

Einsatz koordinierter T und NK Zellstimulation bei der Tumorsektion zur kurativen Behandlung des metastasierenden Pankreaskarzinoms im murinen Modell

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Jennifer Brooks, M. Sc.

2018

Referent: PD Dr. Florian Kühnel

Korreferentin: Prof. Dr. Christine Falk

Korreferent: PD Dr. Dr. Albrecht Neesse

Tag der Promotion: 13.12.2017

Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.

Winston Churchill

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1. Abstract.....	2
Schlagworte/ keywords.....	3
2. Einleitung.....	4
2.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	4
2.1.1. Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Entwicklung des Adenokarzinoms im Pankreas.....	5
2.2. Genetisch veränderte PDAC Mausmodelle.....	7
2.3. Genetische Modifikationen mittels <i>Sleeping Beauty</i> Transposase.....	9
2.4. Die Therapie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.....	9
2.5. Der Immunoeditierungsprozess bei der Tumorentstehung.....	12
2.6. Zusammensetzung des Tumormikromilieus des Pankreaskarzinoms und dessen Bedeutung für die Immunsuppression.....	13
2.7. Bedeutung der T Zellantwort für die Tumorkontrolle.....	15
2.8. Rolle der NK Zellen in der Tumorkontrolle.....	16
2.9. Zielsetzung der Arbeit.....	18
3. Ergebnisse.....	19
3.1. Induktion eines resezierbaren Tumors im Pankreas mittels <i>in situ</i> Elektroporation.....	19
3.1.1. Tumorgenese bei Expression von mutiertem Kras bei p53 <i>knockout</i>	20
3.2. Einfluss der Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 auf die Tumorentstehung und Metastasierung.....	23
3.2.1. Untersuchungen zur Tumorzinzidenz bei Verwendung von shRNAs zusätzlich zur Expression von Kras ^{G12V}	24
3.2.2. Inhibition von p53 zusätzlich zu SMAD4, BRCA1 oder p16/p19 ist notwendig für eine zuverlässige Tumorentstehung.....	25
3.2.3. Additiver Tumorsuppressorgen- <i>knockdown</i> verstärkt die Tumorprogression, hat aber keinen Einfluss auf die Metastasierung.....	27
3.2.4. Erhöhte Rezidivierungsrate nach Tumorresektion bei einem Funktionsverlust von BRCA1 und p16/p19.....	27
3.3. Untersuchungen zum Einfluss von p53-Mutationen auf die Metastasierung.....	29
3.3.1. Einfluss der p53-Mutationen auf die Tumorprogression.....	30
3.3.2. Palliative Gemcitabinetherapie bei mutiertem p53.....	31
3.3.3. Untersuchungen zur Rezidivierung und Metastasierung nach Resektion bei vorliegender p53-Mutation im Tumor.....	32
3.3.4. Therapeutische Effekte der adjuvanten Gemcitabinetherapie in Abhängigkeit des p53 Status... ..	34
3.4. Expression von konstitutiv-aktivem Akt2 führt zu starker Metastasierung.....	37
3.4.1. Adjuvante Gemcitabinetherapie im resezierbaren PDAC-Modell.....	39
3.5. Neoadjuvante und adjuvante Immuntherapie beim etablierten metastasierenden Pankreasmodell	43
3.5.1. Adjuvante Immuncheckpointblockade hat keinen zusätzlichen positiven Effekt im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie.....	43
3.5.2. Neoadjuvante Kombination von α PD1 und Gemcitabine reduziert die Lokalrezidivierung und verlängert das Überleben.....	44
3.5.3. Neoadjuvante α PD1/G Therapie erhöht CD8 ⁺ CD103 ⁺ T Zellpopulation im Tumor.....	46
3.5.4. Charakterisierung der tumorinfiltrierenden CD8 T Zellen.....	53

3.5.5. Die neoadjuvante Therapie mit α PD1/G induziert eine lokale tumorantigen-spezifische CD8 T Zellantwort und triggert die PD-L1 Expression auf Tumorzellen.....	55
3.5.6. Der therapeutische Effekt der neoadjuvanten α PD1/G Therapie wird durch NK und CD8 T Zellen vermittelt.....	58
3.5.7. In der adjuvanten Therapiephase sind die NK Zellen für die Verhinderung der Lokalrezidivierung besonders relevant.....	59
3.5.8. Analyse der Immunzellpopulationen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und anschließender Resektion.....	60
3.5.9. Analyse der Expression von Immunzellliganden auf Tumorzellen.....	65
3.5.10. Adjuvante Blockade der NK Zellinhibition reduziert die Metastasierung.....	67
3.5.11. Sequenzieller Einsatz der neoadjuvanten CD8 T Zellstimulation mit adjuvanter Blockade der NK Zellinhibition führt zu progressionsfreiem Langzeitüberleben.....	68
4. Diskussion.....	72
4.1. Etablierung eines metastasierenden und resezierbaren PDAC Mausmodells.....	73
4.1.1 Überexpression von mutiertem Kras und p53-Deletion führt zu einem PDAC ohne frühe Metastasierung.....	73
4.1.2. Einfluss der Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 auf die Metastasierung und Progression des PDAC im Mausmodell.....	74
4.1.3. Einfluss der Mutation von p53 auf die Karzinogenese und Metastasierung.....	76
4.1.4. Konstitutiv-aktives Akt2 induziert eine frühe Metastasierung im Elektroporationsmodell.....	78
4.2. Evaluation einer neoadjuvanten und adjuvanten Immuntherapie mit Immuncheckpointinhibitoren..	80
4.2.1. Therapeutische Wirksamkeit der Immuncheckpointinhibition mit α CTLA4 und α PD1.....	80
4.2.2. Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf Immunzellpopulationen im Tumormikromilieu.....	82
4.2.3. Funktionelle Relevanz der T und NK Zellen in der neoadjuvanten α PD1/Gemcitabine Therapie.....	84
4.2.4. Analyse der Immunzellpopulationen nach der Resektion.....	85
4.2.5. Identifikation eines immuntherapeutischen Targets zur NK Zellstimulation.....	87
4.2.6. Immuncheckpointblockade mit CD96 und sequenzielle Kombination mit neoadjuvanter α PD1/G Therapie.....	88
4.3. Ausblick.....	90
5. Material und Methoden.....	91
5.1. Materialien.....	91
5.1.1. Chemikalien und Enzyme.....	91
5.1.2. FACS Antikörper.....	93
5.1.3. IHC Antikörper.....	93
5.1.4. Medien und Pufferlösungen.....	94
5.1.5. Bakterienstämme.....	95
5.1.6. Plasmide.....	96
5.1.7. Oligonukleotide.....	99
5.1.8. Kits.....	99
5.1.9. Geräte und sonstige Materialien.....	100
5.2. Zellkultur.....	101
5.2.1. Kultivierung von primären Tumorzellen.....	101
5.2.2. Zellpassagierung.....	101
5.2.3. Transfektion.....	102
5.2.4. Kristallviolett Assay.....	102

5.2.5. Bestimmung der NK Zell Zytotoxizität <i>in vitro</i>	103
5.3. Mausmodell	104
5.3.1. Mausstämme	104
5.3.2. <i>in situ</i> Elektroporation	104
5.3.3. Resektion des Pankreastumors	107
5.3.4. Therapie	107
5.3.5. Depletion	107
5.3.6. Blutentnahme aus der Vena facialis	108
5.3.7. Abbruchkriterien	108
5.3.8. Histologische Untersuchungen	108
5.4. Durchflusszytometrische Analysen	109
5.4.1. Isolation von Zellen aus Gewebe und Blut	109
5.4.2. Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern	110
5.4.3. Gating Strategie	111
5.4.4. <i>in vitro</i> Stimulation mit Peptid	111
5.4.5. Propidiumiodid Zellzyklusfacs	111
5.5. Molekularbiologische Methoden	112
5.5.1. Rekombinante DNA Techniken	112
5.5.2. chemische Transformation	114
5.5.3. analytische Plasmidpräparation	114
5.5.4. präparative Plasmidpräparation	115
5.5.5. DNA Konzentrationsbestimmung	115
5.5.6. Sequenzierung	115
5.6. Software für Datenverarbeitung	115
5.7. Statistische Auswertung	115
6. Literaturverzeichnis	117
7. Anhang	134
7.1. Abkürzungsverzeichnis	134
7.2. Abbildungsverzeichnis	137
7.3. Tabellenverzeichnis	139
8. Danksagung	140
9. Publikationen und Konferenzbeiträge	141
10. Lebenslauf	142

