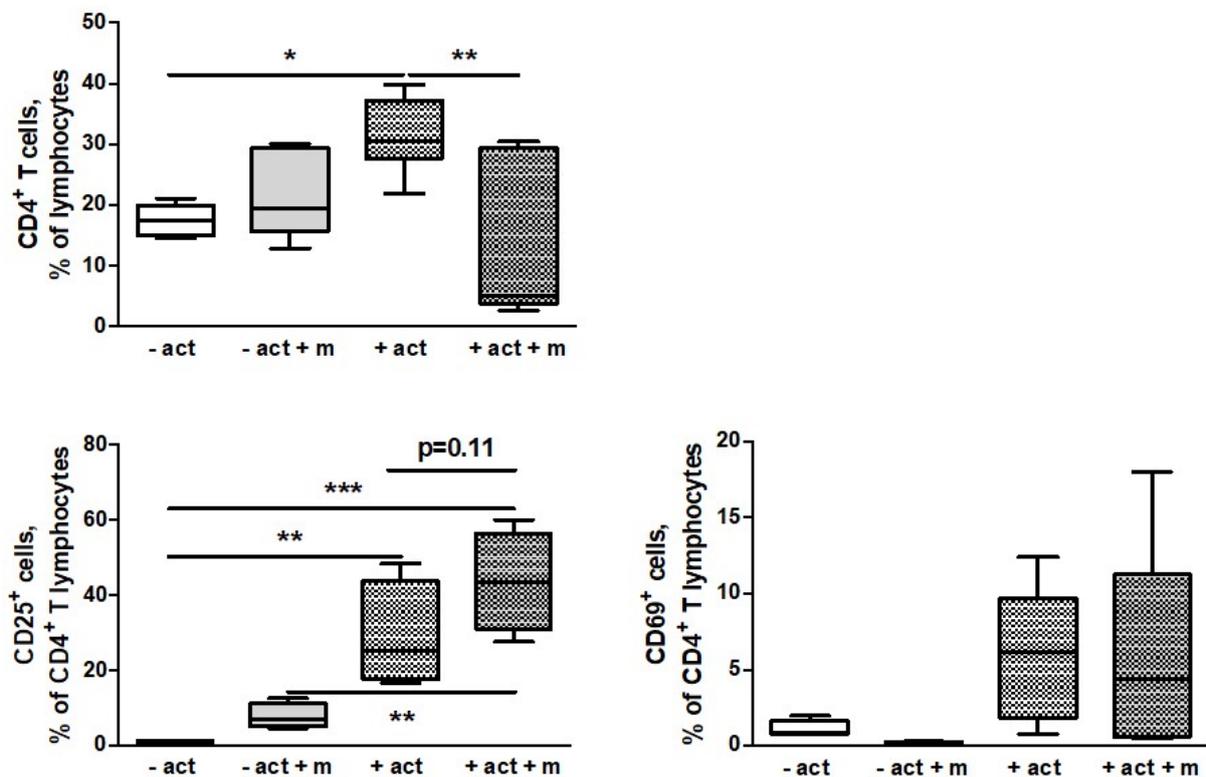


Abbildung 61: Expression von CD4⁺-T-Zellen und ihrer CD25⁺- und CD69⁺-Subpopulationen nach 72h Inkubation mit und ohne Aktivierung (- act, + act) sowie mit und ohne Kokultivierung mit CD11b⁺Gr-1⁺-Zellen tumortragender WT-Mäuse (- m, + m). Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Dunnett's Test (n=6-12); $P = 0,11$, * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$, *** - $P < 0,001$.

3.4.2 Einfluss von CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen tumortragender WT-Mäuse auf die Proliferation von Splenozyten gesunder WT-Mäuse

Der Einfluss von Makrophagen auf die Proliferation von CD4⁺-T-Zellen wurde anhand der in 3.4 genannten Zellkulturansätze geprüft. Zur Messung der Proliferation im FACS wurde der fluoreszierende Farbstoff CFSE verwendet, welcher von den Zellen aufgenommen und bei Zellteilung auf die Tochterzellen gleichmäßig verteilt wird. Die dadurch entstehende Abnahme der Fluoreszenz lässt sich im FACS als neuer Peak auf der X-Achse darstellen. Die Höhe dieses Peaks steht für die Anzahl an Zellen dieser Generation. Die Abbildung 62 zeigt beispielhaft die Auswertung der Proliferation in der FlowJo-Software, wobei aktivierte Splenozyten (blaue Kurve) und aktivierte Splenozyten in Kokultur mit Makrophagen (rote Kurve) vergleichend dargestellt sind.

In Abbildung 63 ist die Proliferation von CD4⁺-T-Zellen unter/ohne aktivierenden Einfluss von CD3- und CD28-Antikörpern und/oder der Kokultivierung mit Makrophagen aus Tumoren dargestellt. Es zeigten sich signifikante Verringerungen der ungeteilten Zellen nach Aktivierung, jedoch nicht beim Vergleich der Ansätze „-act“ mit „-act + m“ und „+act“, mit „+act + m“. Auch bei Betrachtung der ungeteilten aktivierten CD4⁺-T-Zellen mit und ohne Kokultur mit Makrophagen waren keine Veränderungen feststellbar. Makrophagen tumortragender WT-Mäuse zeigten demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von Splenozyten aus gesunden WT-Mäusen.

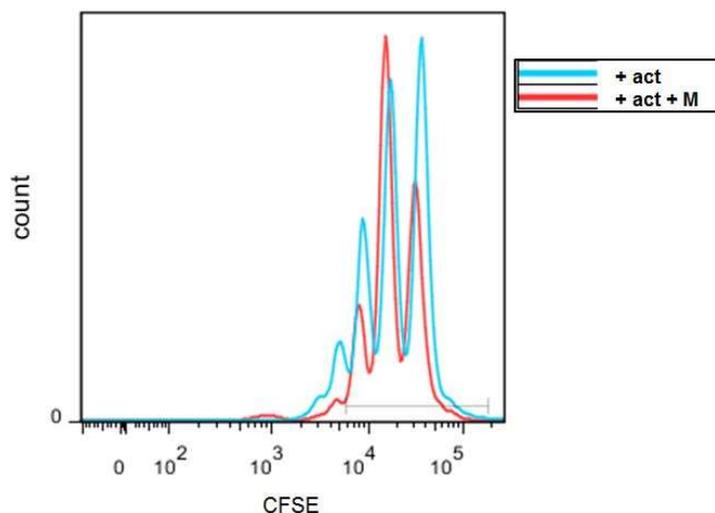


Abbildung 62: Proliferation aktivierter CD4⁺-T-Zellen im FACS mit (rot) und ohne (blau) Kokultur mit Makrophagen. Die Darstellung und Auswertung erfolgten mittels FlowJo-Software. Nach vorheriger Inkubation mit CFSE kommt es bei der Zellteilung zur Aufteilung dieses Farbstoffes auf die Tochterzellen, wodurch die messbare Fluoreszenz abnimmt. Die Amplitude des Peaks gibt die Menge an CD4⁺-T-Zellen an.

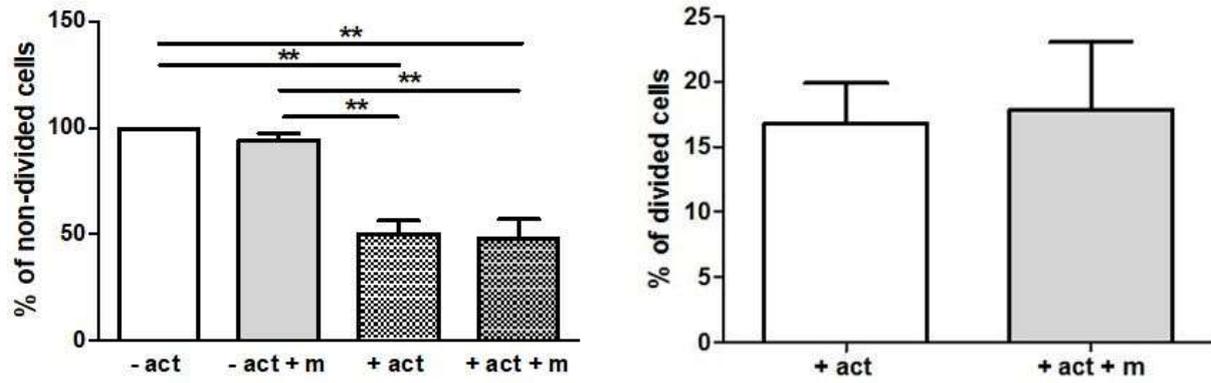
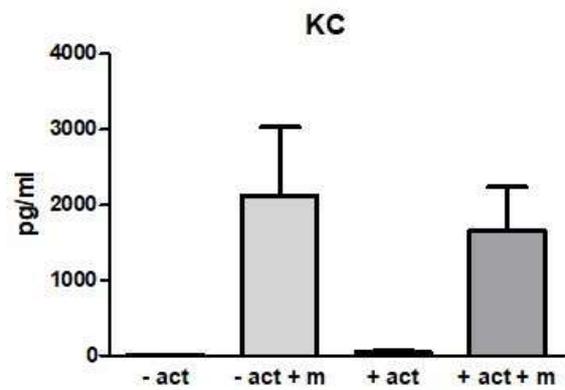
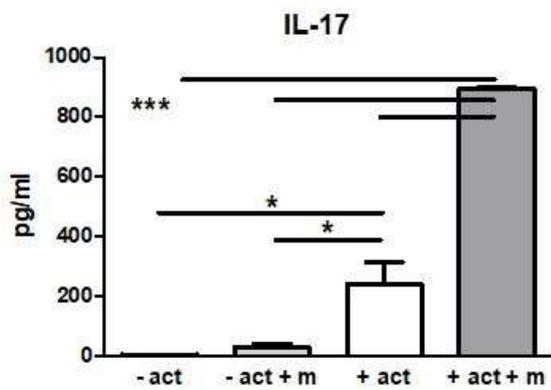
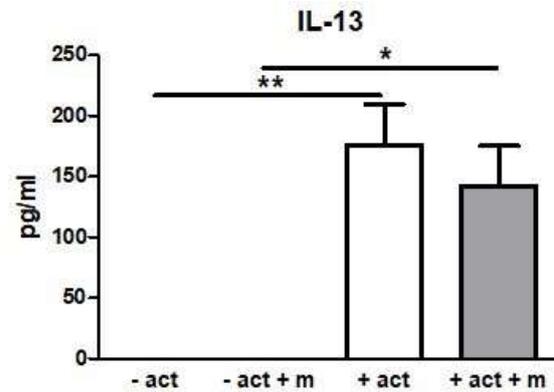
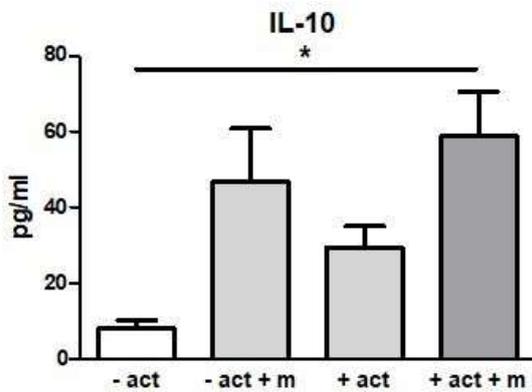
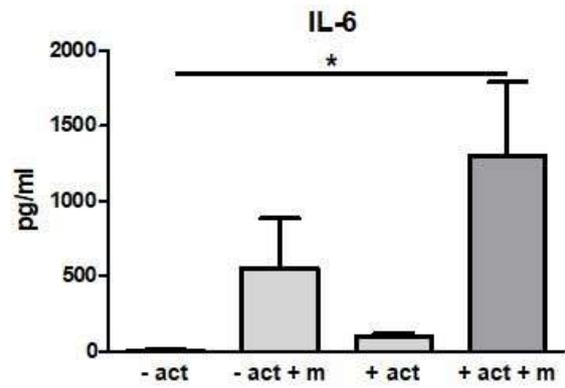
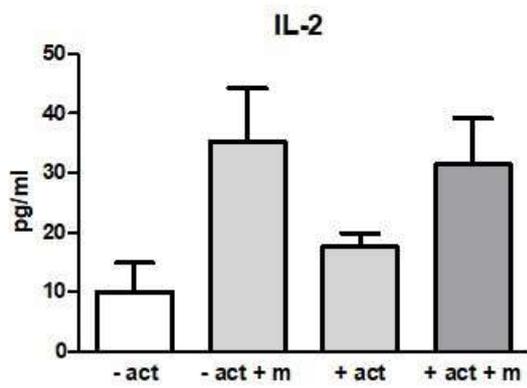
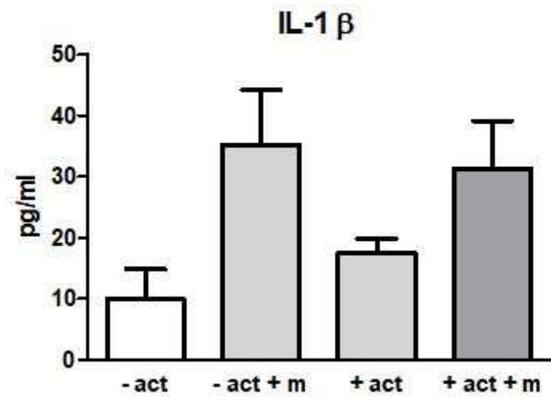
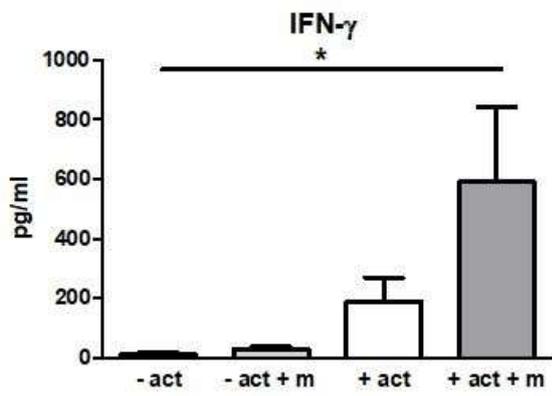


Abbildung 63: CD4⁺-T-Zellproliferation gesunder WT-Mäuse unter dem Einfluss von Makrophagen tumortragender WT-Mäuse. Vergleich ungeteilter und geteilter CD4⁺-T-Zellen nach 72h Inkubation mit und ohne Aktivierung (- act, + act) und mit und ohne Kokultivierung mit CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen tumortragender WT-Mäuse (- m, + m). Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Tukey's Test bzw. t-Test (links n=2-4, rechts n=9-11); ** - P <0,01.

3.4.3 Einfluss von CD11b⁺Gr-1⁻-Zellen tumortragender WT-Mäuse auf die Zytokinkonzentrationen in Kulturen mit Splenozyten gesunder WT-Mäuse

Betrachtet man die Zytokinexpression dieser Versuchsreihe in der Abbildung 64 und zusammenfassend in Tabelle 27, lassen sich einige Aussagen treffen. Durch die Aktivierung der Splenozytenkultur kam es zur signifikanten Erhöhung des Anteils an IL-13 und IL-17 im Vergleich zur nicht aktivierten Kultur. Ebenfalls signifikant erhöht war ihr Anteil beim Vergleich der aktivierten Kokultur zur nicht aktivierten Kokultur mit Makrophagen. Im Vergleich der nicht aktivierten Splenozyten- zur aktivierten Kokultur mit Makrophagen stiegen die Konzentrationen von IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-17 und TNF- α signifikant an. IL-17 zeigte zudem signifikante Erhöhung der Konzentration beim Vergleich der aktivierten Kokultur zur aktivierten Splenozytenkultur sowie der aktivierten Splenozyten- zur nicht aktivierten Kokultur. IL-1 β , IL-2, KC, TGF- β und VEGF zeigten keine signifikanten Konzentrationsveränderungen.

Wie in Tabelle 27 zusammengefasst kam es durch die Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle ausschließlich zur Erhöhung einiger Zytokinkonzentrationen. Dabei stieg der Anteil an IL-13 bei Aktivierung der Splenozyten- bzw. der Kokulturen (-act/+act, -act +m/+act +m). Beim Vergleich von Splenozyten- zu Kokulturansätzen bestanden keine signifikanten Veränderungen von IL-13. Die meisten Konzentrationsveränderungen der untersuchten Zytokine zeigten sich im Vergleich der nicht aktivierten Splenozyten- zur aktivierten Kokultur. Die IL-17-Konzentration war am häufigsten signifikant verändert, wobei sich sein Anteil erhöhte, wenn der verglichene Kulturansatz eine Aktivierung erfahren hatte, unabhängig davon, ob mit einer inaktivierten Splenozyten- oder Kokultur mit Makrophagen verglichen wurde. Der Vergleich der aktivierten Splenozyten- mit der aktivierten Kokultur zeigte jedoch ebenfalls eine signifikante Erhöhung der IL-17-Konzentration. Es kam zu keinen signifikanten Veränderungen der Zytokinkonzentrationen durch die Kokultur mit Makrophagen in nicht aktivierten Kulturen.



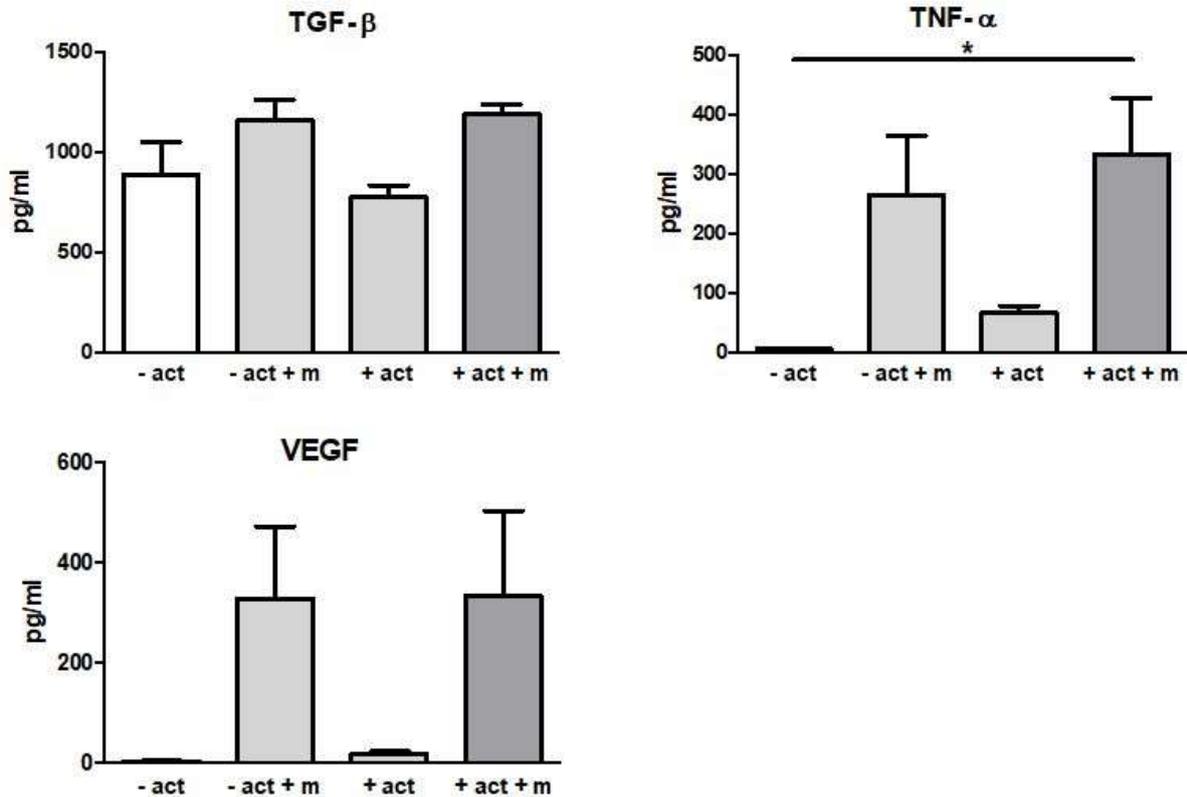


Abbildung 64: Zytokinkonzentrationen in Kulturmediumüberständen von CD11b⁺Gr-1-Zellen (Makrophagen) aus Tumoren von WT-Mäusen in Kokultur mit WT-Splenozyten und in Kulturen von WT-Splenozyten mit und ohne Aktivierung. Die Analyse erfolgte in Medienüberständen der Kulturen nach 72h Inkubation. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA Bonferroni Test (n=2-3), * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

Tabelle 27: Signifikante Veränderungen der Zytokinkonzentrationen bei Vergleich der vier gewählten Kulturansätze.

Vergleichsansätze	↑	Zytokine	↓
-act → +act		IL-13 IL-17	
-act → +act +m		IFN-γ IL-6 IL-10 IL-17 TNF-α	
+act → +act +m		IL-17	
-act +m → +act +m		IL-13 IL-17	
-act +m → +act		IL-17	

Die Tabelle zeigt zusammenfassend die signifikant erhöhten oder verringerten Zytokine aus Abbildung 64. Der Vergleich zwischen den Kulturansätzen ist mittels Pfeil (→) dargestellt.

3.5 Untersuchung der Auswirkungen der Blockierung von B7-H1 in tumortragenden WT-Mäusen auf ihre Überlebenszeit

In dieser Versuchsreihe wurde durch Blockierung von B7-H1 durch B7-H1-Antikörper dessen immunsuppressive Wirkung hinsichtlich der Überlebenszeit tumortragender WT-Mäuse untersucht. Um ein genaueres Bild der immunmodulierenden Prozesse dieser Erkrankung zu erhalten, wurden zudem Zytokinmessungen vorgenommen und alle Ergebnisse mit einer nicht therapierten, tumortragenden WT-Mausgruppe verglichen.

Dazu verwendete, tumortragende WT-Mäuse wurden p.op. mit B7-H1-Antikörpern, wie in Kapitel 2.3.7 erläutert, behandelt und ihre Todesdaten erfasst.

3.5.1 Überlebenszeit tumortragender Mäuse mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern

In der folgenden *Kaplan-Meier-Kurve* (Abbildung 65) wurden die Todeszeitpunkte der einzelnen Versuchstiere beider Untersuchungsgruppen festgehalten. Es ergab sich dadurch die Darstellung einer sogenannten Überlebenszeitkurve.

Die Ergebnisse in Abbildung 65 zeigen die Überlebenszeiten tumortragender WT-Mäuse mit (B7-H1-Ak) und ohne (CON) Therapie mit Antikörpern gegen B7-H1. Dabei war eine signifikant längere Überlebenszeit der mit B7-H1-Antikörpern therapierten Mausgruppe zu erkennen. Diese betrug 59,5 Tage p.op. (B7-H1-Ak), im Gegensatz zur nicht therapierten Kontrollgruppe (CON) mit 41 Tagen mittlerer Überlebenszeit. Das relative Sterberisiko einer Maus der Kontrollgruppe war damit 6,3-fach höher als das der Therapiegruppe.

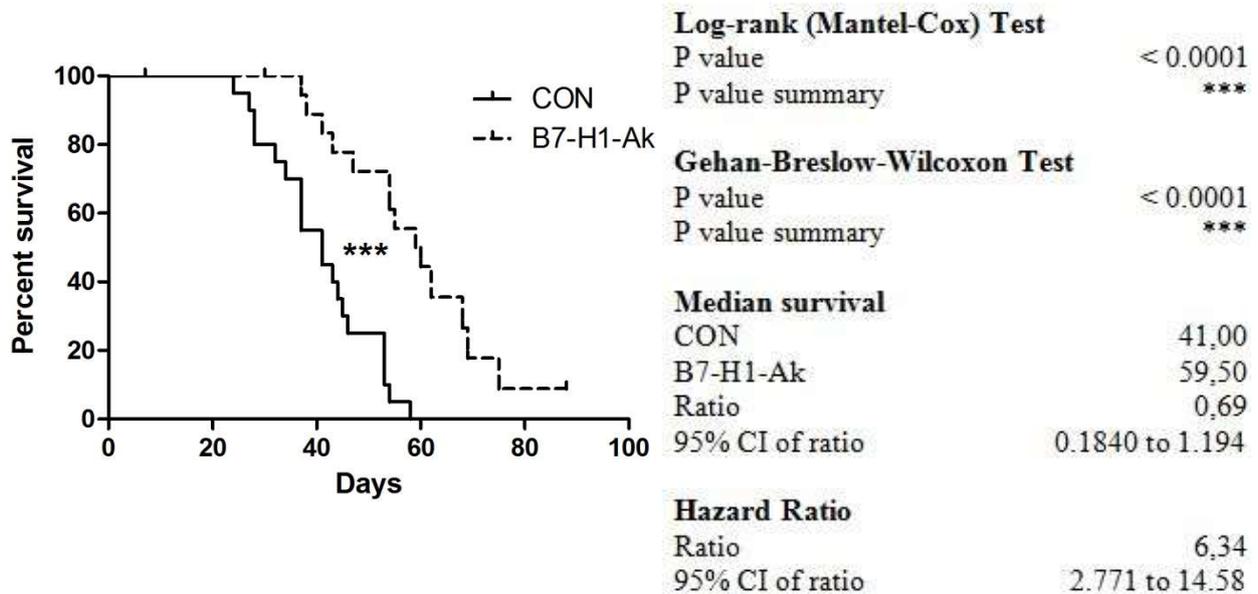
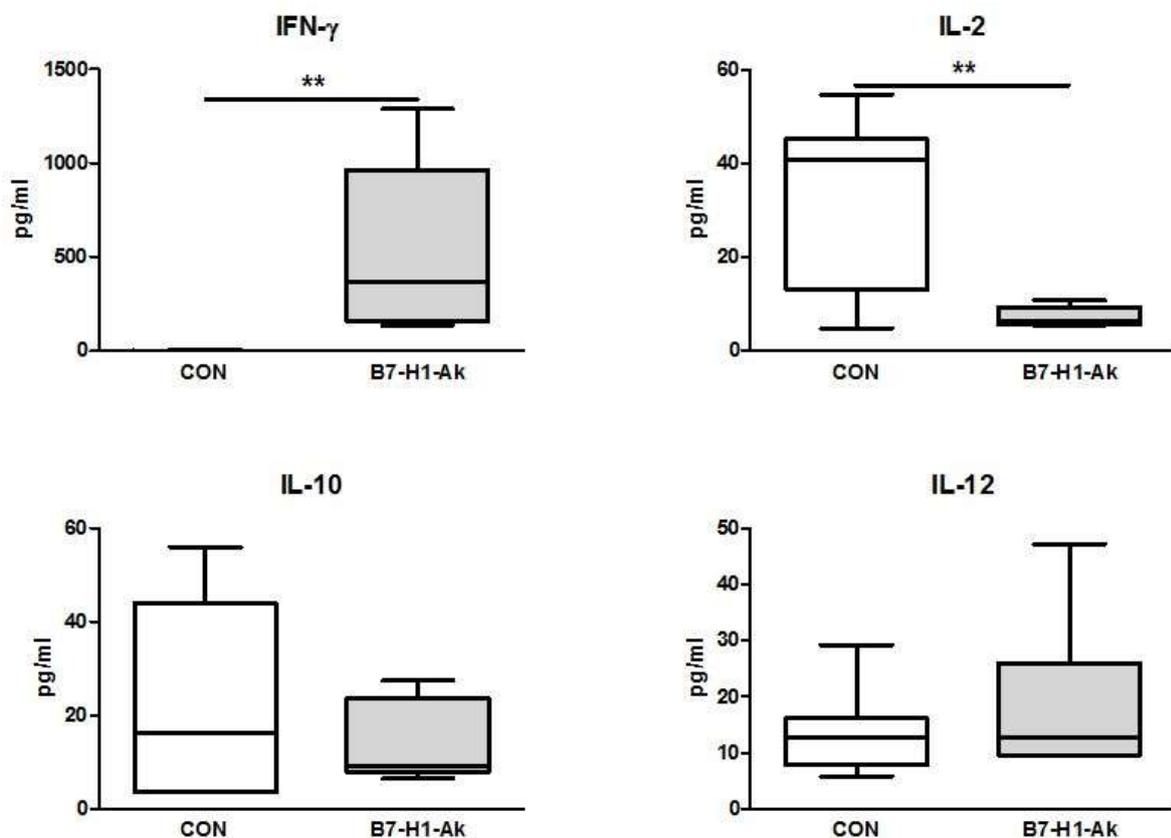


Abbildung 65: Kaplan-Meier-Kurve tumortragender Mäuse mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern. Die Überlebenszeiten von Mäusen mit Pankreasadenokarzinom mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern i.p. an Tag 5, 8, 12, 15 und 19 p.op. wurden in einer Kaplan-Meier-Kurve erfasst (alle Tiere n=40; Kontrolle und Therapiegruppe je n=20).

3.5.2 Zytokinkonzentrationen in tumortragenden Mäusen mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern

Die Ermittlung der Zytokinkonzentrationen gab Auskunft über die Immunlage im PDA mit und ohne den Einfluss von B7-H1. Zudem dienten diese Messungen dem Vergleich der Zytokinkonzentrationen im PDA unter Therapie mit B7-H1-Ak im Vergleich zur Konzentration an Zytokinen in tumortragenden KO-Mäusen, wie sie in Kapitel 3.1.6 beschrieben sind.

Die Zytokinkonzentrationen in den untersuchten tumortragenden Mausgruppen sind in der Abbildung 66 dargestellt. IFN- γ zeigte hierbei eine signifikante Erhöhung bei Behandlung mit B7-H1-Ak. Gegenteilig verhielt sich die Konzentration an IL-2, welche in der Kontrollgruppe signifikant höher war. IL-13 war nach Applikation von B7-H1-Antikörpern signifikant erhöht. Signifikant höhere Konzentrationen zeigten außerdem KC und VEGF in B7-H1-Ak therapierten Mäusen. TGF- β war nach Therapie mit B7-H1-Antikörpern signifikant niedriger als in therapierten Mäusen. Keine signifikanten Veränderungen lagen für die Konzentrationen an IL-10, IL-12 und TNF- α vor.



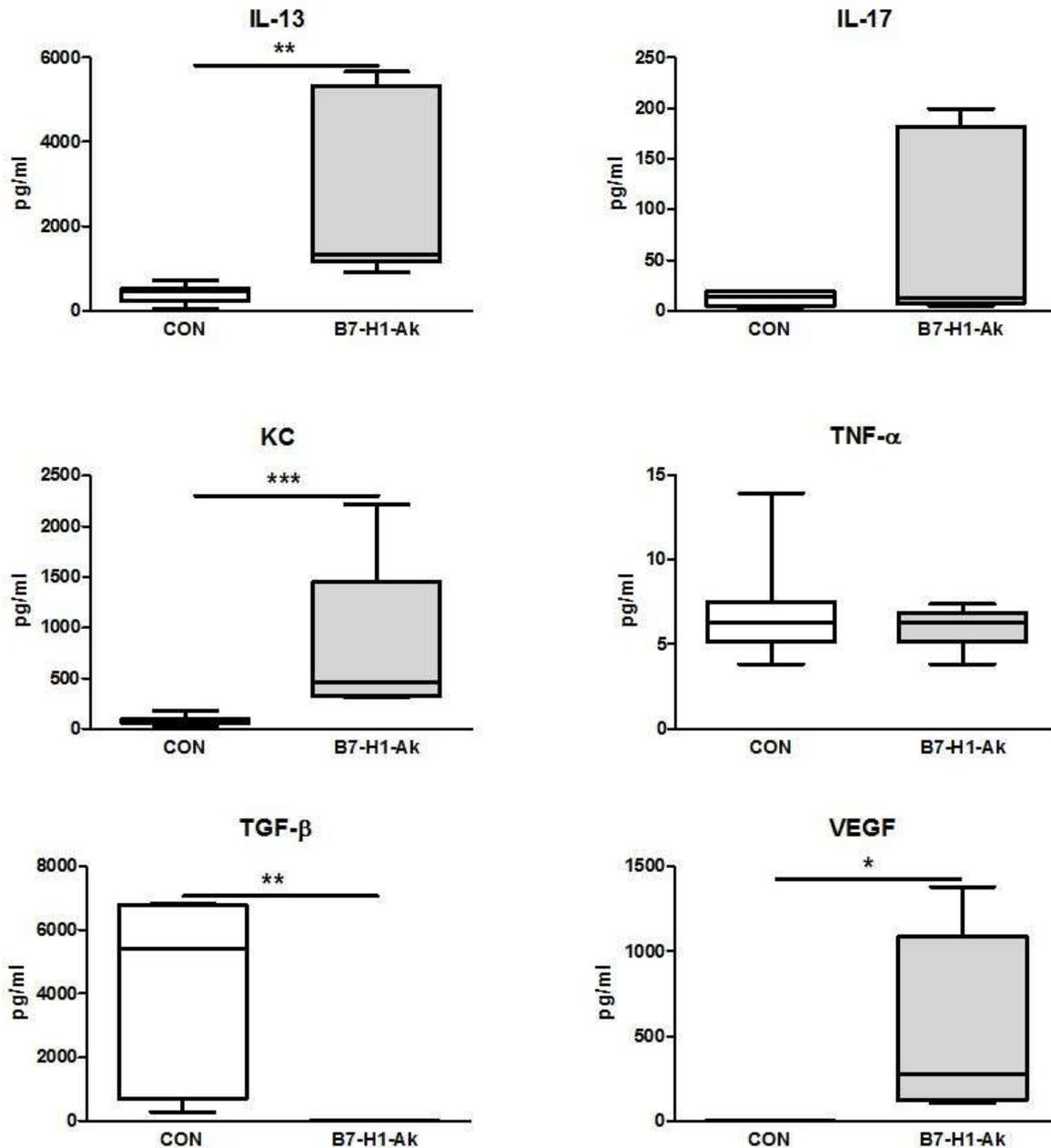


Abbildung 66: Zytokinkonzentrationen in tumortragenden Mäusen mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern. Zytokinanalyse aus 28 Tage p.op. entnommenen Seren therapierter (B7-H1-Ak) und nicht therapierter (CON) WT-Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test (n=8-14), * - P < 0,05, ** - P < 0,01, *** - P < 0,001.