1. Zusammenfassung

Die hohe Mortalität des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC) ist bedingt durch ein schnelles, aggressives Wachstum und durch eine frühe Metastasierung. Selbst bei Patienten, die mit einer Tumoresektion und adjuvanter Therapie behandelt werden, ist die Prognose aufgrund der häufigen Rezidivierung extrem schlecht. Um neue therapeutische Strategien untersuchen zu können und die lange klinische Studiendauer zu vermeiden, sind präklinische Modelle notwendig, die diese Erkrankung möglichst genau widerspiegeln. Etablierte transgene murine PDAC Modelle sind aufgrund eines multifokalen Tumorwachstums nicht für eine Tumoresektion und somit nicht für die Analyse von neoadjuvanten und adjuvanten Therapiemodalitäten geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausmodell des Pankreaskarzinoms unter Berücksichtigung der häufigsten beim humanen PDAC auftretenden genetischen Alterationen etabliert. Über eine Cre-vermittelte p53 Deletion in p53 fl/fl Mäusen und durch orthotopen Transfer von onkogenem Kras^{G12V} und konstitutiv-aktivem Akt2 wurde mittels *in situ* Elektroporation von Transposon-basierten Plasmiden ein lokal begrenztes und früh-metastasierendes Pankreaskarzinom induziert. Das lokal begrenzte Wachstum des Primärtumors ermöglichte die Resektion des Tumors und die Verwendung des Modells für die Evaluation einer neoadjuvanten und adjuvanten Therapie wie die Immuncheckpointinhibition im Rahmen einer Gemcitabinetherapie. Im Gegensatz zur adjuvanten Checkpointblockade mit Antikörpern gegen PD1, führte die neoadjuvante PD1 Inhibition im Kontext einer Gemcitabinetherapie zu einem deutlichen Überlebensvorteil. Die PD1 Blockade erhöhte hierbei die Frequenz der gewebsspezifischen antigenerfahrenen CD103⁺ CD8 T Zellen und gleichzeitig reduzierte Gemcitabine die immunsuppressiven MDSCs. Somit induzierte die neoadjuvante α PD1/G Therapie eine lokale antitumorale Immunantwort, die sich auch in einer erhöhten Tumorantigen-spezifischen T Zellantwort widerspiegelt. Allerdings führte dieser neoadjuvante Therapieansatz hauptsächlich zu einer Reduktion der Lokalrezidive, während die Fernmetastasierung trotz nachweislich erhöhter CD8 T und NK Zellfrequenzen im Blut unverändert blieb. Um diesen lokalen Immuneffekt durch eine Eliminierung der Fernmetastasen zu komplementieren, wurden NK Zellen über eine systemische Blockade von CD96 stimuliert. Der inhibitorische NK Zellrezeptor CD96 bindet an CD155, das beim humanen PDAC und beim murinen Elektroporationsmodell auf den Tumorzellen exprimiert wird. Der alleinige adjuvante Einsatz des blockierenden CD96 Antikörpers hatte trotz eines reduktiven Effekts auf Metastasen nur einen geringen Effekt auf das Gesamtüberleben. Die sequenzielle Immuntherapie mit einer neoadjuvanten PD1 Inhibition und einer adjuvanten CD96 Blockade führte im Kontext einer Gemcitabinetherapie zu einer effektiven Unterdrückung der Lokalrezidive und Metastasen, wodurch ein deutlich verbessertes Überleben einschließlich eines tumorfreien Gesamtüberlebens ermöglicht wurde. Die Arbeit zeigt erstmalig die Bedeutung einer koordinierten Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort für die Resektionstherapie. Hierbei könnte der Einsatz einer optimal abgestimmten T und NK Zellstimulation die Therapie des PDAC im Patienten deutlich verbessern und empfiehlt sich für eine weitere Evaluation in klinischen Studien.

1. Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a rapidly growing tumor with a strong tendency of early dissemination associated with high mortality. Despite tumor resection and subsequent adjuvant chemotherapy, the prognosis for patients is still dismal due to high recurrence rates. For evaluation of novel therapeutic strategies, preclinical models that precisely reflect this disease are needed to avoid the long duration of adjuvant clinical studies. However, current established transgenic murine PDAC models are not feasible for tumor resection because of synchronous multifocal tumor development and are therefore not suitable for investigations of neoadjuvant and adjuvant therapeutic modalities.

In this study, a mouse model of PDAC was established reflecting the most frequent genetic alterations of the human disease. Tumor growth was induced in p53 fl/fl mice with a Cre-dependent p53 deletion and by orthotopic delivery of oncogenic Kras^{G12V} and constitutively active Akt2. *In situ* electroporation of transposon-based plasmids encoding these oncogenes resulted in a locally restricted and early disseminating pancreatic adenocarcinoma. This locally growing tumor is accessible for resection and facilitates the use of this model for evaluation of neoadjuvant and adjuvant therapies such as immune checkpoint inhibition. In this model, adjuvant checkpoint inhibition with antibodies directed against PD1 in addition to conventional gemcitabine therapy did not result in a survival benefit compared to gemcitabine monotherapy. However, neoadjuvant blockade of PD1 in combination with gemcitabine significantly improved survival compared to α PD1 and gemcitabine alone. Corresponding to this benefit, neoadjuvant PD1 blockade led to an increased number of tissue-resident and antigen-experienced CD103⁺CD8⁺ T cells whereby gemcitabine reduced immunosuppressive MDSC populations. Consequently, neoadjuvant α PD1/G therapy led to a local antitumor immune response confirmed by an elevated tumor antigen-specific T cell response. This neoadjuvant therapy primarily reduced local tumor recurrence but did not affect distant metastases although elevated amounts of CD8 T and NK cells were observed in the blood after treatment. To complement this local effect with a systemic therapy aiming to eliminate distant metastases, a blockade of CD96 for stimulation of NK cells was administered. The inhibitory NK cell receptor CD96, binds to CD155 which is expressed on tumor cells of human PDAC and was abundantly expressed on tumor cells of this electroporation model. Despite a reductive effect on metastases, the adjuvant CD96 blockade had only modest effects on survival. However, the sequential therapy of neoadjuvant PD1 inhibition and adjuvant CD96 blockade in context of gemcitabine therapy led to a simultaneous control of recurrent tumors and metastases. This gave rise to significantly improved survival with tumor-free long-term survival suggesting a complete cure of treated individuals. This study shows for the first time the importance of a coordinated activation of the innate and adaptive immune response for the resection of human PDAC. The use of an optimally adapted stimulation of T and NK cells could significantly improve the outcome of patients with resected PDAC and is highly recommended for further evaluation in clinical studies.