Vergleicht man nun abschließend die Zytokinkonzentrationen aus dieser Versuchsreihe mit denen aus 3.1.6 (Zytokinmessung in Medienüberständen aus tumortragenden KO-Mäusen) ließen sich keine vergleichbaren Effekte darstellen. Lediglich die Konzentration an VEGF zeigte sich in beiden Versuchen signifikant verändert, wobei sie unter der Behandlung mit B7-H1-Ak signifikant erhöht und in KO-Mäusen signifikant verringert war.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von B7-H1 im duktalem Pankreasadenokarzinom näher beleuchtet werden. Es galt dabei die Hypothesen zu klären, in wie weit ein Einfluss von B7-H1 auf die Immunlage im Tumor mit speziellem Blick auf die Aktivität von Makrophagen besteht. Zusätzlich kam die Fragestellung auf, ob bei Abwesenheit von B7-H1 das ebenfalls als PD-1-Ligand fungierende B7-DC vermehrt exprimiert würde und ob B7-DC auch immunsuppressiv in das Tumorgeschehen eingreifen würde. Gleichzeitig wurden die Untersuchungen unter Therapie mit 5FU sowie mit ergänzender Immuntherapie mittels IFN- α betrachtet, um die bestehende Therapieresistenz im PDA im Hinblick auf B7-H1 zu beleuchten. Zudem sollte die Anwendbarkeit eines B7-H1-Antikörpers in vivo als praxisnaher Therapieansatz geprüft werden.

4.1 Methoden

4.1.1 Datenerhebung mittels Fluoreszenz-gekoppelter Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Analyse der Immunzellen wurde das FACS verwendet. Diese Methode ermöglicht die Detektion mehrerer, durch spezifische Antikörper markierte Oberflächenantigenen auf den Zellen einer Probe, sodass zum einen Subpopulationen, wie z.B. M2-Makrophagen analysiert und außerdem durch zeitgleiche Zellzählung die Zellpopulationen mengenmäßig ins Verhältnis gesetzt werden können (Murphy und Weaver 2018). Andere Analyseverfahren, wie die Immunhistochemie, wurden beispielhaft von *Ino et al.* verwendet (Ino et al. 2013). Diese Arbeitsgruppe untersuchte Immunzellpopulationen in Gewebeschnitten PDA-erkrankter Patienten. Sie mussten zunächst Gewebeschnitte herstellen und mit spezifischen Antikörpern markieren, danach unter dem Mikroskop auswerten und anschließend zur Quantifizierung der analysierten Zellpopulationen diese einzeln anhand von vergrößerten Fotografien durch zwei unabhängige Mitarbeiter auszählen lassen (Ino et al. 2013). Die FACS-Analyse erweist sich damit nicht nur als eine weniger zeitintensive, sondern zudem auch als eine qualitativ hochwertigere Methode mit objektiven Ergebnissen.

4.1.2 Therapie mit 5-Fluorouracil (5FU) und Interferon- α (IFN)

In den meisten Versuchsansätzen wurden neben einer Kontrollgruppe drei verschiedene Therapiegruppen gewählt: 5FU, IFN und IFN+5FU. Hierbei orientierten sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an einer an der *Universität Heidelberg* entwickelten und

angewandten Therapie gegen das PDA, dem CapRI-Schema (Knaebel *et al.* 2005), um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit für die Humanmedizin zu gewährleisten.

4.2 Einfluss von 5FU und IFN auf die Immunlage im PDA

Die Therapien zeigten als Mono- sowie als Kombinationstherapie deutliche Einflüsse auf die Immunzellexpression in vivo therapierter WT-Mäuse. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2) zeigten einen signifikant höheren Anteil an CD3⁺-T-Zellen in WT-Milzen unter Therapie mit IFN. Dies konnte zuvor innerhalb unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Karakhanova *et al.* 2014). Untersuchungen von Schmidt *et al.* zeigten darüber hinaus einen positiven Einfluss der Therapie auf die Population von CD4⁺-T-Zellen (Schmidt *et al.* 2007), was durch unsere Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte (Karakhanova *et al.* 2014). In WT-Milzen unter Therapie mit 5FU sowie IFN+5FU und in WT-Tumoren unter Therapie mit IFN stieg zudem der Anteil an cmT-CD4⁺-Zellen signifikant an. Vorab konnten bereits Zhu *et al.* eine signifikante Erhöhung der cmT-Zellen in Milzen tumortragender Mäuse unter der Therapie mit IFN+5FU zeigen. Eine weitere Differenzierung der cmT-Zell-Subpopulationen erfolgte hierbei jedoch nicht (Zhu *et al.* 2008). Insgesamt sind die Erkenntnisse zu Verhalten und Aufgaben von CD4⁺-Gedächtniszellen noch recht unklar. Nur aus 10% der effT-CD4⁺-Zellen, entstehen CD4⁺-Gedächtniszellen. Aus T-Helferzellen entstehen dabei emT-CD4⁺-Zellen, die weiterhin immunstimulierende Zytokine sezernieren und im Vergleich zu cmT-CD4⁺-Zellen nicht in primäre Lymphorgane einwandern. Die Differenzierung zu cmT-CD4⁺-Zellen soll dabei durch B-Zellen koordiniert werden (Pepper und Jenkins 2011). Es zeigte sich jedoch auch unter Einfluss der Therapien signifikant höhere Expressionen von B7-H1 auf einigen CD4⁺- und CD8⁺-Zellsubpopulationen, vorrangig durch die Therapie mit 5FU, sodass der vorab vermittelte, positive Effekt der Therapie kritisch betrachtet werden muss. Die Therapie mit 5FU und IFN+5FU zeigte zudem signifikanten Einfluss auf den Anteil an B-Zellen in tumortragenden WT-Mäusen. Sie stieg signifikant in Milzen an und sank wiederum unter 5FU signifikant in Tumoren, wodurch eine Zellmigration in die Milz vermutet werden kann. B-Zellen wandern nach Aktivierung in die Keimzentren der sekundärlymphatischen Organe ein (Milz, Lymphknoten). Dort proliferieren und differenzieren sie sich zu Plasma- und Gedächtniszellen. Die Aktivierung von naiven B-Zellen erfolgt u.a. durch T-Helferzellkontakt (Murphy und Weaver 2018). Dies kann den vorab durch Vincent *et al.* gezeigten positiven Einfluss von 5FU auf die T-Zell-Antitumor-Antwort belegen (Vincent *et al.* 2010). Koizumi *et al.* haben zudem gezeigt, dass im humanen PDA ohne Einfluss einer Therapie hohe Mengen an *B-cell-activating factor* (BAFF) vorkommen, die vorrangig durch tumorinfiltrierende B-Zellen sezerniert werden. BAFF fördert das Überleben und die Differen-

zierung von B-Zellen. Es wird eine tumorfördernde Rolle von BAFF im PDA vermutet, da die Konzentration dieses Zytokins mit der Aggressivität des PDA signifikant steigt (Koizumi *et al.* 2013). Ob 5FU einen Einfluss auf BAFF hat, kann in der vorliegenden Arbeit nicht geschlossen werden. Unter 5FU konnte eine Wanderung von B-Zellen in die Milz spekuliert werden, für die es einer vorherigen Aktivierung bedarf. Die B-Zellwanderung und –Aktivierung ermöglichte zudem das erhöhte Vorkommen von cmT-CD4⁺-Zellen in WT-Milzen bzw. Tumoren, die unter Therapie mit 5FU und 5FU+IFN bzw. IFN auftraten, sodass hier beiden Therapien einzeln oder in Kombination ein fördernder Effekt zugeschrieben werden kann.

Bei Betrachtung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen stieg deren Anteil an naiven Zellen signifikant unter Therapie mit 5FU und IFN+5FU in WT-Milzen an. Die Ergebnisse der CapRI-Studie von Schmidt *et al.* zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg von CD8⁺-T-Zellen unter Therapie mit 5FU, IFN sowie Strahlentherapie in PDA-erkrankten Patienten (Schmidt *et al.* 2007). Untersuchungsergebnisse von Loos *et al.* im PDA sowie von Blank *et al.* im Nierenzellkarzinom bestätigen diese Beobachtung ebenfalls (Blank *et al.* 2006, Loos *et al.* 2008).

5FU zeigte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante, aber eine Tendenz zur Reduktion von MDSC in WT-Tumoren. Dies konnte von Vincent *et al.* vorab gezeigt werden, der aus seinen Untersuchungen schloss, dass MDSC die CD8⁺-T-Zell-Funktionen reduzieren und sich hieraus der positive Effekt auf die Anti-Tumorantwort unter Therapie mit 5FU ergab (Vincent *et al.* 2010). Die verringerte Menge an MDSC steht daher vermutlich in direktem Zusammenhang mit der in dieser Arbeit gezeigten erhöhten Menge an CD8⁺-T-Zellen sowie eines Therapieeffekts in Bezug auf die IFN- γ -Konzentration. IFN- γ aktiviert Makrophagen, hemmt aber die Entwicklung von T_H2-Helferzellen (Murphy 2011). Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass es auf einigen Immun- wie auch auf den Tumorzellen des PDA die Expression von B7-H1 induziert (Loos *et al.* 2008).

Bei genauerer Betrachtung der CD11b⁺-Zellpopulationen (MDSC und Makrophagen) waren in WT-Milzen jeder Therapiegruppe F4/80⁺-MDSC signifikant erhöht. Ly6C⁺-MDSC (monozytäre MDSC) waren unter der Therapie mit IFN in WT-Milzen sowie in WT-Tumoren erhöht, was in anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte (Karakhanova *et al.* 2014). Zudem zeigten diese Zellen in Tumoren eine erhöhte Expression an B7-H1. In WT-Tumoren waren Ly6C⁺-MDSC unter Therapie mit 5FU signifikant erhöht. Die Therapie mit IFN bewirkte in WT-Tumoren einen signifikanten Abfall des Anteils an Ly6C⁻-MDSC (granulozytäre MDSC). Karakhanova *et al.* zeigten auch, dass die Erhöhung an MDSC in tumortragenden Milzen und Tumoren von WT-Mäusen positiv mit der Tumorgroße sowie negativ mit der Zahl an CD4⁺-T-Zellen korreliert (Karakhanova *et al.* 2014). Da durch

Youn et al. in Tumoren jedoch vorrangig Ly6C⁻-MDSC nachgewiesen wurden (*Youn et al.* 2008), könnten die Veränderungen in Richtung F4/80⁺- und Ly6C⁺-MDSC prinzipiell auch als positiver Einfluss der Therapie zu deuten sein.

Die CD206⁺-Makrophagen waren in tumortragenden WT-Milzen unter Therapie mit IFN signifikant erniedrigt, unter Einfluss der Therapie mit 5FU jedoch signifikant erhöht. Auf die Konzentration an Makrophagen in WT-Tumoren haben die Therapien keinen Einfluss gezeigt. Es wird vermutet, dass TAMs die Ansprechbarkeit von Tumoren auf Therapie mit Hormonen sowie Chemotherapeutika herabsetzen (*Mantovani et al.* 2011). Zudem wurde gezeigt, dass Makrophagen im murinen PDA mittels CD40-Antikörper in Richtung Antitumorantwort stimuliert werden können. Es wird zudem vermutet, dass die Kombination von Makrophagen-Stimulation mittels Antikörper zusätzlich zur Chemotherapie deutliche Vorteile in der Tumorbekämpfung bringen kann (*Brower* 2012, *Vonderheide et al.* 2013). Erste Studien dieser Kombinationstherapie am humanen PDA belegen eine verbesserte Antitumorantwort (*Vonderheide et al.* 2013). Neben der Zerstörung von Tumorzellen kann somit das immunsuppressive Tumormilieu effektiv verändert werden (*Brower* 2012). Diese Beobachtungen und Vermutungen können den signifikanten Anstieg von M2-Makrophagen unter Therapie mit 5FU möglicherweise erklären. Die Therapie mit IFN schien hingegen einen positiveren Einfluss auf die Anti-Tumorantwort zu erzielen, sodass die Konzentration an M2 reduziert wurde. Des Weiteren werden Funktion und Verhalten von Makrophagen im PDA nachfolgend in Kapitel 4.3 diskutiert.

In den eigenen Untersuchungen tumortragender KO-Mäuse (Kapitel 3.1.2) zeigte sich eine signifikante Verringerung der Anteile an Leukozyten unter Therapie mit IFN. Um diese Reaktion genauer zu beurteilen ist der Blick auf die Leukozyten-Subpopulationen wichtig. CD4⁺-T-Zellen waren hierbei unter dieser Therapie ebenfalls in Tumoren signifikant erniedrigt. Naiven CD4⁺-T-Zellen zeigten unter Therapie mit 5FU in Milzen einen signifikant geringeren Anteil. CmT-CD4⁺-Zellen waren wiederum in Milzen unabhängig der Therapieform signifikant erhöht, was einen positiven Einfluss von 5FU auf die Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen deuten lässt. Unter Therapie mit IFN in Tumoren war der Anteil an cmT-CD4⁺-Zellen signifikant erniedrigt, sodass eine Zellwanderung aus Tumoren in Milzen vermutet werden kann. EmT-CD4⁺-Zellen wiederum zeigten eine signifikante Erhöhung ihres Anteils in Tumoren unter Therapie mit IFN. Dieses gegenläufige Verhalten von cmT- und emT-CD4⁺-Zellen entspricht ihrer zu erwartenden Funktion in der Immunabwehr (*Pepper und Jenkins* 2011) mit dadurch positiven Effekt durch IFN. Naive CD8⁺-T-Zellen waren unter Einfluss der Therapie mit IFN signifikant erniedrigt. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen anderer CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, die eine Differenzierung durch IFN vermuten ließen.

In KO-Tumoren waren T_{Reg} sowie MDSC unter Einfluss der Therapie mit 5FU signifikant erhöht. Zwar wird für 5FU ein nachweislich zytotoxischer Einfluss auf MDSC beschrieben, der wiederum die T-Zell-Antwort fördert und somit auch das Vorkommen von T_{Reg} vermindert (Vincent *et al.* 2010), jedoch sind die Konzentrationen an T_{Reg} auch in gesunden KO-Mäusen bereits erhöht (Bazhin *et al.* 2014). Es zeigte sich zudem in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Konzentration an IL-6 in Abhängigkeit von B7-H1 und den Therapien. IL-6 soll hemmend auf die Entstehung von T_{Reg} wirken (Scheller *et al.* 2011), was jedoch in den eigenen Ergebnissen nicht gezeigt werden konnte, sodass dieser Einfluss nicht ausreichend stark gewesen sein konnte.

Unter Therapie mit IFN lag in KO-Tumoren eine Erhöhung der Anteile an Ly6C⁺-MDSC (granulozytäre MDSC) vor. Für monozytäre MDSC konnte bereits vorab gezeigt werden, dass ihr Anteil in gesunden KO-Mäusen signifikant höher als in WT-Mäusen ist (Bazhin *et al.* 2014), für granulozytäre MDSC wurde dies jedoch nicht beobachtet. Granulozytäre MDSC sollen in Tumorerkrankungen generell frequenter vorkommen als monozytäre MDSC (Youn *et al.* 2008). In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.1.3) konnte für beide Zellpopulationen ein signifikanter Mauseffekt mit erhöhten Anteilen in tumortragenden KO-Mäusen gezeigt werden. Granulozytäre MDSC zeigen keine Fähigkeit der Differenzierung in Makrophagen oder DC und unterdrücken die T-Zell-Antwort nachweislich. Youn *et al.* konnten zeigen, dass die Blockade von B7-H1 dieses Verhalten nicht besserte (Youn *et al.* 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sogar eher die Vermutung zu, dass nicht nur die Abwesenheit von B7-H1 zum vermehrten Vorkommen dieser Zellpopulation beiträgt, sondern auch die Kombination mit IFN als Therapeutikum.