Schlagworte

- duktales Pankreasadenokarzinom
- Tumorimmuntherapie
- NK Zellstimulation

Keywords

- pancreatic ductal adenocarcinoma
- tumor immunotherapy
- NK cell stimulation

2. Einleitung

2.1. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste tödliche Krebserkrankung und zeichnet sich durch ein aggressives Wachstum und eine frühe Metastasierung aus. Durch den demographischen Wandel und den ungesunden Lebensstil kommt es hierbei zu einer jährlich steigenden Tumorzinzidenz (Rahib et al., 2014). Mit einer Überlebenszeit von 5-8 Monaten und einer 5 Jahres Überlebensrate von 5% ist die Prognose für Patienten extrem schlecht (Siegel et al., 2017). Die aufgrund mangelnder klinischer Frühsymptome meist späte Diagnose und die begrenzten Behandlungsmöglichkeiten für fortgeschrittene Tumorstadien bedingen diese hohe Mortalität. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (*pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC)) ist mit 75-92% aller Neoplasien der häufigste im Pankreas auftretende Tumor. Hierbei entsteht das PDAC für gewöhnlich im Pankreaskopf mit einem infiltrativen Wachstum in das umliegende Gewebe wie Lymphgefäße, Milz und Peritoneum. Zusätzlich treten metastatische Absiedelungen in Leber und Lunge auf (Warshaw and Castillo, 1992). PDAC entwickelt sich aus verschiedenen ausgeprägten Vorläuferläsionen, die häufigsten sind die mikroskopisch erkennbaren pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), weniger häufig treten die makroskopisch sichtbaren Zysten in Form von intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) und muzinösen zystischen Neoplasien (MCN) auf (Hruban et al., 2007). Die PanIN Läsionen sind in geringgradige PanIN1 und PanIN2 und hochgradige PanIN3 unterteilt, wobei die PanIN3 das größte Potential zur PDAC Progression besitzt (Basturk et al., 2015). Aufgrund von Mausstudien geht man davon aus, dass das Pankreaskarzinom in den Centroazinar-Azinus-Kompartimenten (CAAC) durch den Vorgang einer Azinar-Duktalen-Metaplasie (ADM) oder durch Expansion der centroazinaren Zellen und zusätzlicher Apoptose der Azinuszellen entsteht (Guerra et al., 2007; Habbe et al., 2008; Stanger et al., 2005). Das Pankreaskarzinom hat einen stark desmoplastischen Charakter, wobei die Stromalen Anteile den Tumorzellanteilen überwiegen und bis zu 90% des gesamten Tumolvolumens ausmachen können (Neesse et al., 2011). Das PDAC Stroma setzt sich aus Myofibroblasten, suppressiven Immunzellen und azellulären Komponenten wie Kollagen und Zytokinen zusammen (Neesse et al., 2015). Der Einfluss des Tumorstromas auf die Tumorigenese, Progression und Metastasierung sowie die Beeinflussung der Resistenzentwicklung und der Immunzellinfiltration ist nicht vollständig geklärt. Einerseits beeinflusst die starke desmoplastische Reaktion die Chemoresistenz und ist in den Schutz des Tumors vor dem Immunsystem involviert (Schober et al., 2014). Andererseits konnte über die Stroma-Deletion in Mausversuchen, die zu einer deutlich verstärkten PDAC Progression und einer gesteigerten Disseminierung führte, gezeigt werden (Rhim et al., 2014), dass das Stroma auch für den Patienten einen protektiven Effekt hat. Ein ebenfalls wichtiger Faktor, der sowohl die Tumorigenese, die Progression und auch die Metastasierung verstärkt, ist die Entzündungsreaktion (Zambirinis et al., 2014). Die Bedeutung einer chronischen Entzündung im Pankreas für die Entstehung von PDAC konnte im Mausmodell bestätigt werden

(Guerra et al., 2007). Außerdem besteht eine Korrelation zwischen chronischer Pankreatitis und einer erhöhten PDAC Inzidenz, da ungefähr 5% der Pankreatitispatienten über einen Zeitraum von 20 Jahren PDAC entwickeln (Raimondi et al., 2010). Neben der chronischen Pankreatitis ist das Pankreaskarzinom nur mit einer geringen Anzahl an Risikofaktoren assoziiert, hierzu zählen Rauchen, Alkoholismus und ein übermäßiger Verzehr von fettreicher Nahrung (Blackford et al., 2009; Genkinger et al., 2009; Philip et al., 2013).

2.1.1. Rolle von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei der Entwicklung des Adenokarzinoms im Pankreas

Bei der Entstehung und Progression von PDACs sind Keimbahnmutationen in verschiedenen Tumorsuszeptibilitätsgenen involviert. Die am häufigsten auftretenden Mutationen beeinflussen das Kras-Gen oder treten bei den Tumorsuppressorgenen BRCA1/BRCA2 (*breast cancer related antigen*) (Lucas et al., 2014), p53 (Redston et al., 1994), p16^{INK4a}/p14^{Arf} (Maus p19^{Arf}) (Bardeesy et al., 2006; Wilentz et al., 1998) oder bei SMAD4 (Hahn et al., 1996) auf. Allerdings ist der genaue genetische Zusammenhang, der zu einem PDAC führt, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Kras gehört zur Ras-Familie von GTP-bindenden Proteinen und ist in einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. Mutationen von Kras treten bei Pankreaskarzinomen mit einer außerordentlich hohen Frequenz auf von über 90% auf (Almoguera et al., 1988; Jones et al., 2008). Kras Mutationen gelten als wichtiger Initiator im PDAC Entstehungsprozess, da diese Mutationen bereits in den frühen PanIN Läsionen zu finden sind (Kanda et al., 2012). Hierbei treten vor allem Punktmutationen am Codon 12 auf und bewirken einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat (G12D) oder zu Valin (G12V) (Eser et al., 2014). Durch diese Mutationen liegt Kras in konstitutiv aktiver Form vor und leitet so auch bei Abwesenheit externer Stimuli Signale weiter. Hauptsächlich werden der RAF-MEK-MAPK, der PI3K-PTEN-Akt und der RAL-GDS Signalweg durch Kras beeinflusst. Der RAF-MEK-MAPK Signalweg beeinflusst das Zellwachstum und die Differenzierung, ist aber auch bei anderen Prozessen wie der Entzündungsreaktion und Apoptose involviert (McCubrey et al., 2007). Außerdem ist dieser Signalweg grundlegend an dem, vom onkogenen Kras induzierten, mitogenen Effekt beteiligt (Blasco et al., 2011). Das Ras-vermittelte Zellüberleben und die Proliferation werden hauptsächlich durch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) des PI3K-PTEN-Akt Signalwegs gesteuert (Castellano and Downward, 2011). Die Bedeutung dieses Signalwegs für die Tumorprogression wird durch die häufig auftretenden aktivierenden Mutationen bei den verschiedenen Mediatoren dieses Signalwegs verdeutlicht. Neben Mutationen, die die katalytische PI3K Untereinheit p110 oder die regulatorische Untereinheit p85 betreffen, tritt eine Amplifikation des Effektors Akt2 auf (Aguirre et al., 2004; Schönleben et al., 2006). Die Familie der Akt Kinasen (PKB) besteht aus den drei Isoformen Akt1 (PKBa) Akt2 (PKBb) und Akt3 (PKBy), die eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Die Akt Kinasen beeinflussen das Zellüberleben durch die Inhibition von proapoptotischen Faktoren und eine

gesteigerte Transkription von antiapoptotischen Genen. Außerdem greifen sie antagonistisch in die p53-vermittelte Apoptose ein und beeinflussen so das Zellwachstum, den Zellzykluseintritt und das Zellüberleben (Ogawara et al., 2002). Bei Tumoren liegt sehr häufig eine erhöhte Aktivität der Akt Kinasen vor (Bellacosa et al., 2005). Hierbei konnten für die Isoformen Akt1 und Akt2 unterschiedliche Rollen nachgewiesen werden. Während für Akt1 auch migrations- und invasionsinhibierende Effekte in einigen Tumoren gezeigt werden konnten (Hutchinson et al., 2004), hat das häufig bei Karzinomen alterierte Akt 2 einen positiven Einfluss auf die Invasivität und Metastasierung (Arboleda et al., 2003). Auch bei PDAC ist die Akt2 Expression häufig erhöht, was die Bedeutung dieses Signalwegs für diesen Tumor aufzeigt (Ruggeri et al. 1998). Darüber hinaus induziert onkogenes Kras eine Dysregulation der Stoffwechselfunktionen in den Tumorzellen. Hierbei wird die Glukoseaufnahme in die Zelle erhöht und gleichzeitig die Glykolyse durch Hochregulation von Schlüsselenzymen dieses Stoffwechselweges gesteigert (Ying et al., 2012; Yun et al., 2009). Die Eigenschaft der Tumorzellen, den Metabolismus zu erhöhen und die Glukose anaerob zu Lactat umzusetzen, wird auch als Warburg Effekt bezeichnet und ist sowohl für PDAC als auch für viele andere Tumorentitäten beschrieben (Vander Heiden et al., 2009).

Bei der PDAC Progression treten häufig Mutationen bei Faktoren auf, die in der DNA Reparatur involviert sind (Waddell et al., 2015). Sowohl BRCA1 als auch BRCA2 sind bei der Erkennung oder der Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt und sind so verantwortlich für die Aufrechterhaltung der chromosomalen Integrität (Roy et al., 2012). Träger von Mutationen in BRCA1 oder BRCA2 haben ein erhöhtes PDAC Risiko (Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Thompson et al., 2002).

Der transkriptionelle Regulator SMAD4 (DPC4) hat eine zentrale Rolle in der TGF β Signalkaskade (Massagué et al., 2000). Deletionen und Punktmutationen von SMAD4, die zu einem Funktionsverlust führen, treten in 50 % der PDAC Fälle auf (Hahn et al., 1996). Für gewöhnlich werden in Folge einer Ligandenbindung an TGF β -Rezeptoren die *downstream*-gelegenen SMAD Proteine (SMAD2 und SMAD3) phosphoryliert. Nach Heterodimerisierung dieser SMAD Proteine mit SMAD4 transloziert der Komplex in den Zellkern und aktiviert die Transkription von Genen, die Proliferation, Apoptose, Zellmigration und Differenzierung regulieren (Zhang et al., 2004). Die Inaktivierung von SMAD4 führt über die Dysregulation der Signalkaskade zu einer Tumorprogression, hierbei werden die tumorfördernden TGF β Funktionen aufrechterhalten und die tumorsuppressiven Eigenschaften unterdrückt (Levy and Hill, 2005).

Die Tumorsuppressorgene INK4A und Arf sind mit überlappenden Leserahmen im 9p21 Locus codiert und exprimieren die Proteine p16 und p14 (bei Maus p19) (Poi et al., 2001). Homozygote p16/p14 Deletionen sind in einem Teil der PanIN Läsionen und bei 40% der PDACs zu finden (Hustinx et al., 2005; Rozenblum et al., 1997). p16^{INK4A} ist ein Inhibitor von G1 Cyklin-abhängigen Kinasen und kann den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus blockieren. p14^{Arf} steht in einer reziproken Beziehung zu p53. Ein Verlust von p14^{Arf} verhindert die Akkumulation von p53, da p14^{Arf}

die proteasomale Degradation von p53 inhibiert (Zhang et al., 1998). Somit kommt es bei einer p14^{Arf} Deletion zu einer verringerten Funktionalität des p53 Signalwegs. Außerdem treten bei etwa 38% der PDAC Fälle p14^{Arf} Deletionen zusammen mit p53-Mutationen auf (Hustinx et al., 2005; Maitra et al., 2003).

p53 ist ein wichtiger Regulator für diverse tumorsuppressive Prozesse und liegt in 50-75% der PDAC Fälle in inaktiver Form vor (Scarpa et al., 1993). Hierbei treten meist *missense* Mutationen innerhalb der DNA Bindedomäne auf. Diese verhindern die Bindung an den Promotor der p53-regulierten Gene und führen zu einer Akkumulation des mutierten p53 Proteins (Oren and Rotter, 2010). p53 hat eine Schlüsselfunktion bei der Wachstumskontrolle der Zellen und reagiert auf DNA Schäden und zellulären Stress durch Hypoxie oder Onkogenaktivierung. Für gewöhnlich liegt p53 im inaktiven Zustand vor und wird durch zellulären Stress aktiviert und stabilisiert. Abhängig vom Grad der zellulären Schädigung wird durch p53 zunächst ein Zellzyklusarrest induziert und DNA Reparaturprozesse initiiert (Pellegata et al., 1996). Ist die Zelle weiterhin dem zellulären Stress ausgesetzt oder liegt eine irreparable Schädigung vor wird die Zellapoptose induziert. Ein Verlust der p53 Funktionen begünstigt daher das Wachstum und das Überleben von Zellen mit protumorigenen Aberrationen (Zilfou and Lowe, 2009). Mutationen von p53 treten vor allem in fortgeschrittenen PanIN Läsionen auf und prägen die Entwicklung des PDAC (Murphy et al., 2013). Erst der Funktionsverlust von p53 ermöglicht die für PDAC charakteristische Aneuploidie, chromosomale Aberrationen sowie genomische Heterogenität.

2.2. Genetisch veränderte PDAC Mausmodelle

Die dringende Notwendigkeit neuer therapeutischer Strategien ergibt sich sowohl durch die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegen Chemo- und Strahlentherapie, aber auch durch die hohe Rezidiv- und Metastasierungsrate nach der Tumorresektion. Zur Untersuchung von neuen Therapien und für ein besseres Verständnis der ausschlaggebenden Faktoren, die an der Tumorprogression beteiligt sind, wurden verschiedene genetisch veränderte Mausmodelle (*genetically engineered mouse models* bzw. GEMMs) entwickelt. Diese ermöglichen die Identifikation von synergistisch-wirkenden genetischen Alterationen, die kritisch für die Entwicklung eines PDAC sind, und die Untersuchung von Genotyp-Phänotyp Beziehungen. Durch die Verwendung von transgenen Mäusen und *gene targeting* Methoden konnten bis heute eine Vielzahl präklinischer Modelle entwickelt werden. Als Grundlage für viele GEMMs diente der Einsatz von aktiviertem Kras, da aktivierende Kras Mutationen bereits in den prämaligen Läsionen auftreten und so einen initialen Schritt bei der Entwicklung eines PDAC darstellen. Dabei wurden vor allem gewebsspezifische, konstitutiv aktive Kras-Transgene oder Kras *knock-in* Allele für die Entwicklung der GEMMs eingesetzt. Für diese genetischen Modifikationen wird häufig das Cre/loxP System verwendet. Hierbei induziert die Cre Rekombinase (*causes recombination*) eine Rekombination spezifischer DNA Sequenzen und kann so zur Deletion, Insertion und Inversion von spezifischen Genen genutzt werden (Branda and Dymecki, 2004). Als Zielsequenz

der Rekombination dient die loxP *site* (*locus of crossover (x)* in P1), wobei die Orientierung dieser loxP *sites* darüber entscheidet, ob das flankierte Gen, das auch als gefloxtes Gen bezeichnet wird, deletiert oder insertiert wird (Thomson et al., 2003). Bei den für die transgenen Mäuse verwendeten *Kras knock-in* Allelen kann durch die gezielte Einbringung einer Cre Rekombinase mit einem zellspezifischen Promotor eine gewebsspezifische Aktivierung des *Kras* induziert werden. Zudem kann die Cre Rekombinase auch über eine Transduktion in ein bestimmtes Gewebe eingebracht und so die Genmodifikation induziert werden.

Ein grundlegendes Modell für die Entwicklung eines PDAC ist die KC Maus (*Kras-Cre*). Hierfür wird der LSL-*Kras*^{G12D} Mausstamm (LoxP/Stopp/LoxP-*Kras*^{G12D}) mit dem Pdx1-Cre Mausstamm gekreuzt (Hingorani et al., 2003). Die LSL-*Kras*^{G12D} Maus zeichnet sich durch ein endogenes, konditionelles *Kras*^{G12D}, das hinter einem loxP-flankierten Stoppcodon liegt, aus. Nach Entfernung der Stoppkassette mittels Cre Rekombinase wird das konstitutiv aktive *Kras* exprimiert. Hierzu wird die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des gewebsspezifischen Promotors Pdx1 mithilfe des Pdx1-Cre Mausstamms eingebracht. Der Pdx1 Promotor wird hauptsächlich in den Vorläuferzellen pankreatischer Zelltypen aktiviert, dadurch kommt es nach der Cre-induzierten *Kras* Aktivierung zu einer schnellen Entwicklung von PanIN in den ersten Lebenswochen und in einigen älteren Mäusen zu einer altersabhängigen PDAC Progression (Hingorani et al., 2003). Der Pdx1-Cre Mausstamm wurde in weiteren Mausmodellen auch für die Induktion von INK4A/Arf bzw. p53 Aberrationen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die alleinige Deletion von INK4A/Arf oder p53 im Pankreas nicht ausreicht, um die Bildung von PanINs zu induzieren. Eine gezielte Kombination mit einer *Kras* Aktivierung führte sowohl bei INK4A/Arf Verlust als auch bei p53-Deletion zu einem Modell mit schnell und progressiv wachsenden PDAC (Aguirre et al., 2003; Bardeesy et al., 2006). Bei einem weiter entwickelten und häufig verwendeten Modell wird neben dem konditionellen *Kras*^{G12D} und der Pdx1-Cre ein mutiertes p53 (Trp53R172H) exprimiert, dieses ist bekannt als KPC Mausmodell (*Kras-p53-Cre*). Die Mäuse entwickeln ein Spektrum an prämaligen Läsionen mit einer Progression zu PDAC (Hingorani et al., 2005). Die Mausmodelle unterstützen die Theorie, dass die Entwicklung des Karzinoms über die Progression der PanIN Läsionen hin zu einem PDAC verläuft. Außerdem wird durch die GEMM die Bedeutung der *Kras* Aktivierung für die PDAC Entwicklung verdeutlicht und gibt Hinweise darauf, dass für eine Progression der Läsionen zum PDAC weitere genetische Events notwendig sind. Ein Nachteil dieser GEMMs ist, dass die genetischen Aberrationen, die zur PDAC Progression führen, im gesamten Pankreasgewebe vorliegen und es so zu einer multifokalen Tumorentwicklung kommt. Hierbei entspricht die multifokale Progression nicht der lokalen Pankreaskarzinomentwicklung im Menschen und zudem ist in diesen Modellen eine Tumorresektion, die eine Standardtherapie des humanen PDAC darstellt, nicht möglich.