Bei Betrachtung der Zytokinkonzentrationen (Kapitel 3.1.6) konnten signifikante Therapieeffekte in Bezug auf IFN- γ , IL-6 und IL-12 festgestellt werden. Eine erhöhte Menge an Makrophagen konnte durch die verwendeten Therapien in WT-Mäusen nicht gezeigt werden, die wiederum Einfluss auf die Sekretion von IL-6 und IL-12 hätten haben können. Es konnte jedoch vorab gezeigt werden, dass neben Makrophagen, auch Hepatozyten und PDA-Zellen selbst IL-6 sezernieren (Martignoni *et al.* 2005, Wigmore *et al.* 2002). Da IL-6 mit vielen Symptomen von Krebskranken korreliert, wie Anämie, Lebermetastasen und Erschöpfung (Martignoni *et al.* 2005) und als Faktor für die Progression sowie das Vorhandensein von Lebermetastasen im PDA diskutiert wird (Kim *et al.* 2017), muss seine erhöhte Konzentration unter der Therapie kritisch beurteilt werden, auch wenn IL-6 wiederum die Entwicklung von T_{Reg} inhibiert (Scheller *et al.* 2011). Die IL-12-Konzentration zeigte sich in der vorliegenden Arbeit durch die Therapie vermindert, was negativ zu beurteilen ist, da IL-12 als proinflammatorisches Zytokin die NK- und T-Zell-gesteuerte Immunabwehr fördert und mehr oder weniger erfolgreich bereits als Immuntherapeutikum in verschiedenen Tumorerkrankungen

diskutiert bzw. eingesetzt wird (Lu 2017). Der gewünschte Effekt der gesteigerten T-Zell-Antwort durch Therapie mit IFN (Brassard *et al.* 2002) kann hier also nicht dargestellt werden, was wiederum die Komplexität des Tumormilieus im PDA aufzeigt.

Betrachtet man das gemessene Tumolvolumen in vivo behandelter WT-Mäuse, so ließ sich ein signifikant geringeres Tumolvolumen unter der Therapie mit IFN zeigen. Dies konnte vorab bereits durch *Karakhanova et al.* gezeigt werden (*Karakhanova et al.* 2014). Hinsichtlich der Metastasierung zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede. Es wird jedoch angenommen, dass IFN in frühen Tumorstadien eine Metastasierung durch Aktivierung von Tumorstammzellen im PDA fördert und in kombinierter Therapie mit 5-FU die Zerstörung dieser Zellen wiederum begünstigt (*Zhu et al.* 2014).

Zusammenfassend zeigten sich in der vorliegenden Arbeit durch Mono- aber auch durch die Kombinationstherapie in vivo therapierter WT-Mäuse positive Effekte auf einzelne Immunzellsubpopulationen, v.a. im Bereich der T-Zellen, die eine mögliche, bessere Immunantwort bedeuten können. Manche positive Effekte von IFN, wie z.B. die Reduktion der Menge an MDSC, konnte in der Therapiegruppe IFN+5FU nicht signifikant dargestellt werden, obwohl 5FU die Menge an MDSC ebenfalls reduzieren soll (*Vincent et al.* 2010). Statistisch ließ sich ein positiver Effekt von IFN auf das Tumolvolumen nachweisen. Auffällig in der Versuchsdurchführung war jedoch auch, dass bei IFN+5FU-therapierten Mäusen häufig kein Tumorstadium stattfand und diese Tiere nicht in die Untersuchungen einfließen konnten, was wiederum die oft niedrigen Stichprobenzahlen in den In-vivo-Untersuchungen zusätzlich erklärt. Diese Beobachtungen wurden jedoch nicht weiter ausgewertet, da kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Therapie und dem fehlenden Vorhandensein eines Primärtumors bestand. Die teils unterschiedlichen Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit sowie aus obengenannten, vergleichbaren In-vivo-Untersuchungen von *Karakhanova* und *Vincent et al.* können aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl bestehen, können aber auch die Diversität des Verhaltens des PDA aufzeigen, was sich auch darin zeigt, dass die Kombinationstherapie in anderen Tumoren zu teilweise deutlich besseren Ergebnissen führt. So zeigte sie sich z.B. im Leberkarzinom sehr wirksam durch eine Inhibierung der Angiogenese und des Tumorstadiums sowie die Apoptose der Tumorzellen (*Wada et al.* 2007). Die Frequenz und Dosierung der Therapeutika-Injektionen in vivo sind in den verschiedenen Studien nach gängigen Erfahrungen und Vorschlägen gewählt, weitestgehend miteinander vergleichbar und sollten daher keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse haben (*Karakhanova et al.* 2014, *Ma et al.* 2005, *Vincent et al.* 2010, *Wada et al.* 2007).

4.3 Makrophagen: Ihre Funktion und ihr Einfluss auf die Immunlage im PDA

Makrophagen lassen sich in weitere Subpopulationen unterteilen. Dabei werden vorrangig M1- (durch IFN- γ und mikrobielle Stimuli aktiviert) und M2-Makrophagen (durch IL-4 (Stein *et al.* 1992), IL-10, IL-13 und TGF- β aktiviert (Goerdts und Orfanos 1999)) unterschieden. Der M2-Phänotyp dominiert in der Mehrzahl der Tumorerkrankungen und wird daher auch als tumor-assoziierte Makrophage (TAM) bezeichnet (Mantovani *et al.* 2011). M2-Makrophagen korrelieren häufig mit einer schlechten Prognose, da sie das Tumorstadium und die Metastasierung aktiv fördern, wobei sie vom Tumormilieu geleitet werden (Clark *et al.* 2009, Mantovani *et al.* 2011, Pollard 2004) und stellen dadurch eine für die Krebsforschung umso interessantere Immunzellpopulation dar. Marker zur Identifizierung von M2-Makrophagen sind u.a. CD206 und CD163 (Ino *et al.* 2013). In der eigenen Studie wurde auf die Verwendung von CD163 verzichtet, da in einem Testdurchlauf keine mit CD206 vergleichbar guten Ergebnisse erzielt wurden.

4.3.1 Vermehrte Makrophageninfiltration bei Progression des PDA

Bei Betrachtung der Tumorstadien aus *in vivo* therapierten WT- und KO-Mäusen zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen steigendem Tumorstadium und steigendem Anteil an tumorinfiltrierenden Makrophagen in WT-Mäusen. In KO-Mäusen konnte kein signifikanter Zusammenhang dargestellt werden. Im Weiteren zeigten Makrophagen unter Therapie mit IFN+5FU und CD206⁺-Makrophagen unter Therapie mit IFN eine signifikante Korrelation zum Tumorstadium. Zum einen ist daraus ein Einfluss von B7-H1 auf die Makrophagenrekrutierung im Tumor ableitbar, zum anderen lässt es auf den Einfluss der Makrophagen, v.a. M2-Makrophagen, im Tumorstadium schließen, deren Anteil sogar unter Therapie mit IFN zusätzlich erhöht war. Dies spiegelt die vorab dargestellten Erkenntnisse von Makrophagen in Tumoren wider (Mantovani *et al.* 2011). Im kolorektalen Karzinom wurde zudem eine durch M2-Makrophagen induzierte Resistenz gegen die Therapie mit 5FU nachgewiesen (Wei *et al.* 2019). Andere Therapieansätze zur Reduktion des Tumorstadiums, wie z.B. die Reduktion der Angiogenese, triggern aufgrund der nachfolgenden Hypoxie des Gewebes womöglich aber wiederum die Entstehung von M2-Makrophagen (Mazzieri *et al.* 2011).

4.3.2 Aus PDA stammende Makrophagen fördern die Expression von CD25 auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen, zeigen keinen proliferierenden Effekt auf CD4⁺-T-Zellen und induzieren ein tumorstimulierendes Milieu

In dieser Versuchsreihe wurden aus WT-Maustumoren stammende Makrophagen isoliert und mit Splenozyten gesunder WT-Mäuse in Kultur verbracht. Es wurde der Einfluss von Makrophagen auf die Aktivierung (Expression von CD25 und CD69) und die Proliferation (Anteil geteilter Zellen) von CD4⁺-T-Zellen analysiert und zugleich die Veränderungen im Zytokin Spiegel in den Medienüberständen betrachtet.

Ein Einfluss auf die Proliferation der CD4⁺-T-Zellen konnte hierbei nicht gezeigt werden. Damit es zur Proliferation von T-Zellen kommen kann, muss zunächst eine Aktivierung der Zellen erfolgen (Murphy und Weaver 2018). Die Aktivierung erfolgte in den „+act“-Kulturansätzen der vorliegenden Arbeit mittels zugegebener CD3- und CD28-Antikörper. Die Kokultur mit Makrophagen ohne Zugabe der Antikörper zeigte keine Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen. Die T-Zell-Aktivierung erfolgt in verschiedenen Schritten. Zum einen wird via einer APC der T-Zelle ein Antigen präsentiert. Über die Bindung dieses Antigens an den TCR wird der CD3-Rezeptor der T-Zelle aktiviert und gibt Signale ins Zellinnere ab, die die Proliferation und Differenzierung ermöglichen (Murphy und Weaver 2018). Notwendige Kostimulation erfolgt durch weitere Oberflächenantigene der APC, die an den CD28-Rezeptor der T-Zelle binden (Lenschow *et al.* 1996). Weitere Signale können über Zytokine erfolgen, wobei diese Signalwege laut *Obst et al.* nicht essentiell zur Aktivierung beisteuern, sondern vermutlich die Differenzierung zu bestimmten T-Zell-Subpopulationen beeinflussen (*Obst et al.* 2005). Das Fehlen bestimmter Zytokine zur Proliferation von CD4⁺-T-Zellen könnte demnach hier eine Rolle spielen. Fraglich ist auch, ob das Signal der Makrophagen insgesamt nicht ausreichend ist. Zur Aktivierung einer naiven CD4⁺-T-Zelle reichen jedoch bereits zehn bis fünfzig Antigenpeptid:MHC-Komplexe aus, die via MHC-II-Komplexe auf APC präsentiert werden müssen (Murphy und Weaver 2018). Die im PDA vorrangig vorkommenden M2-Makrophagen exprimieren nicht alle MHC-II auf ihrer Oberfläche. So widmen sich M2c-Makrophagen nicht der Antigenpräsentation (Mantovani *et al.* 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass M2-Makrophagen MHC-II^{low} sind und im Gegensatz zu MHC-II^{high}-M1-Makrophagen (Van Gassen *et al.* 2015) eher weitere Monozyten und Makrophagen anstatt Lymphozyten via Zytokinexpression rekrutieren, was ihre Funktion als APC reduziert (Movahedi *et al.* 2010). Der fehlende Effekt von Makrophagen aus tumortragenden WT-Mäusen auf die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen kann daher durch die Differenzierung der Makrophagen selbst bedingt sein. Es zeigte sich jedoch auch keine Inhibition der CD4⁺-T-Zellproliferation durch Kokultur mit Makrophagen, sodass ihre Beteiligung an der Suppression der T-Zell-Antwort im PDA vielleicht eher gering ist. Zu beobachten war jedoch

eine erhöhte Expression von CD25 auf den CD4⁺-T-Zellen, die sich durch die Kokultur mit Makrophagen noch signifikant steigerte. CD25 wird auf verschiedenen, aktivierten T-Zellen exprimiert (Murphy und Weaver 2018), u.a. aber auch von T_{Reg} (Shevach 2002), deren vermehrtes Vorkommen sowie ihr immunsuppressiver Einfluss im PDA bekannt sind (Clark *et al.* 2009).

Die ergänzende Betrachtung der Zytokine in den Kulturmediumüberständen dieser Versuchsreihe zeigte erhöhte Konzentrationen an IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-17 und TNF- α unter Einfluss von Makrophagen in der zumeist auch gleichzeitig aktivierten Kokultur mit Splenozyten. Die Aktivierung der Kulturen, unabhängig von der Kokultivierung mit aus Tumoren stammenden Makrophagen, erhöhte die Konzentration an IL-13, wobei eine Sekretion durch speziell M2-Makrophagen als typische Eigenschaft für diese beschrieben wird (Bent *et al.* 2018). IL-10 und IL-6 induzieren u.a. die Differenzierung zu M2-Makrophagen. Zudem wird IL-10 auch selbst von ihnen sezerniert (Solinas *et al.* 2009). IL-17 zeigt sich in Tumoren als ein die Tumorprogression förderndes Zytokin mit Interaktionen zu TAM und T_{Reg} sowie mit wiederum IL-6-sekretionsfördernden Eigenschaften (Yang *et al.* 2014). Auch die erhöhte Konzentration an TNF- α lässt auf den Einfluss der TAM auf die Splenozytenkultur schließen. So konnte im B16-Melanom-Mausmodell gezeigt werden, dass TNF- α die Expression von B7-H1 in TAM positiv beeinflusst und bei Verwendung von Knockout-Mäusen ohne Rezeptoren für TNF- α eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums sowie der Zahl an B7-H1 exprimierenden Makrophagen und DC bewirkte (Holbrook *et al.* 2019). Die erhöhte Konzentration von IFN- γ ist in diesem Zusammenhang durch Aktivierung von Makrophagen sowie Induktion der B7-H1-Expression auf u.a. Immunzellen ebenfalls als negativ zu bewerten (Loos *et al.* 2008, Murphy 2011). Insgesamt unterstreichen die Messungen der Zytokinkonzentrationen den vom Tumormilieu geprägten, immunsuppressiven und die Tumorprogression fördernden Charakter der isolierten Makrophagen mit ausbleibender Förderung der T-Zell-Antwort.

4.3.3 Erhöhte Phagozytose von Makrophagen unter Abwesenheit von B7-H1

Die zur genaueren Betrachtung des Verhaltens von Makrophagen durchgeführten Ex-vivo-Untersuchungen, mit aus PDA isolierten Makrophagen, zeigten eine erhöhte Phagozytose in KO- im Vergleich zu WT-Maustumoren, unabhängig der auf sie angewandten Therapien. Aufgrund eines zu kleinen Stichprobenumfangs konnte keine statistische Auswertung erfolgen, es konnte jedoch angenommen werden, dass in WT- zudem höhere Anteile an Makrophagen vorlagen als in KO-Maustumoren. Dies weist auf einen suppressiven Einfluss von B7-H1 hinsichtlich der Makrophagenaktivität im PDA hin. Okudaira *et al.* konnten vorab

bereits zeigen, dass unter Blockade von B7-H1 mittels in vivo injizierter B7-H1-Antikörper eine erhöhte Infiltration von M1-Makrophagen in PDA-Tumor von Mäusen auftrat (Okudaira *et al.* 2009).

In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich zudem eine bessere Makrophagenaktivität in WT-Mäusen unter Therapie mit 5FU sowie keinerlei signifikanter Veränderungen der B7-H1-Expression der Makrophagen durch die angewandten Therapien.

4.3.4 Vergleichende Betrachtung von Makrophagen und MDSC

Die MDSC-Konzentration zeigte im Ex-Vivo-Experiment keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf B7-H1 oder die angewandten Therapien. Das Phagozytoseverhalten zeigte sich vergleichend zu dem von Makrophagen. Es war in KO-Maustumoren ohne Therapie sowie in WT- als auch in KO-Maustumoren unter Therapie mit 5FU signifikant erhöht. Dies zeigt einen deutlichen Effekt von 5FU auf die Phagozytoseaktivität der aus Tumoren stammenden CD11b⁺-Zellen ohne eine Beeinflussung von B7-H1. Insgesamt war der Anteil phagozytischer, aus Tumoren stammender MDSC im Vergleich zu Makrophagen aber höher. *Maeda et al.* spekulierten vorab, dass MDSC im Vergleich zu DC und Makrophagen eine höhere Phagozytoseleistung in Xenograft-Untersuchungen besitzen (*Maeda et al.* 2014). Zudem wurde durch *Youn et al.* gezeigt, dass granulozytäre MDSC aus tumortragenden Mäusen Phagozytoseaktivität besitzen, jedoch deutlich weniger als Neutrophile aus denselben Mäusen. Nach Kokultivierung der MDSC mit GM-CSF zeigten sie jedoch eine annähernd so hohe Phagozytoseleistung wie Neutrophile (*Youn et al.* 2012). In einer Studie von *Gordon et al.* konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression von PD-1 auf TAM negativ mit der Phagozytoseleistung dieser korrelierte und die Blockade der Interaktion von PD-1 und PD-L1 in vivo ergab eine gesteigerte Phagozytose mit Verdacht auf direkten Einfluss von PD-1 auf Makrophagen (*Gordon et al.* 2017). Im Hinblick auf den Wirkmechanismus von 5FU auf die Phagozytoseaktivität von CD11b⁺-Zellen liegt zurzeit keine aktuelle Literatur vor. Da eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen auf Phagozyten der Erkennung von Tumormustern mit nachträglich direkter oder indirekter Einleitung der Phagozytose dienen und die Affinität der Oberflächenmoleküle zu ihren Liganden durch unterschiedliche Mechanismen zusätzlich gesteigert werden kann, könnte 5FU in irgendeinem dieser Prozesse einen positiven Effekt zeigen (*Rosales und Uribe-Querol* 2017).