2.3. Genetische Modifikationen mittels *Sleeping Beauty* Transposase

Das *Sleeping Beauty* Transposon System wird für die stabile genomische Integration von Gensequenzen verwendet. Transposons sind von kurzen Wiederholungssequenzen, den *inverted terminal repeats* (ITR), flankiert und beschreiben DNA-Elemente, die über Transposition die Position im Genom verändern können. Die Transposition besteht aus einem *cut and paste* Prozess und wird durch eine DNA Transposase, die an spezifische Sequenzen innerhalb der ITRs bindet, katalysiert (Yant et al., 2004). Über dieses System können sowohl spezifische Onkogene als auch *shorthairpin*-RNAs zum *knockdown* von Tumorsuppressorgenen in das Zellgenom eingebracht werden (Carlson et al., 2005; Heggstad et al., 2004). Die *Sleeping Beauty* (SB) Transposase katalysiert die Integration des ausgeschnittenen Transposon Elements in ein TA-Dinukleotid an einem neuen Lokus. Hierbei kann die SB Transposase getrennt von dem einzubringenden, ITR-flankierten Gen in einem zwei Komponenten-Vektorsystem genutzt werden (Cui et al., 2002). Aufgrund der breit gefächerten Aktivität der Transposase, die in humanen, murinen und auch anderen Zellen eine Aktivität ausweist, ist diese ein nützliches Werkzeug für einen effektiven und stabilen Gentransfer in Zellkultur und primären Zellen (Ivics et al., 2004). Außerdem ermöglicht das SB Transposon System eine stabile Onkogenexpression *in vivo* und kann somit hervorragend für eine definierte Tumorgenese in der Maus verwendet werden (Carlson et al., 2005). Hierbei ist besonders vorteilhaft, dass die SB Transposase selbst nicht integriert und so im Laufe der Onkogen-getriebenen Zellteilung sukzessiv verloren geht. Dies resultiert in einer Stabilisation des integrierten Transposons. Für eine effiziente Transposition wurde sowohl die Aktivität der Transposase (Mátés et al., 2009) als auch die Effektivität der Transposition über Modifikation der ITR gesteigert (Cui et al., 2002).

2.4. Die Therapie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Bei Patienten mit einem lokal begrenzten Pankreaskarzinom besteht die einzige potentiell kurative Therapie aus der operativen Entfernung des Tumors (Wagner et al., 2004). Hierbei limitieren das Tumorstadium, die Tumorgröße und das Ausmaß der Lymphknoteninfiltration den Erfolg der Resektion. Bei 20-25% der Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnose eine Tumoresektion mit anschließender Chemotherapie möglich (Neoptolemos et al., 2004). Hierbei liegt die fünf Jahres Überlebensrate nach kompletter Tumoresektion und anschließender postoperativer (adjuvanter) Therapie allerdings nur bei 20% (Oettle et al., 2007). Abhängig von der Lage des Tumors wird der Pankreasschwanz, der Pankreaskopf oder bei fortgeschrittenen Karzinomen eine komplette Pankreatoduodenektomie durchgeführt (Kulu et al., 2009; Tempero et al., 2014). Aufgrund des hohen metastatischen Potentials des Tumors ist eine anschließende adjuvante Behandlung in Form von Chemo- oder Chemoradiotherapie indiziert. Diese erhöht das Langzeitüberleben um 10% und somit auch das mittlere Überleben (Neoptolemos et al., 2010; Ueno et al., 2009). Die chemotherapeutische postoperative Behandlung ist meist Gemcitabine basiert. Dieses Pyrimidin-Analogon führt durch einen

Einbau in die DNA zur Hemmung der DNA-Synthese (Burriss et al., 1997). Ein nach wie vor ungelöstes Problem stellt die metastatische Rezidivierung dar, die bei etwa 70% der Patienten trotz erfolgreicher Resektion des Primärtumors auftritt (Neoptolemos et al., 2004) und die Notwendigkeit neuer Therapien zur Kontrolle des metastatischen Wachstums aufzeigt.

Etwa 30% der Patienten werden zum Zeitpunkt der Diagnose mit einem lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom diagnostiziert. Diese Einstufung bezeichnet einen regionalen Tumor mit Involvierung von in der Nähe befindlichen vaskulären Strukturen ohne eine distale Metastasierung (Siegel et al. 2017). Hierbei wird abhängig von der Beziehung zwischen Tumor und vaskulärer Strukturen unterteilt zwischen nicht resezierbaren und eingeschränkt resezierbaren Tumoren (Lopez et al., 2014). Ein Großteil der Patienten (50-60%) wird mit bereits metastasiertem Pankreaskarzinom diagnostiziert (Siegel et al., 2017). Sowohl bei diesen als auch bei den Patienten mit lokal fortgeschrittenen, nicht resezierbaren Tumoren ist eine palliative Chemotherapie die Standardtherapie. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren, die nur bedingt resezierbar sind, besteht die Möglichkeit einer neoadjuvanten Behandlung. Hierbei wird eine Chemotherapie, zum Teil in Kombination mit Strahlentherapie, mit dem Ziel eingesetzt den Tumor zu schrumpfen bzw. einer R0 Resektion zugänglich zu machen (Patel et al., 2011; Small et al., 2008). Als zusätzlicher positiver Effekt konnte gezeigt werden, dass eine neoadjuvante Therapie zu einem tumorfreien Resektionsrand und zu einer verringerten Invasion der regionalen Lymphknoten führt (Mehta et al., 2001; Patel et al., 2011). Ein Problem bei der Therapie des Pankreaskarzinoms stellen die limitierten Behandlungsmöglichkeiten dar. Die angewandten Therapien, wie die konventionelle Chemotherapie oder die Tumorsektion, führen zwar zu einer Verlängerung des Überlebens wirken aber selten kurativ, wodurch die Relevanz neuer therapeutischer Strategien verdeutlicht wird.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse von Immuntherapien (Sharma and Allison, 2015) bei einer Vielzahl von soliden Tumoren wie dem metastatischen Melanom (Robert et al., 2015) oder dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Borghaei et al., 2015), könnten diese auch einen vielversprechenden Ansatz für das Pankreaskarzinom liefern. Eine zentrale Rolle des Immunsystems besteht darin, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Hierfür nutzt das Immunsystem verschiedene Rezeptoren und Liganden für eine gezielte Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Immunzellen. Tumorzellen machen sich diese Checkpoints zu Nutze, um dem Immunsystem zu entgehen. Ein immuntherapeutischer Ansatz ist daher, diese Immuncheckpoints für eine antitumor Therapie zu nutzen. Hierbei ist eine Aktivierung des Immunsystems durch den Einsatz spezifischer Antikörper möglich. Zurzeit werden vor allem Antikörper gegen CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) bzw. PD1 (*programmed cell death 1*) verwendet, die mit inhibitorischen Signalen bei der T Zellantwort interferieren (Parry et al., 2005). Diese Interaktion kann in einer Aktivierung bzw. Aufrechterhaltung antitumoraler Immunantworten und so zur Tumorregression und Langzeitüberleben führen (Topalian et al., 2015). Der inhibitorisch wirkende Rezeptor PD1 wird hauptsächlich auf T Zellen aber auch auf einer Vielzahl von anderen Zellen wie B Zellen, Monozyten

und NK Zellen exprimiert (Ishida et al., 1992). Die Bindung des Rezeptors an die Liganden PD-L1 bzw. PD-L2 führt zu einer Inhibition von Effektor T Zellen (Dong et al., 1999; Latchman et al., 2001) und zu verringerter IFN γ und IL-2 Sekretion (Freeman et al., 2000). Diese Interaktion limitiert auch die lytische Aktivität von NK Zellen (Terme et al., 2011). Zusätzlich hierzu kann PD1 bei Antigen-spezifischen T Zellen eine Anergie erzeugen (Barber et al., 2006). PD-L1 wird von einer Vielzahl von Zellen konstitutiv exprimiert und ist häufig auch auf Tumorzellen hochreguliert. Zudem wird die Expression durch inflammatorische Zytokine wie IFN γ auf verschiedenen Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC), NK Zellen, T Zellen und Epithelzellen induziert (Loke and Allison, 2003). Im Gegensatz dazu ist eine PD-L2 Expression primär auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen und DC zu finden (Latchman et al., 2001). Die Blockade von PD1 mittels Antikörpern hemmt die Rezeptor-Liganden Interaktion und führt sowohl zur Aktivierung von NK Zellen als auch zur Induktion einer zytotoxischen T Zellantwort, was zu einer antitumoralen Immunantwort führen kann. Die humanisierten monoklonalen IgG4 Antikörper gegen PD1 Nivolumab und Pembrolizumab, werden derzeit in klinischen Phase I und II Studien mit unterschiedlich fortgeschrittenen PDAC untersucht (Johansson et al., 2016). Mit der PD1 Blockade konnte in klinischen Studien bei fortgeschrittenem Melanom das herausragende Potential der Immuncheckpointblockade aufgezeigt werden. Hierbei konnten mit beiden α PD1 Antikörpern ähnliche Therapieerfolge erzielt werden. Die Therapie mit Pembrolizumab führte zu einer objektiven Ansprechrates von 40% und einer 1-Jahresüberlebensrate von 71% (Ribas et al., 2014), währenddessen lag die Ansprechrates bei Nivolumab bei 38% und die 1-Jahresüberlebensrate bei 63% (Hodi et al., 2014).

CTLA4 ist ebenso wie PD1 ein inhibitorischer Rezeptor und wird auf aktivierten CD4 und CD8 T Zellen, sowie regulatorischen T Zellen (Tregs) exprimiert bzw. hochreguliert (Alegre et al., 1996; Carreno et al., 2000). Für die T Zellaktivierung interagiert die T Zelle mit einer APC über die Bindung des T Zellrezeptors (TCR) an den *major histocompatibility complex* (MHC). Bei der Kostimulation des aktivierenden Rezeptors CD28 der T Zelle durch Bindung an die Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf der APC wird die Proliferation, Aktivierung und Migration der T Zellen stimuliert und eine T Zellapoptose verhindert (Boise et al., 1995; Tacke et al., 1997). CTLA4 bindet kompetitiv und mit höherer Affinität als CD28 an die Liganden B7-1 und B7-2 (Chambers et al., 2001) und inhibiert hierüber Effektor T Zellen oder terminiert die T Zellantwort und supprimiert die Immunantwort (Peggs et al., 2009). Die in der Immuntherapie eingesetzten anti-CTLA4 Antikörper blockieren die hochaffine Bindung von CTLA4 an die Liganden und ermöglichen so eine Bindung von CD28. Diese CTLA4 Blockade verhindert die Suppression der T Zellen und ermöglicht eine T Zell-vermittelte antitumorale Immunantwort mit dem Resultat einer Tumorreduktion (Leach et al., 1996; Peggs et al., 2009). Derzeit sind zwei α CTLA4 Antikörper für die Krebstherapie zugelassen: Ipilimumab, ein humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper, und Tremelimumab, ein humanisierter monoklonaler IgG2 Antikörper. Mit beiden Antikörpern werden zur Zeit klinische Phase I und II Studien für unresezierbaren, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten PDAC durchgeführt (Johansson et al.,

2016). Insgesamt zeigte sich bei der Verwendung der Immuncheckpointinhibitoren in der Klinik für verschiedene Tumorentitäten ein besseres Nebenwirkungsprofil bei der PD1 Blockade im Vergleich zur CTLA4 Blockade (Boutros et al., 2016; Mahoney et al., 2015a).

Beim Pankreaskarzinom konnten mit den bisher durchgeführten Immuntherapien mit Immuncheckpointblockade oder Vakzinen als Monotherapien nur moderate Erfolge erzielt werden (Beatty et al., 2011; Le et al., 2015; Stromnes et al., 2014), da PDAC im Gegensatz zu anderen Tumoren wie Melanomen aufgrund seines ausgeprägten Tumormikromilieus und der geringen Infiltration von Effektor Lymphozyten als nicht-immunogener Tumor angesehen wird (von Bernstorff et al., 2001; Clark et al., 2009). Man geht davon aus, dass eine Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie einen Zusatznutzen bringt, da die Chemotherapie die Tumormasse reduziert und tumorassoziierte Antigene freisetzen kann (Mahoney et al. 2015). Letztere können, wenn sie von APC präsentiert werden, als *in situ* Vakzine funktionieren (Hannani et al., 2011) und so bei einer Checkpointinhibition zur Induktion einer antitumoralen T Zellantwort dienen.

2.5. Der Immunoeditierungsprozess bei der Tumorentstehung

Einer der Gründe für die ineffektive Therapie des Pankreaskarzinoms ist die Fähigkeit des Tumors, der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen (Sideras et al., 2014). Allerdings spielt das Immunsystem auch bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle. Hier kann es sowohl antitumoral wirken und durch die Zerstörung der Tumorzellen (Mittal et al., 2014) das Tumorstadium verlangsamen (Braumüller et al., 2013). Aber auch eine protumorigene Wirkung durch Bildung eines suppressiven Tumormikromilieus, was die Tumorstadium begünstigt, ausüben (Junttila and de Sauvage, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass die Tumorentstehung einem fundamentalen Immunoeditierungsprozess unterliegt, der in drei Phasen unterteilt werden kann: Der Eliminierung (*elimination*), dem Gleichgewicht (*equilibrium*) und dem Entkommen (*escape*) (Dunn et al., 2004; Schreiber et al., 2011; Shankaran et al., 2001). In der Eliminierungsphase bewirken das angeborene und das adaptive Immunsystem, dass Tumore noch während der Entstehung erkannt und eliminiert werden. In der Phase des Gleichgewichts verhindert das adaptive Immunsystem ein Tumorstadium und hält dieses in einem Ruhezustand (Koebel et al., 2007). Zeitgleich führt der ständige Selektionsdruck zu einer verringerten Immunogenität der Tumorzellen. In der *escape* Phase wachsen Tumorzellen, die die Fähigkeit akquiriert haben der Erkennung und der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen, zu reifen, progredient wachsenden Tumoren aus. Hierbei kann der Übergang vom Gleichgewicht in die *escape* Phase durch eine veränderte Immunantwort auf die Tumorzellen aufgrund einer erhöhten tumorinduzierten Immunsuppression oder aufgrund eines Funktionsverlusts der antitumoralen Antwort zurückzuführen sein (Dunn et al., 2004; Schreiber et al., 2011). Die Eigenschaft des Tumors der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen, zählt zu den von Hanahan und Weinberg beschriebenen „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan and Weinberg, 2011).

2.6. Zusammensetzung des Tumormikromilieus des Pankreaskarzinoms und dessen Bedeutung für die Immunsuppression

Für eine effektive antitumorale Antwort sind zytotoxische CD8 T Zellen, CD4 Typ 1 T Helferzellen (Th1), reife DCs, aktivierte proinflammatorische Makrophagen (M1) und NK Zellen notwendig. Um einer Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen nutzen die Tumorzellen eine Vielzahl von Mechanismen. Über die Herunterregulation von MHC I wird eine CD8 T Zell-vermittelte Antwort verhindert (Seliger et al., 2001) und zusätzlich wird über die vermehrte Expression von Immuncheckpointmolekülen eine Immunioninhibition induziert (Dong et al., 2002). In Kombination mit dem in der Tumorumgebung ausgebildeten immunsuppressiven Mikromilieu wird auf diese Weise eine Tumorprogression begünstigt. Das Tumormikromilieu des Pankreaskarzinoms besteht aus fibrotischem Stroma, Matrix Komponenten und einer Vielzahl inflammatorischer Zellen wie Tregs, MDSCs und Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), die durch Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Liganden Expressionen die Aktivität zytotoxischer T Zellen und NK Zellen inhibieren (Clark et al., 2007; Mantovani et al., 2008).