Die in den Kulturüberständen der isolierten, aus Tumoren stammenden CD11b⁺-Zellen zusätzlich gemessenen Zytokinkonzentrationen zeigten eine signifikant verringerte Konzentration von IL-6 in KO- im Vergleich zu WT-Kulturen der Kontrollgruppen mit

deutlichem fördernden Einfluss von B7-H1. In KO-Kulturen zeigte sich IL-6 unter Therapie mit IFN+5FU zudem signifikant erhöht, was in WT-Kulturen nicht gezeigt werden konnte. Der Einfluss von IL-6 auf das Tumormilieu wurde bereits in Kapitel 4.2 diskutiert und das vermehrte Vorkommen von IL-6 wird im Tumorgeschehen als eher kritischer Faktor betrachtet (Kim *et al.* 2017). Die Zytokinexpression in aus WT-Maustumoren stammenden CD11b⁺-Zellen zeigte ebenfalls positive Ansprechbarkeiten auf die Therapien. So erhöhte sich die Konzentration an IL-2 und verringerte sich die Konzentration von VEGF unter Therapie mit IFN, was auf eine verstärkte T-Zell-Antwort und eine verringerte Neigung zur Vaskularisation des Tumors schließen lässt (Murphy und Weaver 2018, Rmali *et al.* 2007). Außerdem sank die Konzentration an TGF- β unter Kombinationstherapie mit IFN+5FU, was ebenfalls die Ausbildung von T_{Reg} und damit die Ausbildung eines immunsuppressorischen Milieus reduziert (Murphy und Weaver 2018). Die Therapie mit 5FU zeigte jedoch in Abhängigkeit von B7-H1 eine erhöhte Konzentration an VEGF. Im Vergleich der Kontrollgruppen der WT- und KO-Kulturen konnte dies ebenfalls gezeigt werden. Es konnte von Xue *et al.* gezeigt werden, dass das im Gliom vermehrte Vorkommen von B7-H1 mit dem von VEGF positiv korreliert. Ob es hierbei Interaktionen gibt wurde bislang noch in keiner Studie geklärt (Xue *et al.* 2017). B7-H1 zeigte zudem einen positiven Einfluss auf die Konzentration an IL-1 β sowie einen negativen Einfluss auf IFN- γ . Letzteres unterstützt die Beobachtung der reduzierten Phagozytoseleistung unter Einfluss von B7-H1 (Boehm *et al.* 1997, Gordon *et al.* 2017). Die Funktionen von IL-1 β wurden von Bent *et al.* zusammengefasst beschrieben. Bei sonst positiven Einflüssen in Entzündungen, fördert dieses Zytokin das immunsuppressive Tumormilieu und wird vermehrt von M2-Makrophagen und MDSC sezerniert (Bent *et al.* 2018). Die Zytokinmessungen aus den In-Vivo-Untersuchungen aus Kapitel 3.1.6 konnten die ex vivo beobachteten Veränderungen nicht widerspiegeln und zeigen dadurch die Beeinflussung der CD11b⁺-Zellen-Aktivität unter Anwesenheit des Tumormilieus.

4.4 Die Rolle von B7-H1 im PDA

Es sollte der Effekt von B7-H1 auf die Immunzellexpression und die Veränderung der Zytokinkonzentrationen im murinen Panc02-Modell geprüft werden, um das Tumormilieu im PDA und den Einfluss von B7-H1 darstellen zu können. Zugleich konnte der Einfluss der Therapien erörtert werden, auf den bereits in Kapitel 4.2 näher eingegangen wurde. Der Einfluss auf das Verhalten von aus Tumoren stammenden Makrophagen und MDSC wurde bereits in Kapitel 4.3 beschrieben.

4.4.1 Einfluss von B7-H1 auf die Immunlage im PDA

Es ließ sich in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung zweier Maustypen (WT und B7-H1-KO-Mäuse) gezielt der Einfluss von B7-H1 im PDA darstellen, der hier als „Mauseffekt“ bezeichnet wurde (Bezug auf die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3). Zusammenfassend wurde dieser in Bezug auf die Immunzellexpression in untersuchten Milzen und Tumoren nachfolgend in Tabelle 28 dargestellt. Die CD3⁺-T-Zellen zeigten sich unter Einfluss von B7-H1 in Tumoren erhöht, wobei CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Tumoren und CD8⁺-T-Zellen ebenfalls in Milzen in Abwesenheit von B7-H1 erhöht vorlagen. B7-H1 zeigte keinen Einfluss auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulationen im Tumor. In den Milzen zeigte sich jedoch ein erhöhter Anteil an Effektor-T-Zellen (effT-CD4⁺-, emT-CD4⁺-, effT-CD8⁺-Zellen) sowie naiver CD8⁺-T-Zellen. Ohne Einfluss von B7-H1 konnten vermehrt cmT-CD4⁺-, emT-CD8⁺- und cmT-CD8⁺-Zellen in Milzen gemessen werden, was eine nachhaltige Antitumorantwort durch die Differenzierung zu Gedächtnis-T-Zellen ermöglicht (MacLeod *et al.* 2009).

Betrachtet man die MDSC- und Makrophagen-Subpopulationen, deren Verhalten und Bedeutung im PDA bereits in Kapitel 4.3 diskutiert wurden, zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CD206 auf Makrophagen und MDSC in Tumoren und Milzen unter Einfluss von B7-H1. CD206 wird als Oberflächenmarker für sogenannte alternativ aktivierte myeloide Zellen verwendet (Mosser und Edwards 2008). Zumeist werden hiermit die in Tumoren vermehrt vorkommenden M2-Makrophagen beschrieben, die ein tumorunterstützendes Verhalten zeigen (Noy und Pollard 2014). Die ebenfalls im Tumor vermehrt vorkommenden T_{Reg} fördern die Differenzierung von Makrophagen zu M2-Makrophagen (Biswas und Mantovani 2010). T_{Reg} waren in WT-Tumoren auch in den eigenen Ergebnissen signifikant erhöht vorhanden (Bazhin *et al.* 2013), bei Abwesenheit von B7-H1 zeigte sich eine deutliche Verschiebung in die Milzen tumortragender Mäuse. Bazhin *et al.* konnten zudem zeigen, dass bei Therapie mit monoklonalen B7-H1-Antikörpern eine signifikante Reduktion der Anteile an T_{Reg} auftrat (Bazhin *et al.* 2013). Genau gegenteiliges Verhalten zeigten T_{Conv}. Ein Einfluss von B7-H1 auf die Regulation der Expression von CD206 konnte daher mindestens über die Rekrutierung von T_{Reg} ins PDA belegt werden. Es ließ sich hier insgesamt der immunsuppressive Einfluss von B7-H1 bestätigen (Butte *et al.* 2007). Die MDSC-Population zeigte sich in Milzen unter Einfluss und in Tumoren auch unter Abwesenheit von B7-H1 erhöht. Das vermehrte Vorkommen von MDSC im PDA wird als negativer prognostischer Faktor beschrieben (Gabitass *et al.* 2011) und die Infiltration des Tumors mit MDSC geschieht in Abhängigkeit von seinem immunsuppressiven Milieu (Gabilovich und Nagaraj 2009). Jedoch kann der Einfluss von B7-H1 in diesem Zusammenhang somit nicht gezeigt werden. Fraglich zu deuten sind zudem die in WT-Tumoren erhöhten Expressionen von F4/80⁺-MDSC. F4/80 stellt einen klassischen Marker für Monozyten, Makrophagen, DC und eosinophile Gra-

nulozyten in Mäusen dar. Es konnte bislang kein Ligand für F4/80, bzw. EMR-1 (human) detektiert werden und seine Funktion ist noch relativ ungeklärt. In Mausmodellen ist bereits bekannt, dass die Abwesenheit von F4/80 keine Veränderung in der Entwicklung von Monozyten erzeugt. Jedoch besteht der Verdacht, dass ohne F4/80 in Mäusen die Entwicklung von CD8⁺-T_{Reg} verhindert wird (Gordon *et al.* 2011). Für das Verhalten und den Einfluss von F4/80 in Tumorerkrankungen gibt es zurzeit keine vergleichbare Literatur.

Es lässt sich anhand dieser Ergebnisse der immunsuppressive Einfluss von B7-H1 im Tumorgeschehen darstellen (erhöhtes Vorkommen immunsuppressiver Immunzellen sowie reduzierte T-Zell-Antwort). Peripher im Körper (Milz als Blutspeicherorgan) zeigte sich wiederum ein heterogeneres Bild und die Immunabwehr unter Anwesenheit von B7-H1 sogar aktiver (erhöhte Expression an Effektor-T-Zellen), was wiederum aber zu keiner effektiven Anti-Tumorantwort im Tumor führte.

Tabelle 28: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses von B7-H1 auf die Immunzellexpression aus in vivo therapierten WT- und KO-Mäusen stammenden Milzen und Tumoren.

Immunzellpopulation	Milz	Tumor
CD3 ⁺ -T-Zellen		WT
CD4 ⁺ -T-Zellen		KO
CD8 ⁺ -T-Zellen	KO	KO
effT-CD4 ⁺ -Zellen	WT	
naiveCD4 ⁺ -T-Zellen		
emT-CD4 ⁺ -Zellen	WT	
cmT-CD4 ⁺ -Zellen	KO	
effT-CD8 ⁺ -Zellen	WT	
naiveCD8 ⁺ -T-Zellen	WT	
emT-CD8 ⁺ -Zellen	KO	
cmT-CD8 ⁺ -Zellen	KO	
T _{Reg}	KO	WT
T _{Conv}	WT	KO
B-Zellen	WT	
MDSC	WT	KO
F4/80 ⁺ -MDSC		WT
CD206 ⁺ -MDSC	WT	WT
Ly6C ⁺ -MDSC	KO	
Ly6C ⁻ -MDSC		
F4/80 ⁺ -Makrophagen		WT
CD206 ⁺ -Makrophagen	WT	WT

Zusammenfassende Darstellung des „Mauseffekts“ aus den mittels two-way-ANOVA ausgewerteten Ergebnissen aus Kapitel 3.1.3. Der genannte Maustyp (KO, WT) zeigt dabei die Gruppe mit der signifikant höheren Expression der entsprechenden Zellpopulation an. Lag kein Mauseffekt vor, wurde das dazugehörige Feld in der Tabelle frei gelassen.

B7-H1 zeigte weiterhin einen deutlichen Einfluss bei Vergleich der Zytokinkonzentrationen in Serumüberständen tumortragender WT- und KO-Mäuse hinsichtlich der Ausbildung eines immunsuppressiven Milieus (Bezug auf Ergebnisse aus Kapitel 3.1.6). Es zeigten sich in tumortragenden WT-Mäusen signifikant erhöhte Konzentrationen an IFN- γ , IL-6, KC und VEGF. Die Bedeutung von IFN- γ und IL-6 wurde bereits in Kapitel 4.2 und 4.3.2 diskutiert. KC fördert die Chemotaxis von Monozyten und damit möglicherweise auch die Infiltration von Makrophagen und MDSC im PDA (Huo *et al.* 2001, Murphy und Weaver 2018). VEGF fördert die Neovaskularisation im Tumor, was zu einer besseren Versorgung und Wachstumsmöglichkeit des Tumorgewebes führt. Zwar fördert VEGF theoretisch die Infiltration des Gewebes mit Entzündungs- und weiteren Immunzellen, jedoch wurde gezeigt, dass solche im Tumor neu entstandenen Gefäße veränderte Wandstrukturen und Fehlfunktionen aufweisen, wodurch diese Infiltration gestört sein kann (Baluk *et al.* 2005, McDonald und Baluk 2005).

4.4.2 Wechselwirkungen zwischen B7-H1 und der Therapie mit 5FU und IFN

Die Auswertung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.3 mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (two-way-ANOVA) ermöglichte die Analyse einer Interaktion zwischen dem Maustypen, also dem Vorhandensein von B7-H1 und den Therapien. Dabei konnten Wechselwirkungen in Bezug auf die Expression folgender Zellpopulationen dargestellt werden: effT-CD4⁺-Zellen, naive CD4⁺-T-Zellen, effT-CD8⁺-, emT-CD8⁺-Zellen, naive CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, MDSC, F4/80⁺-MDSC sowie CD206⁺-Makrophagen in Milzen und emT-CD4⁺-, cmT-CD4⁺-Zellen, Ly6C⁺-MDSC sowie Makrophagen in Tumoren. Auch wenn die Zellexpressionen im Näheren betrachtet nur teilweise Veränderungen aufzeigten, wie sie durch die Therapien erhofft wurden, lassen diese Ergebnisse in jedem Fall darauf schließen, dass der Ansatz der gezielten Betrachtung von B7-H1 im PDA gerechtfertigt ist, da dieses Molekül mit den gewählten Therapieansätzen interagiert und dies zudem auf Zellpopulationen, die für die Antitumorantwort essentiell sind, wie Effektor- und zytotoxische T-Zellen. Auch der Einfluss auf MDSC und M2-Makrophagen, wie er bereits näher diskutiert wurde, ist von entscheidender Rolle im PDA. Der Blick auf die Zytokinexpression (Kapitel 3.1.6) zeigt selbiges mit signifikanter Wechselwirkung bei Betrachtung der Konzentrationen an IFN- γ , IL-6 und IL-12, die näher bereits in Kapitel 4.2 diskutiert wurden.

Einige Studien haben sich mit dem Einfluss der kombinierten Therapie von 5FU und IFN in Tumoren bereits befasst, aber nur wenige im direkten Zusammenhang mit B7-H1. Es konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Chemotherapeutika wie 5FU zu einer erhöhten Expression von B7-H1 auf Brustkrebszellen führt, was die eingeschränkte Wirksamkeit von 5FU mit erklären kann (Zhang *et al.* 2008). Betrachtet man die B7-H1-Expression in

tumortragenden WT-Mäusen der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.1.4) konnte im Hinblick auf einige Zellpopulationen eine signifikant erhöhte Expression von B7-H1 unter Therapie mit 5FU, teilweise auch unter der Kombinationstherapie mit 5FU und IFN gezeigt werden, sodass auch IFN hier keine erkennbare Reduktion dieses Effekts bewirkt. Dazu kommt die im PDA bestehende Chemotherapieresistenz (Grasso *et al.* 2017). Grasso *et al.* haben diese im PDA in ihrem Review versucht näher zu beleuchten. Sie machen das Tumormilieu für diesen Effekt verantwortlich, vorrangig über den sogenannten „Warburg Effekt“. Es wurden hierbei verschiedene Enzyme erhöht exprimiert vorgefunden, die wiederum Signalwege, die zur Apoptose führen, inhibieren und damit die Wirksamkeit der Therapeutika herabsetzen. Dazu kommen eine vermehrte Zellhypoxie, erhöhte Laktatkonzentrationen sowie verringerte Vaskularisation und Diffusion im Gewebe. Tumorzellen wiederum adaptieren sich an diese Gegebenheiten und fördern sie zugleich. Auch Enzyme wie DPD oder TS kommen in Tumoren häufig vermehrt vor und nehmen so direkten Einfluss auf den Metabolismus und die Wirksamkeit von 5FU (Grasso *et al.* 2017). Die ebenfalls oft verwendete Radiotherapie zeigt in Tumoren alleine auch keine ausreichende Wirksamkeit, sodass die Kombination mit Immuntherapieansätzen auch hier eine erfolgsversprechende Alternative bieten soll (Van Limbergen *et al.* 2017). Es müssen daher weiterhin neue Therapieansätze, ihre Interaktionen sowie die den Interaktionen zugrundeliegende Mechanismen geklärt werden, um die Effektivität der Tumorthérapien zu steigern.

4.4.3 Die Rolle des PD-1-Liganden B7-DC im PDA

Da B7-DC ebenfalls Ligand an PD-1 ist, sollte die Hypothese geklärt werden, ob B7-DC unter Abwesenheit von B7-H1 stärker exprimiert wird und die immunsuppressive Rolle von B7-H1 im PDA übernimmt. Zurzeit liegen zu dieser Hypothese keine vergleichbaren Daten vor. Es konnte bislang gezeigt werden, dass B7-H1 sowie B7-DC inhibitorische Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung haben (Latchman *et al.* 2001). Beide fördern die Proliferation von T_{Reg} im Tumor, welche wiederum suppressiv auf die Immunantwort wirken (Francisco *et al.* 2009). Jedoch ist durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen ebenfalls anzunehmen, dass B7-DC auch T-Zell-Antworten fördern und somit gegensätzliche Effekte zeigen kann (Subudhi *et al.* 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von B7-H1 und B7-DC bereits auf MDSC aus gesunden WT- und KO-Mäusen betrachtet. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur Expression in WT-Mäusen eine höhere Expression von B7-DC auf granulozytären MDSC in KO-Mäusen (Bazhin *et al.* 2014).

Bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse aus Kapitel 3.1.5 zeigten sich deutliche Einflüsse der Therapien auf die B7-DC-Expression. In KO-Milzen zeigten sich ausschließlich signifi-

kant verringerte Expressionen unter den Therapien auf T_{Reg} , MDSC und $Ly6C^+$ -MDSC. In KO-Tumoren stieg die Expression wiederum signifikant auf emT- $CD4^+$ -, cmT- $CD4^+$ - sowie emT- $CD8^+$ -Zellen unter Therapie mit IFN und/oder IFN-5FU. Neben dem deutlichen Einfluss von IFN auf die B7-DC-Expression zeigt sich hierbei eine gesteigerte Expression auf v.a. $CD4^+$ - und $CD8^+$ -Gedächtniszellen im Tumor, die bei Betrachtung der B7-H1-Expression in WT-Tumoren nicht vorzufinden war. Nur im Hinblick auf die Expression von B7-H1 und B7-DC auf $Ly6C^+$ -MDSC ließ sich ein vergleichbarer Einfluss von IFN in Tumoren beobachten. Auch in den Ex-vivo-Untersuchungen aus Kapitel 3.3.3 und 3.3.4 konnten keine signifikanten Veränderungen der B7-DC-, aber auch nicht der B7-H1-Expression unter Einfluss der Therapien gezeigt werden. Vergleicht man den Einfluss der Therapien auf die Expression von B7-H1 und B7-DC (Kapitel 3.1.4 und 3.1.5) insgesamt sind keine gleichgerichteten Veränderungen darzustellen. B7-DC scheint somit nicht die Funktion von B7-H1 unter dessen Abwesenheit zu übernehmen. *Swaika et al.* verglichen in ihrem Review Daten zur Blockierung von PD-1 mit denen einer B7-H1-Blockierung im Tumor. Es konnte kein bedeutender klinischer Unterschied festgestellt werden, was ebenfalls annehmen lässt, dass die Rolle von B7-DC am PD-1 Rezeptor im Tumorgeschehen im Vergleich zu B7-H1 deutlich geringer ist (*Swaika et al.* 2015). *Yearley et al.* konnten wiederum in Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich einen negativen Einfluss von B7-DC auf die Überlebenszeit zeigen. Dieser Einfluss soll unabhängig von B7-H1 bestehen, sodass von einem Vorteil der Blockierung beider PD-1-Liganden in diesem Tumor ausgegangen wird (*Yearley et al.* 2017).

4.4.4 B7-H1-Antikörper als praxisnaher Therapieansatz im PDA

Wie vorab in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (*Von Ahn* 2015), waren auch in der vorliegenden Arbeit die Überlebenszeiten tumortragender KO-Mäuse signifikant höher als die tumortragender WT-Mäuse. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Tumolvolumen in tumortragenden KO-Mäusen signifikant kleiner war als in WT-Mäusen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bauen auf denen unserer Arbeitsgruppe sowie auch auf die Erkenntnisse von *Loos et al.* auf, die die Rolle von B7-H1 im PDA zuvor weiter verdeutlichen konnten (*Loos et al.* 2008). Es wurde bereits vorab gezeigt, dass Tumorzellen selbst B7-H1 exprimieren (*Bazhin et al.* 2013, *Bazhin et al.* 2014, *Blank et al.* 2004). *Loos et al.* bestätigten diese Erkenntnisse mit einer erhöhten Expression von B7-H1 sowie auch B7-DC auf PDA-Tumorzellen. Ihr zugehöriger Rezeptor PD-1 konnte jedoch nicht auf Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Expression von B7-H1 ließ sich durch IFN- γ induzieren, welches zudem im PDA vermehrt gemessen werden konnte. Die Expression vom tumorzell-assoziierten B7-H1 korrelierte mit einem erhöhten Anteil an T_{Reg} im PDA und senkte zudem in vivo die Zahl

an CD8⁺-T-Zellen. Zudem konnte die Konzentration an B7-H1, jedoch nicht B7-DC, mit verlängerter postoperativer Überlebenszeit der PDA-erkrankten Patienten in Verbindung gebracht werden (Loos *et al.* 2008).

Diese früheren Untersuchungen zeigten bereits die wichtige immunsuppressive Rolle von B7-H1 im PDA auf, welche durch unsere Arbeitsgruppe weiter vertieft wurde. So hat die vorliegende Arbeit u.a. den Therapieansatz, die Blockade von B7-H1 mittels monoklonaler Antikörper, erneut aufgefasst und um die Erkenntnis, dass B7-H1 auf den Tumorzellen selbst exprimiert wird, erweitert. Es konnte im Mausmodell durch Verwendung von WT-Mäusen in der Kombination mit Anti-B7-H1-Antikörpern eine potente Reduktion des B7-H1-Einflusses erzeugt werden, was sich in verlängerten Überlebenszeiten darstellte, wie sie auch bereits in anderen Tumorarten gezeigt werden konnte (Brahmer *et al.* 2012). Die Blockade von B7-H1, im Gegensatz zur Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen PD-1 (Lipson *et al.* 2013, Topalian *et al.* 2012), hat zudem den weiteren Vorteil, dass unbekannte Wirkmechanismen von B7-H1 mit anderen Rezeptoren ausgeschlossen werden können. Somit lässt sich eine zusätzlich verbesserte Überlebenszeit vermuten, verwendet man zusätzlich zu Anti-B7-H1-Antikörpern B7-H1-KO-Mäuse. Da Antikörper im Gegensatz zum Knock-out bestimmter Gene auch in der humanmedizinischen Therapie Verwendung finden können, wurde somit ein für die Zukunft praxisnaher Therapieansatz gewählt.

Die zusätzliche Untersuchung der Zytokinkonzentrationen in Blutseren von tumortragenden WT-Mäusen mit und ohne Therapie mit B7-H1-Antikörpern erlaubt zudem einen Einblick in die Auswirkungen von B7-H1 auf die Immunlage im Organismus. Signifikante Erhöhungen der Konzentrationen von IFN- γ , IL-13, KC und VEGF wurden dabei festgestellt. Die IL-2- und TGF- β -Konzentrationen waren signifikant erniedrigt. Somit ließen sich vorrangig immunstimulierende Zytokine unter Abwesenheit von B7-H1 als signifikant erhöht nachweisen. In einer Untersuchung von Loos *et al.* war unter Anwesenheit von B7-H1 der Anteil an T_{Reg} signifikant erhöht (Loos *et al.* 2008), welche wiederum TGF- β sezernieren (Murphy 2011) und somit die Effektor-T-Zell-Proliferation und Zytokinausschüttung, d.h. die Antitumorantwort, eindämmen konnten (Thornton und Shevach 1998). Die signifikant verringerten Konzentrationen an TGF- β in dieser Versuchsreihe können diesen vorab gezeigten Zusammenhang unterstützen. Der erhöhte Anteil an IFN- γ , welches von T_H1- und zytotoxischen T-Zellen (*cycotoxic T-cells*=CTL) sezerniert wird (Murphy 2011), unterstützt zusätzlich die Hypothese einer besseren Antitumorantwort durch eine aktivierte T-Zellantwort. T_{Reg} benötigen zudem zur Vermehrung und zum Überleben IL-2, welches signifikant erniedrigt war (Malek und Bayer 2004). Eine verbesserte Antitumorantwort bei Verwendung von B7-H1-Antikörpern im PDA wurde bereits *in vitro* durch Fife *et al.* gezeigt (Fife *et al.* 2009). Der signifikant höhere Anteil an KC, das von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert wird, deutet

auch auf eine Erhöhung der Makrophagenaktivität unter Abwesenheit von B7-H1 hin, was wiederum durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Kapitel 4.3.3). KC hat einen immunstimulierenden Effekt durch die Mobilisation von neutrophilen Granulozyten (Murphy und Weaver 2018). Kritisch zu betrachten ist die signifikant erhöhte Konzentration an VEGF, dessen Bedeutung bereits in Kapitel 4.4.1 diskutiert wurde. VEGF wird unter anderem von M2-Makrophagen sezerniert (Wyckoff *et al.* 2004), welche durch IL-4 und IL-13 aktiviert werden (Murphy 2011). Das signifikant höhere Vorkommen von IL-13 könnte das Vorliegen dieser Makrophagen-Subpopulation begünstigt haben.

Es gibt zahlreiche weitere Studien, die sich der Blockade von B7-H1 und/oder der PD-1/PD-L1-Interaktion in verschiedenen Tumorarten gewidmet haben (Hamid *et al.* 2013, Pardoll 2012, Topalian *et al.* 2012, Zou *et al.* 2016). Auch die Verwendung von beladenen Nanopartikeln, die zugleich inhibierende Angiogenesefaktoren tragen, kommen zum Einsatz und verbessern die Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika (Sun *et al.* 2018).

Insgesamt konnten anhand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von B7-H1 als immunsuppressorisches Molekül sowie der Vorteil der Blockade von B7-H1 als Therapieansatz im PDA dargestellt werden. Auch das Verhalten von Makrophagen und MDSC sowie das vermehrte Vorkommen von T_{Reg} im PDA als bekannter, negativer prognostischer Faktor, konnten gezeigt und unter Berücksichtigung der Zytokinkonzentrationen weitere, mögliche Zusammenhänge im Tumormilieu erörtert werden. Der Einfluss der Therapie mit 5-Fluorouracil sowie die kombinierte Therapie mit Interferon- α , als bereits gängiger Ansatz einer Form der Immuntherapie im PDA, flossen mit in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein und zeigten anhand gemischter Ergebnisse die bekannte Schwierigkeit der Therapie des PDA auf, sei es durch die bestehende Chemotherapieresistenz, die nur teilweise durch die kombinierte Verwendung von IFN als Chemosensibilisator verbessert werden konnte oder die immer noch nicht bis ins Detail verstandene Komplexität des Tumormilieus mit seinem enormen, suppressiven Einfluss. Das PDA bleibt weiterhin eine gefürchtete Neoplasie mit später Diagnose, vielen Risikofaktoren, verminderter Ansprechbarkeit auf Therapien und schlechter Prognose.

5 Zusammenfassung

Die Rolle des Moleküls B7-H1 in der Immuntherapie des Pankreasadenokarzinoms im murinen Panc02-Modell

Das Pankreasadenokarzinom (PDA) stellt eine sehr häufige, schwer therapierbare und zu meist tödlich verlaufende Neoplasie dar. Daher werden aktuell vermehrt im Bereich der Immuntherapie neue Therapieansätze gesucht. B7-H1 ist ein Molekül mit regulatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften, das im PDA mit einer schlechten Prognose korreliert. Aufgrund des sehr komplexen Tumormilieus im PDA sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von B7-H1 auf dieses näher geklärt werden. Genauer betrachtet wurden hierbei tumorinfiltrierende Makrophagen sowie B7-DC, welches wie B7-H1 an denselben Rezeptor bindet und dessen Rolle noch relativ wenig geklärt ist.

Zur Untersuchung diente in dieser Arbeit ein murines Panc02-Modell, für das C75-B1/6 (WT) sowie B7-H1-Knockout-Mäuse (KO) verwendet wurden. Um den Einfluss von Chemo- und Immuntherapien im PDA in die Untersuchungen einfließen zu lassen, wurden 5-Fluorouracil (5FU) und Interferon- α (IFN- α), wie sie im CapRI-Schema der *Universität Heidelberg* eingesetzt werden, ergänzt. Mittels fluoreszenz-gekoppelter Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*=FACS) konnten Immunzellexpressionen und mittels Luminex-Technologie Zytokinkonzentrationen erhoben werden. Eine genauere Betrachtung des Verhaltens von Makrophagen im PDA konnte mittels magnetischer Zellisolation (*magnetic activated cell sorting*=MACS) ermöglicht werden. Da B7-H1 verstärkt auf Tumorzellen exprimiert wird, wurde zudem die Blockade von B7-H1 mittels Antikörper in vivo untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine reduzierte T-Zell-Antwort unter Einfluss von B7-H1, die durch 5FU und IFN- α bedingt verbessert werden konnte. Die Therapie förderte jedoch zeitgleich die B7-H1-Expression. Unter Einfluss von B7-H1 zeigten sich zudem höhere Mengen an tumorinfiltrierenden M2-Makrophagen sowie erhöhte Tumorumfänge. Es konnte zudem anhand aus Tumoren stammender Makrophagen deren bereits beschriebenes, immunsuppressives Verhalten anhand fehlender Stimulation von T-Zellen zur Proliferation, Schaffung eines immunsuppressiven Milieus sowie reduzierter Phagozytoseaktivität gezeigt werden. B7-DC zeigte keine deutlichen Veränderungen unter Abwesenheit von B7-H1. Die Blockade von B7-H1 mittels Antikörper erwies sich dafür als möglicher, praxisnaher Therapieansatz mit deutlich verlängerter Überlebenszeit.

6 Summary

The role of B7-H1 in immunotherapy of pancreatic cancer in the murine Panc02 model

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is a quite frequent, hardly treatable and usually terminal neoplasia. Therefore, new approaches in cancer-immunotherapy are currently being searched for. B7-H1 represents a molecule with regulatory and immunosuppressive properties that is being positively correlated with poor prognosis in PDA. Due to the high complexity of the PDA tumor environment, this thesis is aimed at clarifying the influence of B7-H1 in this environment. Especially tumor-infiltrating macrophages and B7-DC, a ligand that binds to the same receptor as B7-H1 and whose role in the PDA is up to now hardly known, were examined.

The research deployed a murine Panc02 model in C75-B1/6 (WT) and B7-H1 knockout mice (KO). In order to incorporate the impact of the currently used chemo- and immunotherapy, chemotherapeutic 5-fluorouracil (5FU) and interferon- α (IFN- α) – as it is demonstrated in the CapRI scheme of the *Universität Heidelberg* – were added. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and the Luminex technology were used for analyzing immune cell expression and cytokine concentration, while magnetic activated cell sorting (MACS) was used for studying macrophages. Knowing that PDA cells also express B7-H1 on their surface, this research included therapy with monoclonal anti-B7-H1-antibodies in tumor-bearing WT-mice.

The results of this thesis showed a reduced T-cell response under the influence of B7-H1 with limited improvement when treated with 5FU and IFN- α . On the other hand, this treatment stimulated B7-H1 expression. In the presence of B7-H1 an increased amount of tumor-infiltrating M2-macrophages and an increase in tumor volume was detected. Furthermore, the immunosuppressive behavior of tumor-infiltrating macrophages was demonstrated with regard to the lack of T-cell proliferation, their promotion of an immunosuppressive tumor milieu as well as their reduced phagocytic activity. B7-DC did not show significant changes under absence of B7-H1 as was presumed. The blockade of B7-H1 using monoclonal antibodies resulted in increased survival of tumor-bearing mice and could therefore represent a new therapy approach for pancreatic cancer.

7 Literaturverzeichnis

Aderem, A. und D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**:593-623.

Baluk, P., H. Hashizume und D. M. McDonald (2005). "Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer." Curr Opin Genet Dev **15**(1):102-11.

Banner, B. F., J. Alroy und R. M. Kipnis (1979). "Acinar cell carcinoma of the pancreas in a cat." Vet Pathol **16**(5):543-7.

Bazhin, A. V., J. Bayry, V. Umansky, J. Werner und S. Karakhanova (2013). "Overcoming immunosuppression as a new immunotherapeutic approach against pancreatic cancer." Oncoimmunology **2**(9):e25736.

Bazhin, A. V., I. Shevchenko, V. Umansky, J. Werner und S. Karakhanova (2014). "Two immune faces of pancreatic adenocarcinoma: possible implication for immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **63**(1):59-65.

Bazhin, A. V., K. von Ahn, C. Maier, S. Soltek, S. Serba, L. Diehl, J. Werner und S. Karakhanova (2014). "Immunological in vivo effects of B7-H1 deficiency." Immunol Lett **162**(2 Pt B):273-86.

Beger, H. G., M. W. Büchler, H. Dralle, M. M. Lerch, P. Malfertheiner, J. Mössner und J. F. Riemann (2013). Erkrankungen des Pankreas. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, S.521, 9783642379635.

Beger, H. G., S. Matsuno und J. L. Cameron (2008). Diseases of the Pancreas: Current Surgical Therapy. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag, S.949, 9783540286561.

Bent, R., L. Moll, S. Grabbe und M. Bros (2018). "Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies?" Int J Mol Sci **19**(8):2155.

Biswas, S. K. und A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." Nat Immunol **11**(10):889-96.

Blank, C., I. Brown, A. C. Peterson, M. Spiotto, Y. Iwai, T. Honjo und T. F. Gajewski (2004). "PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells." Cancer Res **64**(3):1140-5.

Blank, C., J. Kuball, S. Voelkl, H. Wiendl, B. Becker, B. Walter, O. Majdic, T. F. Gajewski, M. Theobald, R. Andreesen und A. Mackensen (2006). "Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro." Int J Cancer **119**(2):317-27.

Bluestone, J. A. und A. K. Abbas (2003). "Natural versus adaptive regulatory T cells." Nat Rev Immunol **3**(3):253-7.

Boehm, U., T. Klamp, M. Groot und J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**:749-95.

Brahmer, J. R., S. S. Tykodi, L. Q. Chow, W. J. Hwu, S. L. Topalian, P. Hwu, C. G. Drake, L. H. Camacho, J. Kauh, K. Odunsi, H. C. Pitot, O. Hamid, S. Bhatia, R. Martins, K. Eaton, S. Chen, T. M. Salay, S. Alaparthi, J. F. Grosso, A. J. Korman, S. M. Parker, S. Agrawal, S. M. Goldberg, D. M. Pardoll, A. Gupta und J. M. Wigginton (2012). "Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer." N Engl J Med **366**(26):2455-65.