Die charakteristische, stark ausgeprägte extrazelluläre Matrix, die Teil der desmoplastischen Reaktion ist, besteht zu Großteilen aus Kollagen, Fibronectin, Proteoglykan und Hyaluronsäuren sowie katalytisch aktiven Enzymen und Proteasen (Neesse et al., 2015). Die Akkumulation dieser Komponenten führt zu einer Kompression der Blutgefäße und zu einer vaskulären Dysfunktion. Dies trägt zur Medikamentenresistenz des Pankreaskarzinoms bei (Olive et al., 2009). Außerdem schirmt das desmoplastische Stroma den Tumor vor dem Immunsystem ab und ist beteiligt an der PDAC Initiierung, Progression, Invasion und beeinflusst auch die Metastasierung (Neesse et al., 2011).

Die Tumorzellen sekretieren Chemokine, wodurch die immunsuppressiven Zellen ins Tumormikromilieu rekrutiert werden. Diese werden durch direkten Kontakt mit der Tumorzelle oder über lösliche, vom Tumor sezernierte Faktoren aktiviert und setzen wiederum selbst tumorfördernde Mediatoren frei (Feig et al., 2012).

Hierbei wirken die *Myeloid derived suppressor cells* (MDSCs), die CD11b und Gr1 exprimieren und unreife myeloide Vorläuferzellen darstellen, sowohl auf die adaptive als auch auf die angeborene Immunantwort supprimierend (Ostrand-Rosenberg, 2010). Sie entziehen der Umgebung einige Aminosäuren wie Cystein, Arginin und Tryptophan, die wichtig für die Funktion, Proteinbiosynthese und Aktivierung der T Zellen sind (Bronte et al., 2003; Munn et al., 1999; Srivastava et al., 2010). Außerdem erzeugen MDSC reaktive Sauerstoffspezies, beeinflussen die T Zell Wanderung zum Lymphknoten und sekretieren TGF β , wodurch sie sowohl die Funktion von Effektor T Zellen und NK Zellen inhibieren als auch die Bildung von Tregs fördern (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). PDAC Patienten weisen im Vergleich zu gesunden Menschen eine deutlich erhöhte Frequenz an MDSCs im Blut auf (Gabitass et al., 2011).

Durch die vom Tumormikromilieu sezernierten Faktoren wie IL-10 und TGF β wird bei den Tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) ein protumorigener Phänotyp (M2) im Gegensatz zu einem proinflammatorischen Phänotyp (M1) induziert (Zhang et al., 2016). M2 Makrophagen haben Einfluss auf die Matrix Umbildung, fördern die Tumorangiogenese und die Metastasierung. Außerdem sezernieren die M2 Makrophagen wiederum selber IL-10 und TGF β und exprimieren inhibitorische Liganden wie PD-L1 (Mantovani et al., 2002).

Als APC haben Dendritische Zellen eine entscheidende Rolle bei der antitumoralen Immunantwort und gelten als Schnittstelle zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Als professionelle APCs können DCs sowohl auf MHC I zur Stimulation von CD8 T Zellen als auch auf MHC II für die Interaktion mit CD4 T Zellen Antigene präsentieren (Sloan et al., 2002). Hierdurch können sie theoretisch Tumor-spezifische Effektor T Zellen für eine Eliminierung des Tumors initiieren. Allerdings ist die Reifung und das Überleben der DC im immunsuppressiven Milieu des Tumors beeinträchtigt, wodurch diese z.B. über die Expression von inhibitorischen Liganden wie PD-L1 bzw. PD-L2 selbst immunsuppressiv wirken (Tran Janco et al., 2015).

Außerdem beeinflussen die im Tumormikromilieu befindlichen immunsuppressiven Zytokine die CD4 T Helferzellen, so dass diese eher in einem tumortolerierenden Phänotyp (Th2) als in einem Immunantwort-induzierenden Phänotyp (Th1) vorliegen. Bei einer überwiegenden Th2 Antwort wird die Antwort der antitumoralen CD8 und CD4 T Zellen inhibiert (Bellone et al., 1999). Zusätzlich hierzu ist im Tumormikromilieu eine erhöhte Anzahl an regulatorischer T Zellen (Tregs) zu finden (Tang et al., 2014). Diese CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen sind beteiligt an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und supprimieren normalerweise überschießende Immunreaktionen und verhindern Autoimmunität (Graca et al., 2005). Im Tumor erzeugen sie ein lokales immunsuppressives Milieu und inhibieren die Funktion der tumorspezifischen T und NK Zellen (Antony et al., 2005; Oldenhove et al., 2003; Qin, 2009). PDAC Patienten weisen eine erhöhte Frequenzen von Tregs in Blut und Tumorgewebe auf (Ikemoto et al., 2006).

Auch die Tumorzellen selbst tragen durch ihren Einfluss auf metabolische Faktoren zur Suppression der Immunantwort bei und begünstigen eine Tumorprogression. Die Konkurrenz um limitierte energetische Faktoren wie Glukose, die einen essentiellen Faktor zur T Zellaktivierung darstellt, bedingt einen immunsuppressiven Effekt (Chang et al., 2015). Zusätzlich supprimieren die Tumorzellen durch einen Lactat-Efflux die NK Zellen und stimulieren hierdurch gleichzeitig die MDSC Funktion (Husain et al., 2013). Durch die Sekretion bzw. Expression immunsuppressiver Faktoren wie TGF- β , IL-10 und IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) haben die Tumorzellen selbst einen immunsuppressiven Effekt (Rabinovich et al., 2007). IDO katabolisiert Tryptophan zu N-Formylkynurenin. Dies resultiert sowohl durch den Tryptophanmangel als auch durch die Kynurenin Sekretion zu einer Stimulation der Tregs und einer Inhibition der T Zellaktivierung (Fallarino et al., 2006; Witkiewicz et al., 2008). Sowohl das stark ausgeprägte immunsuppressive Tumormikromilieu als auch die geringe Infiltration von Effektor-Lymphozyten beeinflussen maßgeblich die Progression

des Pankreaskarzinoms und erschweren die Behandlung. Daher sind neue therapeutische Strategien, die Einfluss auf das immunsuppressive Milieu nehmen oder die antitumorale Immunantwort potenzieren, von großem Interesse.

2.7. Bedeutung der T Zellantwort für die Tumorkontrolle

Die T Zellen zählen zu den Haupteffektorzellen der adaptiven Immunantwort und sind von entscheidender Bedeutung für die antitumorale Immunantwort. Man unterscheidet in erster Linie zwischen CD4⁺ T Helferzellen mit einer MHC II Restriktion und den MHC I restringierten zytotoxischen CD8⁺ T Zellen. Nach der Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen kommt es zu einer Proliferation der T Zellen und diese wandern an den Ort des Antigens. Dort kann eine Zellvermittelte Zytotoxizität induziert und die Zielzelle lysiert werden (Kägi et al., 1996). Für eine effektive Aktivierung der T Lymphozyten bedarf es drei Signale. Das erste wird durch eine starke Bindung des T Zellrezeptors (TCR) an den Antigen-beladenen MHC auf der APC induziert (Lanzavecchia et al., 1999). Das zweite Signal wird durch kostimulatorische Moleküle veranlasst. Hierbei konkurrieren aktivierende, proliferationsstimulierende mit inhibitorischen Signalen. Das dritte Signal ist bedingt durch Zytokine. Bei positiver Kostimulation und begünstigendem Zytokin-Milieu wird eine T Zellaktivierung induziert. Der Hauptrezeptor für das zweite Signal ist der kostimulatorische Rezeptor CD28, der auf nahezu allen CD4 und einem Großteil der CD8 T Zellen exprimiert wird (Greenwald et al. 2005). Nach Bindung des TCR an MHC und anschließender Bindung von CD28 an dessen Liganden B7-1 (CD80) bzw. B7-2 (CD86) führen die synergistischen intrazellulären Signale zur Induktion der Replikation und Aktivierung der sekretorischen Wege (Lenschow et al., 1996). Dies führt gleichzeitig zur Induktion der Expression von CTLA4 auf der Zelloberfläche (Alegre et al., 1996). CTLA4 kompetitiert mit CD28 um die Liganden B7-1/B7-2 und führt zu einer negativen Regulation der induzierten T Zellantwort (Walunas et al., 1994). Die B7/CD28 Familie ist heterogen und beinhaltet mit z.B. CD28 und ICOS positive (Coyle et al., 2000) und mit CTLA4, PD1 und BTLA4 auch negative Kostimulatoren (Watanabe et al., 2003). In Folge der ersten beiden Signale, TCR-MHC Bindung und positiver Kostimulation, werden eine Reihe von Zytokinen ausgeschüttet, unter anderem IL-2, IL-7 und IL-15 (Schluns and Lefrançois, 2003). Diese Zytokine induzieren die T Zellproliferation, sowie die Differenzierung der zytotoxischen T Zellen, regulieren die Entwicklung der Lymphozyten im Thymus und beeinflussen die Bildung von NK Zellen (Lodolce et al., 1998; Peschon et al., 1994; Smith, 1988). Allerdings ist die Funktion der tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Tumormikromilieu stark inhibiert, wodurch eine T Zellvermittelte Tumor-Zytotoxizität verhindert wird. Pankreaskarzinomzellen nutzen hierbei z.B. die inhibitorischen Liganden, wie PD-L1, um die zytotoxischen T Zellen zu supprimieren (Nomi et al., 2007). Trotzdem korreliert die Dichte der CD8⁺ Effektor T Zellen im Tumor häufig mit einer verbesserten Prognose in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten wie Kolorektalkarzinom oder Mammakarzinom (Ali et al., 2014; Naito et al., 1998). Daher wird der Infiltrationsgrad des