Brassard, D. L., M. J. Grace und R. W. Borden (2002). "Interferon- α as an immunotherapeutic protein." J Leukoc Biol **71**(4):565-81.

Bronte, V., P. Serafini, A. Mazzoni, D. M. Segal und P. Zanovello (2003). "L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions." Trends Immunol **24**(6):302-6.

Brower, V. (2012). "Macrophages: cancer therapy's double-edged sword." J Natl Cancer Inst **104**(9):649-52.

Budras, K.-D., S. Reese, Müllung C., Pfarrer C. und Kölle S. (2012). Atlas der Anatomie des Hundes. Hannover, Schlütersche-Verlag, 9. Auflage, S.292, 9783899930795.

Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe und G. J. Freeman (2007). "Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses." Immunity **27**(1):111-22.

Capelli, P., G. Martignoni, F. Pedica, M. Falconi, D. Antonello, G. Malpeli und A. Scarpa (2009). "Endocrine neoplasms of the pancreas: pathologic and genetic features." Arch Pathol Lab Med **133**(3):350-64.

Chang, J. H., Y. Jiang und V. G. Pillarisetty (2016). "Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application: An updated review." Medicine (Baltimore) **95**(49):e5541.

Clark, C. E., G. L. Beatty und R. H. Vonderheide (2009). "Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer." Cancer Lett **279**(1):1-7.

Corbett, T. H., B. J. Roberts, W. R. Leopold, J. C. Peckham, L. J. Wilkoff, D. P. Griswold, Jr. und F. M. Schabel, Jr. (1984). "Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice." Cancer Res **44**(2):717-26.

Dahme, E. und E. Weiss (2007). Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Stuttgart, Enke-Verlag, 6. Auflage, S.456, 9783830410485.

Disis, M. L., H. Bernhard und E. M. Jaffee (2009). "Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment." Lancet **373**(9664):673-83.

Dong, H. und X. Chen (2006). "Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses." Cell Mol Immunol **3**(3):179-87.

Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis und L. Chen (2002). "Tumor-associated B7-H1

promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." Nat Med **8**(8):793-800.

Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, D. B. Flies, J. M. van Deursen und L. Chen (2004). "B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes." Immunity **20**(3):327-36.

Ehehalt, F. und R. Grutzmann (2011). "Familial pancreatic carcinoma." Chirurg **82**(8):737-45.

Esposito, I., J. Kleeff, F. Bergmann, C. Reiser, E. Herpel, H. Friess, P. Schirmacher und M. W. Buchler (2008). "Most pancreatic cancer resections are R1 resections." Ann Surg Oncol **15**(6):1651-60.

Fife, B. T., K. E. Pauken, T. N. Eagar, T. Obu, J. Wu, Q. Tang, M. Azuma, M. F. Krummel und J. A. Bluestone (2009). "Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal." Nat Immunol **10**(11):1185-92.

Fleming, T. J., M. L. Fleming und T. R. Malek (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." J Immunol **151**(5):2399-408.

Francisco, L. M., V. H. Salinas, K. E. Brown, V. K. Vanguri, G. J. Freeman, V. K. Kuchroo und A. H. Sharpe (2009). "PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells." J Exp Med **206**(13):3015-29.

Frey, H.-H. und W. Löscher (2010). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart, Enke-Verlag, 3. Auflage, S.672, 9783830410799.

Gabitass, R. F., N. E. Annels, D. D. Stocken, H. A. Pandha und G. W. Middleton (2011). "Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13." Cancer Immunol Immunother **60**(10):1419-30.

Gabrilovich, D. I. und S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3):162-74.

Goedegebuure, P., J. B. Mitchem, M. R. Porembka, M. C. Tan, B. A. Belt, A. Wang-Gillam, W. E. Gillanders, W. G. Hawkins und D. C. Linehan (2011). "Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer." Curr Cancer Drug Targets **11**(6):734-51.

Goerdts, S. und C. E. Orfanos (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." Immunity **10**(2):137-42.

Gordon, S., J. Hamann, H. H. Lin und M. Stacey (2011). "F4/80 and the related adhesion-GPCRs." Eur J Immunol **41**(9):2472-6.

Gordon, S. R., R. L. Maute, B. W. Dulken, G. Hutter, B. M. George, M. N. McCracken, R. Gupta, J. M. Tsai, R. Sinha, D. Corey, A. M. Ring, A. J. Connolly und I. L. Weissman (2017). "PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour

immunity." Nature **545**(7655):495-99.

Grasso, C., G. Jansen und E. Giovannetti (2017). "Drug resistance in pancreatic cancer: Impact of altered energy metabolism." Crit Rev Oncol Hematol **114**:139-52.

Graumann, W. und D. Sasse (2004). Compact Lehrbuch Anatomie 03 : Innere Organsysteme. Stuttgart, Schattauer-Verlag, 1. Auflage, S.573, 9783794520633.

Greenwald, R. J., G. J. Freeman und A. H. Sharpe (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**:515-48.

Hamid, O., C. Robert, A. Daud, F. S. Hodi, W. J. Hwu, R. Kefford, J. D. Wolchok, P. Hersey, R. W. Joseph, J. S. Weber, R. Dronca, T. C. Gangadhar, A. Patnaik, H. Zarour, A. M. Joshua, K. Gergich, J. Ellassais-Schaap, A. Algazi, C. Mateus, P. Boasberg, P. C. Tumeh, B. Chmielowski, S. W. Ebbinghaus, X. N. Li, S. P. Kang und A. Ribas (2013). "Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma." N Engl J Med **369**(2):134-44.

Hamilton, S. R. und L. A. Aaltonen (2000). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of tumours of the digestive system. Lyon, IARC Press, S.320, 9789283224105.

Hanson, E. M., V. K. Clements, P. Sinha, D. Ilkovitch und S. Ostrand-Rosenberg (2009). "Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells." J Immunol **183**(2):937-44.

Harris, T. J. und C. G. Drake (2013). "Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy." J Immunother Cancer **1**:12.

Heckmann, M., F. Lang und R. F. Schmidt (2010). Physiologie des Menschen. Heidelberg, Springer Medizin Verlag 31. Auflage, S.979, 9783642016509.

Hoffbrand, A.V. (2003). Grundkurs Hämatologie. Berlin Wien, Blackwell-Verlag, 2. Auflage, S.359, 9783894125141.

Hoffmann-La-Roche-Aktiengesellschaft und D. Reiche (2003). Roche Lexikon Medizin. München Jena, Elsevier-Verlag, Urban and Fischer, 5. Auflage, S.2086, 9783437151569.

Holbrook, J., S. Lara-Reyna, H. Jarosz-Griffiths und M. McDermott (2019). "Tumour necrosis factor signalling in health and disease." F1000Research **8**(F1000 Faculty Rev):111.

Huo, Y., C. Weber, S. B. Forlow, M. Sperandio, J. Thatte, M. Mack, S. Jung, D. R. Littman und K. Ley (2001). "The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium." J Clin Invest **108**(9):1307-14.

Ino, Y., R. Yamazaki-Itoh, K. Shimada, M. Iwasaki, T. Kosuge, Y. Kanai und N. Hiraoka (2013). "Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer." Br J Cancer **108**(4):914-23.

Kaatsch, P., C. Spix, A. Katalinic, S. Hentschel, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, M. Christ, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann und S. Klein (2015). Krebs in Deutschland

2011/2012. Robert Koch-Institut. **10** : 156.

Karakhanova, S., S. Meisel, S. Ring, K. Mahnke und A. H. Enk (2010). "ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets." Eur J Immunol **40**(1):254-66.

Karakhanova, S., B. Mosl, S. Harig, K. von Ahn, J. Fritz, J. Schmidt, D. Jager, J. Werner und A. V. Bazhin (2014). "Influence of interferon-alpha combined with chemo (radio) therapy on immunological parameters in pancreatic adenocarcinoma." Int J Mol Sci **15**(3):4104-25.

Kessler, M. (2012). Kleintieronkologie: Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze. Stuttgart, Enke-Verlag, 3. Auflage, S.552, 9783830411376.

Kim, H. W., J. C. Lee, K. H. Paik, J. Kang, J. Kim und J. H. Hwang (2017). "Serum interleukin-6 is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma progression pattern." Medicine (Baltimore) **96**(5):e5926.

Kim, Y. J., W. J. Lee, S. M. Woo, T. H. Kim, S. S. Han, B. H. Kim, S. H. Moon, S. S. Kim, Y. H. Koh, S. J. Park, J. Y. Kim, D. Y. Kim und J. W. Park (2013). "Comparison of capecitabine and 5-fluorouracil in chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer." Radiat Oncol **8**(1):160.

Kizilbash, S. H., K. C. Ward, J. J. Liang, I. Jaiyesimi und J. Lipscomb (2014). "Survival outcomes in patients with early stage, resected pancreatic cancer - a comparison of gemcitabine- and 5-fluorouracil-based chemotherapy and chemoradiation regimens." Int J Clin Pract **68**(5):578-89.

Knaebel, H. P., A. Marten, J. Schmidt, K. Hoffmann, C. Seiler, K. Lindel, H. Schmitz-Winnenthal, S. Fritz, T. Herrmann, H. Goldschmidt, R. Krempien, U. Mansmann, J. Debus, V. Diehl und M. W. Buchler (2005). "Phase III trial of postoperative cisplatin, interferon alpha-2b, and 5-FU combined with external radiation treatment versus 5-FU alone for patients with resected pancreatic adenocarcinoma -- CapRI: study protocol [ISRCTN62866759]." BMC Cancer **5**:37.

Koizumi, M., Y. Hiasa, T. Kumagi, H. Yamanishi, N. Azemoto, T. Kobata, B. Matsuura, M. Abe und M. Onji (2013). "Increased B cell-activating factor promotes tumor invasion and metastasis in human pancreatic cancer." PLoS One **8**(8):e71367.

Krejs, G. J. (2010). "Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors." Dig Dis **28**(2):355-8.

Kumar, S. und S. O'Rahilly (2005). Insulin Resistance: Insulin Action and its Disturbances in Disease. West Sussex, John Wiley and Sons Ltd, S.616, 9780470011324.

Kusmartsev, S. und D. I. Gabrilovich (2003). "Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species." J Leukoc Biol **74**(2):186-96.

Kwakkenbos, Mark J., Else N. Kop, Martin Stacey, Mourad Matmati, Siamon Gordon, Hsi-Hsien Lin und Jörg Hamann (2004). "The EGF-TM7 family: a postgenomic view." Immunogenetics **55**(10):655-666.

- Laghi, A. (2010). New Concepts in Diagnosis and Therapy of Pancreatic Adenocarcinoma. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, S.178, 9783540853800.
- Laheru, D. und E. M. Jaffee (2005). "Immunotherapy for pancreatic cancer - science driving clinical progress." Nat Rev Cancer **5**(6):459-67.
- Latchman, Y., C. R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A. J. Long, J. A. Brown, R. Nunes, E. A. Greenfield, K. Bourque, V. A. Boussiotis, L. L. Carter, B. M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T. Honjo, A. H. Sharpe und G. J. Freeman (2001). "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." Nat Immunol **2**(3):261-8.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas und J. A. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol **14**:233-58.
- Lewkowich, I. P., S. Lajoie, S. L. Stoffers, Y. Suzuki, P. K. Richgels, K. Dienger, A. A. Sproles, H. Yagita, Q. Hamid und M. Wills-Karp (2013). "PD-L2 modulates asthma severity by directly decreasing dendritic cell IL-12 production." Mucosal Immunol **6**(4):728-39.
- Li, X. und Y. Zheng (2015). "Regulatory T cell identity: formation and maintenance." Trends Immunol **36**(6):344-53.
- Lipson, E. J., W. H. Sharfman, C. G. Drake, I. Wollner, J. M. Taube, R. A. Anders, H. Xu, S. Yao, A. Pons, L. Chen, D. M. Pardoll, J. R. Brahmer und S. L. Topalian (2013). "Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody." Clin Cancer Res **19**(2):462-8.
- Liu, X., J. X. Gao, J. Wen, L. Yin, O. Li, T. Zuo, T. F. Gajewski, Y. X. Fu, P. Zheng und Y. Liu (2003). "B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism." J Exp Med **197**(12):1721-30.
- Liu, Y., B. Zeng, Z. Zhang, Y. Zhang und R. Yang (2008). "B7-H1 on myeloid-derived suppressor cells in immune suppression by a mouse model of ovarian cancer." Clin Immunol **129**(3):471-81.
- Longley, D. B., D. P. Harkin und P. G. Johnston (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." Nat Rev Cancer **3**(5):330-8.
- Loos, M., N. A. Giese, J. Kleeff, T. Giese, M. M. Gaida, F. Bergmann, M. Laschinger, W. Buchler M und H. Friess (2008). "Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer." Cancer Lett **268**(1):98-109.
- Lowy, A. M., S. D. Leach und P. Philip (2008). Pancreatic Cancer. New York, USA, Springer Science and Business Media, S.744, 9780387692524.
- Lu, X. (2017). "Impact of IL-12 in Cancer." Curr Cancer Drug Targets **17**(8):682-697.
- Ma, J. H., E. Patrut, J. Schmidt, H. P. Knaebel, M. W. Buchler und A. Marten (2005). "Synergistic effects of interferon-alpha in combination with chemoradiation on human pancreatic adenocarcinoma." World J Gastroenterol **11**(10):1521-8.

- MacLeod, M. K., E. T. Clambey, J. W. Kappler und P. Marrack (2009). "CD4 memory T cells: what are they and what can they do?" Semin Immunol **21**(2):53-61.
- Maeda, A., T. Kawamura, T. Ueno, N. Usui und S. Miyagawa (2014). "Monocytic suppressor cells derived from human peripheral blood suppress xenogenic immune reactions." Xenotransplantation **21**(1):46-56.
- Mahic, M., S. Yaqub, C. C. Johansson, K. Tasken und E. M. Aandahl (2006). "FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism." J Immunol **177**(1):246-54.
- Malek, T. R. und A. L. Bayer (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." Nat Rev Immunol **4**(9):665-74.
- Mantovani, A., G. Germano, F. Marchesi, M. Locatelli und S. K. Biswas (2011). "Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions." Eur J Immunol **41**(9):2522-5.
- Mantovani, A. und A. Sica (2010). "Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity." Curr Opin Immunol **22**(2):231-7.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi und M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12):677-86.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena und A. Sica (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." Trends Immunol **23**(11):549-55.
- Marten, A., N. Zeiss, S. Serba, S. Mehrle, M. von Lilienfeld-Toal und J. Schmidt (2008). "Bortezomib is ineffective in an orthotopic mouse model of pancreatic adenocarcinoma." Mol Cancer Ther **7**(11):3624-31.
- Martignoni, M. E., P. Kunze, W. Hildebrandt, B. Kunzli, P. Berberat, T. Giese, O. Kloters, J. Hammer, M. W. Buchler, N. A. Giese und H. Friess (2005). "Role of mononuclear cells and inflammatory cytokines in pancreatic cancer-related cachexia." Clin Cancer Res **11**(16):5802-8.
- Mazzieri, R., F. Pucci, D. Moi, E. Zonari, A. Ranghetti, A. Berti, L. S. Politi, B. Gentner, J. L. Brown, L. Naldini und M. De Palma (2011). "Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells." Cancer Cell **19**(4):512-26.
- McDonald, D. M. und P. Baluk (2005). "Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture." Chest **128**(6 Suppl):602S-608S.
- Medin, J. und D. H. Fowler (2011). Experimental and applied immunotherapy. New York, Humana Press, S.442, 9781607619802.

- Minkus, G., U. Jutting, M. Aubele, K. Rodenacker, P. Gais, W. Breuer und W. Hermanns (1997). "Canine neuroendocrine tumors of the pancreas: a study using image analysis techniques for the discrimination of metastatic versus nonmetastatic tumors." Vet Pathol **34**(2):138-45.
- Miyara, M. und S. Sakaguchi (2007). "Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression." Trends Mol Med **13**(3):108-16.
- Mordue, D. G. und L. D. Sibley (2003). "A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis." J Leukoc Biol **74**(6):1015-25.
- Mosmann, T. R. und R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**:145-73.
- Mosser, D. M. und J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12):958-69.
- Movahedi, K., D. Laoui, C. Gysemans, M. Baeten, G. Stange, J. Van den Bossche, M. Mack, D. Pipeleers, P. In't Veld, P. De Baetselier und J. A. Van Ginderachter (2010). "Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes." Cancer Res **70**(14):5728-39.
- Munding, J., W. Uhl und A. Tannapfel (2011). "R classification and pancreatic ductal adenocarcinoma--R 0 is R 0." Z Gastroenterol **49**(10):1423-7.
- Murphy, K.M. (2011). Janeway's Immunobiology. New York Abingdon, Taylor and Francis Group, 8. Auflage, S.888, 9781136665219.
- Murphy, K.M. und C. Weaver (2018). Janeway Immunologie. Heidelberg, Springer-Spektrum, 9. Auflage, S.1207, 9783662560037.
- Murray, P. J. und T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11):723-37.
- Noy, R. und J. W. Pollard (2014). "Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy." Immunity **41**(1):49-61.
- Obst, R., H. M. van Santen, D. Mathis und C. Benoist (2005). "Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response." J Exp Med **201**(10):1555-65.
- Ohmori, Y. und T. A. Hamilton (1994). "IFN-gamma selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages." J Immunol **153**(5):2204-12.
- Oikawa, T., H. Takahashi, T. Ishikawa, A. Hokari, N. Otsuki, M. Azuma, M. Zeniya und H. Tajiri (2007). "Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease." Pathol Int **57**(8):485-92.

- Okudaira, K., R. Hokari, Y. Tsuzuki, Y. Okada, S. Komoto, C. Watanabe, C. Kurihara, A. Kawaguchi, S. Nagao, M. Azuma, H. Yagita und S. Miura (2009). "Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model." Int J Oncol **35**(4):741-9.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2010). "Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity." Cancer Immunology Immunotherapy **59**(10):1593-1600.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **12**(4):252-64.
- Partecke, L. I., M. Sendler, A. Kaeding, F. U. Weiss, J. Mayerle, A. Dummer, T. D. Nguyen, N. Albers, S. Speerforck, M. M. Lerch, C. D. Heidecke, W. von Bernstorff und A. Stier (2011). "A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines." Eur Surg Res **47**(2):98-107.
- Pelzer, U., M. Sinn, J. Stieler und H. Riess (2014). "Multimodal treatment of pancreatic cancer." Internist (Berl) **55**(1):31-6.
- Pepper, M. und M. K. Jenkins (2011). "Origins of CD4(+) effector and central memory T cells." Nat Immunol **12**(6):467-71.
- Pfeffer, L. M., C. A. Dinarello, R. B. Herberman, B. R. Williams, E. C. Borden, R. Bordens, M. R. Walter, T. L. Nagabhushan, P. P. Trotta und S. Pestka (1998). "Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons." Cancer Res **58**(12):2489-99.
- Picozzi, V. J., R. A. Kozarek und L. W. Traverso (2003). "Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma." Am J Surg **185**(5):476-80.
- Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." Nat Rev Cancer **4**(1):71-8.
- Prendergast, G. C. und E. M. Jaffee (2013). Cancer Immunotherapy. San Diego London Waltham, Elsevier, 2. Auflage, S.688, 9780123942968.
- Priester, W. A. (1974). "Data from eleven United States and Canadian colleges of veterinary medicine on pancreatic carcinoma in domestic animals." Cancer Res **34**(6):1372-5.
- Raber, P. L., P. Thevenot, R. Sierra, D. Wyczechowska, D. Halle, M. E. Ramirez, A. C. Ochoa, M. Fletcher, C. Velasco, A. Wilk, K. Reiss und P. C. Rodriguez (2014). "Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways." Int J Cancer **134**(12):2853-64.
- Raimondi, S., P. Maisonneuve und A. B. Lowenfels (2009). "Epidemiology of pancreatic cancer: an overview." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(12):699-708.
- Rink, L., A. Kruse und H. Haase (2015). Immunologie für Einsteiger. Berlin Heidelberg,

Springer-Verlag, 2. Auflage, S.270, 9783662448427.

Rmali, K. A., M. C. Puntis und W. G. Jiang (2007). "Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer." Colorectal Dis **9**(1):3-14.

Robert-Koch-Institut (2006). "Bedeutung der Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen in der Umweltmedizin." Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz **5**:468-484.

Rodriguez, P. C. und A. C. Ochoa (2006). "T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative stress." Semin Cancer Biol **16**(1):66-72.

Rodriguez, P. C. und A. C. Ochoa (2008). "Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives." Immunol Rev **222**:180-91.

Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A. H. Zea, M. B. Piazuelo, A. Delgado, P. Correa, J. Brayer, E. M. Sotomayor, S. Antonia, J. B. Ochoa und A. C. Ochoa (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." Cancer Res **64**(16):5839-49.

Rosales, C. und E. Uribe-Querol (2017). "Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity." Biomed Res Int **2017**:18.

Rubio, N. und F. Sanz-Rodriguez (2007). "Induction of the CXCL1 (KC) chemokine in mouse astrocytes by infection with the murine encephalomyelitis virus of Theiler." Virology **358**(1):98-108.

Rueda, C. M., M. E. Moreno-Fernandez, C. M. Jackson, S. G. Kallapur, A. H. Jobe und C. A. Chougnet (2015). "Neonatal regulatory T cells have reduced capacity to suppress dendritic cell function." Eur J Immunol **45**(9):2582-92.

Sanz, I., C. Wei, F. E. Lee und J. Anolik (2008). "Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells." Semin Immunol **20**(1):67-82.

Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras und S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5):878-88.

Schmidt, J., D. Jager, K. Hoffmann, M. W. Buchler und A. Marten (2007). "Impact of interferon-alpha in combined chemoradioimmunotherapy for pancreatic adenocarcinoma (CapRI): first data from the immunomonitoring." J Immunother **30**(1):108-15.

Schreiner, B., M. Mitsdoerffer, B. C. Kieseier, L. Chen, H. P. Hartung, M. Weller und H. Wiendl (2004). "Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **155**(1-2):172-82.

Seder, R. A. und R. Ahmed (2003). "Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector

and memory T cell generation." Nat Immunol **4**(9):835-42.

Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." Nat Rev Immunol **2**(6):389-400.

Solinas, G., G. Germano, A. Mantovani und P. Allavena (2009). "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation." J Leukoc Biol **86**(5):1065-73.

Song, F., K. Ito, T. L. Denning, D. Kuninger, J. Papaconstantinou, W. Gourley, G. Klimpel, E. Balish, J. Hokanson und P. B. Ernst (1999). "Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines." J Immunol **162**(4):2275-80.

Srivastava, M. K., P. Sinha, V. K. Clements, P. Rodriguez und S. Ostrand-Rosenberg (2010). "Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine." Cancer Res **70**(1):68-77.

Stein, M., S. Keshav, N. Harris und S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1):287-92.

Subudhi, S. K., M. L. Alegre und Y. X. Fu (2005). "The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition." J Mol Med (Berl) **83**(3):193-202.

Sun, Z., Y. Zhang, D. Cao, X. Wang, X. Yan, H. Li, L. Huang, X. Qu, C. Kong, H. Qin, M. Wang, W. Xu und L. Liang (2018). "PD-1/PD-L1 pathway and angiogenesis dual recognizable nanoparticles for enhancing chemotherapy of malignant cancer." Drug Deliv **25**(1):1746-55.

Swaika, A., W. A. Hammond und R. W. Joseph (2015). "Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy." Mol Immunol **67**(2 Pt A):4-17.

Taborsky, G. J., Jr. (2010). "The physiology of glucagon." J Diabetes Sci Technol **4**(6):1338-44.

Thews, G. und P. Vaupel (2005). Vegetative Physiologie. Heidelberg, Springer-Verlag, 5. Auflage, S.619, 9783540240709.

Thind, K., L. J. Padrnos, R. K. Ramanathan und M. J. Borad (2017). "Immunotherapy in pancreatic cancer treatment: a new frontier." Therap Adv Gastroenterol **10**(1):168-194.

Thornton, A. M. und E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2):287-96.

Topalian, S. L., F. S. Hodi, J. R. Brahmer, S. N. Gettinger, D. C. Smith, D. F. McDermott, J. D. Powderly, R. D. Carvajal, J. A. Sosman, M. B. Atkins, P. D. Leming, D. R. Spigel, S. J. Antonia, L. Horn, C. G. Drake, D. M. Pardoll, L. Chen, W. H. Sharfman, R. A. Anders, J. M. Taube, T. L. McMiller, H. Xu, A. J. Korman, M. Jure-Kunkel, S. Agrawal, D. McDonald, G.

- D. Kollia, A. Gupta, J. M. Wigginton und M. Sznol (2012). "Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer." N Engl J Med **366**(26):2443-54.
- Van Gassen, N., E. Van Overmeire, G. Leuckx, Y. Heremans, S. De Groef, Y. Cai, Y. Elkrim, C. Gysemans, B. Stijlemans, M. V. de Castele, P. De Baetselier, N. De Leu, H. Heimberg und J. A. Van Ginderachter (2015). "Macrophage dynamics are regulated by local macrophage proliferation and monocyte recruitment in injured pancreas." Eur J Immunol **45**(5):1482-93.
- Van Limbergen, E. J., D. K. De Ruyscher, V. Olivo Pimentel, D. Marcus, M. Berbee, A. Hoeben, N. Rekers, J. Theys, A. Yaromina, L. J. Dubois und P. Lambin (2017). "Combining radiotherapy with immunotherapy: the past, the present and the future." Br J Radiol **90**:20170157.
- Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban und M. Goggins (2011). "Pancreatic cancer." Lancet **378**(9791):607-20.
- Vincent, J., G. Mignot, F. Chalmin, S. Ladoire, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Martin, L. Apetoh, C. Rebe und F. Ghiringhelli (2010). "5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity." Cancer Res **70**(8):3052-61.
- Vitale, G., C. H. van Eijck, P. M. van Koetsveld Ing, J. I. Erdmann, E. J. Speel, K. van der Wansem Ing, D. M. Mooij, A. Colao, G. Lombardi, E. Croze, S. W. Lamberts und L. J. Hofland (2007). "Type I interferons in the treatment of pancreatic cancer: mechanisms of action and role of related receptors." Ann Surg **246**(2):259-68.
- Vollmar, A., I. Zündorf und T. Dingermann (2012). Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2. Auflage, S.451, 9783804728424.
- Von Ahn, K. (2015). B7-H1 as a new molecular target for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. Dissertation. Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen und Chirurgischen Klinik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 9783835963528
- Von Engelhardt, W., G. Breves, M. Diener und G. Gäbel (2015). Physiologie der Haustiere. Stuttgart, Enke Verlag, 5. Auflage, S.676, 9783830412687.
- Von Marschall, Z., A. Scholz, T. Cramer, G. Schafer, M. Schirner, K. Oberg, B. Wiedenmann, M. Hocker und S. Rosewicz (2003). "Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis." J Natl Cancer Inst **95**(6):437-48.
- Vonderheide, R. H., D. L. Bajor, R. Winograd, R. A. Evans, L. J. Bayne und G. L. Beatty (2013). "CD40 immunotherapy for pancreatic cancer." Cancer Immunol Immunother **62**(5):949-54.
- Vonderheide, R. H., J. M. Burg, R. Mick, J. A. Trosko, D. Li, M. N. Shaik, A. W. Tolcher und O. Hamid (2013). "Phase I study of the CD40 agonist antibody CP-870,893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors." Oncoimmunology **2**(1):e23033.

- Wada, H., H. Nagano, H. Yamamoto, I. Arai, H. Ota, M. Nakamura, B. Damdinsuren, T. Noda, S. Marubashi, A. Miyamoto, Y. Takeda, K. Umeshita, Y. Doki, K. Dono, S. Nakamori, M. Sakon und M. Monden (2007). "Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins." Oncol Rep **18**(4):801-9.
- Waldeyer, A., F. Anderhuber, F. Pera und J. Streicher (2012). Waldeyer - Anatomie des Menschen: Lehrbuch und Atlas in einem Band. Berlin Boston, De Gruyter, 19. Auflage, S.1195, 9783110228632.
- Wei, C., C. Yang, S. Wang, D. Shi, C. Zhang, X. Lin und B. Xiong (2019). "M2 macrophages confer resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer through the activation of CCL22/PI3K/AKT signaling." Onco Targets Ther **12**:3051-3063.
- Wiendl, H., M. Mitsdoerffer, D. Schneider, L. Chen, H. Lochmuller, A. Melms und M. Weller (2003). "Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies." FASEB J **17**(13):1892-4.
- Wigmore, S. J., K. C. Fearon, K. Sangster, J. P. Maingay, O. J. Garden und J. A. Ross (2002). "Cytokine regulation of constitutive production of interleukin-8 and -6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer." Int J Oncol **21**(4):881-6.
- Wittekind, C. (2017). TNM Klassifikation maligner Tumoren. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 8. Auflage, S.336, 9783527342808.
- Wyckoff, J., W. Wang, E. Y. Lin, Y. Wang, F. Pixley, E. R. Stanley, T. Graf, J. W. Pollard, J. Segall und J. Condeelis (2004). "A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors." Cancer Res **64**(19):7022-9.
- Xue, S., M. Hu, P. Li, J. Ma, L. Xie, F. Teng, Y. Zhu, B. Fan, D. Mu und J. Yu (2017). "Relationship between expression of PD-L1 and tumor angiogenesis, proliferation, and invasion in glioma." Oncotarget **8**(30):49702-49712.
- Yang, B., H. Kang, A. Fung, H. Zhao, T. Wang und D. Ma (2014). "The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis." Mediators Inflamm **2014**:623759.
- Yang, L., L. M. DeBusk, K. Fukuda, B. Fingleton, B. Green-Jarvis, Y. Shyr, L. M. Matrisian, D. P. Carbone und P. C. Lin (2004). "Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis." Cancer Cell **6**(4):409-21.
- Yearley, J. H., C. Gibson, N. Yu, C. Moon, E. Murphy, J. Juco, J. Lunceford, J. Cheng, L. Q. M. Chow, T. Y. Seiwert, M. Handa, J. E. Tomassini und T. McClanahan (2017). "PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer." Clin Cancer Res **23**(12):3158-3167.
- Yla-Herttuala, S., T. T. Rissanen, I. Vajanto und J. Hartikainen (2007). "Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine." J Am Coll Cardiol **49**(10):1015-26.

- Youn, J. I., M. Collazo, I. N. Shalova, S. K. Biswas und D. I. Gabrilovich (2012). "Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." J Leukoc Biol **91**(1):167-81.
- Youn, J. I. und D. I. Gabrilovich (2010). "The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity." Eur J Immunol **40**(11):2969-75.
- Youn, J. I., S. Nagaraj, M. Collazo und D. I. Gabrilovich (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." J Immunol **181**(8):5791-802.
- Zea, A. H., P. C. Rodriguez, M. B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier und A. C. Ochoa (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." Cancer Res **65**(8):3044-8.
- Zhang, B., Y. Dong, J. Liu, Z. Lian, L. Liang, W. Chen, X. Luo, S. Pei, X. Mo, L. Zhang, W. Huang, F. Ouyang, B. Guo, C. Liang und S. Zhang (2017). "Immunotherapy for patients with advanced pancreatic carcinoma: a promising treatment." Oncotarget **8**(4):5703-5716.
- Zhang, P., D. M. Su, M. Liang und J. Fu (2008). "Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis." Mol Immunol **45**(5):1470-6.
- Zhu, Y., S. Karakhanova, X. Huang, S. P. Deng, J. Werner und A. V. Bazhin (2014). "Influence of interferon-alpha on the expression of the cancer stem cell markers in pancreatic carcinoma cells." Exp Cell Res **324**(2):146-56.
- Zhu, Y., I. Tibensky, J. Schmidt, E. Ryschich und A. Marten (2008). "Interferon-alpha enhances antitumor effect of chemotherapy in an orthotopic mouse model for pancreatic adenocarcinoma." J Immunother **31**(7):599-606.
- Zou, W., J. D. Wolchok und L. Chen (2016). "PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations." Sci Transl Med **8**(328):328rv4.

V. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Aschenbach für die Betreuung meiner externen Dissertation im Fachbereich der Veterinärmedizin sowie für die immer zeitnahe, freundliche und hilfreiche Kommunikation, trotz räumlicher Distanz.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin für die Bereitstellung dieses Themas, die gute Zusammenarbeit und die intensive Betreuung in allen Bereichen der Dissertation. Ebenfalls kompetent und herzlich wurde ich von Frau PD Dr. Svetlana Karakhanova unterstützt und auf meinem Weg zwischen Versuchsdurchführungen und Auswertungen begleitet.

Ein weiterer Dank gilt meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe, Moritz Heinrich, Ramona Brecht, Katharina von Ahn, Jasmin Fritz, Andreas Mathes und Caroline Maier. Für die kompetente und aufheiternde Unterstützung im Laboralltag bedanke ich mich außerdem bei Markus Herbst, Tina Maxelon und Inna Schwarting.

Aber all das wäre ohne meine großartigen Eltern, meinen Geschwistern, meinem Freund Mirko, meinen Freunden, Arbeitskollegen und Arbeitgebern nicht möglich gewesen. Ich danke euch allen für eure Geduld, eure Unterstützung und euer Antreiben an so manchen aufreibenden oder ermüdenden Stellen des Promotionsverlaufs.

VI. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, Henriette Bunge, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Die Rolle des Moleküls B7-H1 in der Immuntherapie des Pankreasadenokarzinoms im murinen Panc02-Modell“ selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Weinheim, den 30.04.2020

Henriette Bunge

ISBN: 978-3-86345-535-4



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de