Tumorgewebes mit CD8 T Zellen häufig als prognostischer Faktor verwendet und auch beim PDAC korreliert eine erhöhte Infiltration mit einer besseren Prognose (Fukunaga et al., 2004). Allerdings zeichnet sich das Pankreaskarzinom durch eine geringe Effektor-Lymphozyten Infiltration aus (von Bernstorff et al., 2001; Clark et al., 2007), da bereits bei der Bildung der prämaligen Läsionen die Frequenz der CD8 T Zellen sinkt, gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der Anzahl an immunsuppressiven Tregs (Hiraoka et al., 2006).

2.8. Rolle der NK Zellen in der Tumorkontrolle

Die Natürlichen Killer (NK) Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und spielen sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunantwort eine Rolle. Für eine Aktivierung der NK Zellen ist das Verhältnis von aktivierenden und inhibierenden Signalen entscheidend (Lanier, 2005). Für gewöhnlich exprimieren gesunde Zellen MHC I auf ihrer Oberfläche und nur wenige aktivierende NK Zellliganden. Die Reduktion der MHC I Expression auf der Zelloberfläche ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Tumorentwicklung und verhindert die Bindung inhibitorischer Rezeptoren der NK Zelle (Liao et al., 1991). Zu den wichtigsten inhibitorischen NK Zellrezeptoren zählen die Rezeptoren der KIR Familie im humanen und der Ly49 C-typ Lektin Familie im murinen System (Hanke et al., 1999; Long et al., 1997). Bei gleichzeitiger Expression von NK Zellliganden auf den Tumorzellen, die mit aktivierenden Rezeptoren auf der NK Zelle interagieren, wird durch das mangelnde inhibitorische Signal eine zytotoxische NK Zellantwort stimuliert. Die Expression von NK Zellliganden wird durch zellulären Stress, viraler Infektion oder bei der malignen Transformation induziert. Aktivierende Rezeptoren, die bei der Tumorzelllyse beteiligt sind, sind unter anderem NCR (*natural cytotoxicity receptor*), CD16 und NKG2D (Bauer et al., 1999; Bryceson et al., 2005). Hierbei führt z.B. die Bindung von NKG2D an NKG2D Liganden zu einer erhöhten NK Zell Proliferation, Zytotoxizität und induziert die Produktion einer Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen (Sutherland et al., 2002). Zu den aktivierenden Rezeptoren zählt auch CD226 (DNAM-1), der kompetitiv mit dem inhibierenden Rezeptor CD96 (TACTILE) an CD155 bindet (Chan et al., 2014). CD155 ist nur in geringem Maße auf gesundem Gewebe zu finden und wird deutlich auf verschiedenen Krebszelllinien und Primärtumoren exprimiert (Sloan et al., 2004). Für die Interaktion von CD226 mit CD155 konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der antitumoralen NK-Zell Zytotoxizität hat (El-Sherbiny et al., 2007). CD96 wirkt dieser CD226-vermittelten NK Zellaktivierung entgegen und beeinflusst hierbei vor allem die IFN γ Produktion der NK Zellen (Chan et al., 2014).

Nach Aktivierung können NK Zellen maligne Zellen über verschiedene Mechanismen eliminieren. Einerseits erfolgt dies durch die Ausschüttung zytotoxischer Granula, die Perforin und verschiedene Granzyme enthalten. Dies führt zur Perforation der Zielzelle und zu einer Granzym-vermittelten Apoptose (Heusel et al., 1994). Zusätzlich gibt es einen Liganden-abhängigen Weg, um die Zielzellen zu zerstören. Die Interaktion der Rezeptoren Fas oder DR4/DR5 mit den Liganden FasL bzw. TRAIL auf der NK Zelle induziert in den Tumorzellen eine Caspase-abhängige Apoptose (Zamai et al., 1998).

Außerdem sezernieren NK Zellen eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ und GM-CSF (Biron, 1997). Hierdurch unterstützen die NK Zellen die Initiierung und Aufrechterhaltung antitumoraler T Zellantworten und sind bei der Stimulation und Reifung der DC involviert und haben so auch einen indirekten Einfluss auf die antitumor Antwort (Adam et al., 2005). In positiver Rückkopplung führen die von T Zellen und DCs sekretierten Zytokine IL-2, IL-12, IL-15 bzw. $\text{IFN}\alpha/\beta$ zu einer verstärkten Aktivierung, fördern die Reifung und die lytische Aktivität der NK Zellen (Biron et al., 1999; Smyth et al., 2002). Die Herunterregulation von MHC I tritt bei PDAC häufig auf (Pandha et al., 2007), wodurch Tumorzellen ein angreifbares Ziel für die NK Zellen werden. Allerdings ist die NK Zellaktivität bei PDAC Patienten verringert (Aparicio-Pagés et al., 1991), da gleichzeitig aktivierende NK Zellliganden auf der Zelloberfläche von Pankreaskarzinomzellen herunterreguliert sind (Duan et al., 2011).

2.9. Zielsetzung der Arbeit

Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch ein besonders aggressives und invasives Wachstum mit früher Metastasierung aus, wodurch sich für Pankreaskarzinompatienten eine extrem schlechte Prognose ergibt. Hierbei limitieren vor allem die stark ausgeprägte Resistenz und das schlechte Ansprechen des PDAC, maßgeblich den therapeutischen Erfolg. Die Wirkung der einzig kurativen Therapieoption, der operativen Entfernung des Tumors, wird durch die Rezidivierung trotz zusätzlicher adjuvanter Therapie beeinträchtigt. Die Entwicklung präklinischer Modelle, die den Aspekt der chirurgischen Tumorentfernung nachbilden, ist vor allem im Hinblick auf die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien von besonderer Wichtigkeit. Die bereits etablierten Mausmodelle spiegeln zwar die PDAC Progression und die phänotypischen Charakteristika des humanen PDAC wider, sind aber aufgrund einer multifokalen Tumorentstehung für eine R0 Resektion ungeeignet.

Daher sollte im Rahmen der Dissertation ein PDAC Mausmodell mit einem singulären, resezierbaren Tumor mit hohem metastatischem Potential für die Untersuchung neuer therapeutischer Strategien etabliert und charakterisiert werden. Hierzu sollte mittels *in situ* Elektroporation in adulten Mäusen ein Pankreaskarzinom induziert werden. Der hierfür verwendete genetische Hintergrund sollte die auftretenden genetischen Veränderungen des humanen Pankreaskarzinoms widerspiegeln und der Tumor sollte neben den typischen morphologischen Charakteristika des humanen PDAC auch ein invasives Wachstum und eine schnelle Metastasierung aufweisen. Aufgrund des hohen therapeutischen Potentials von Immuncheckpointblockaden sollte dieses Modell genutzt werden, um im präklinischen Setting immuntherapeutische Strategien zur Komplementierung der Resektions- und Chemotherapie zu untersuchen. Hierbei sollten blockierende Antikörper gegen PD1 und CTLA4 zur Stimulation einer CD8 T Zellantwort im Kontext von konventioneller Gemcitabintherapie sowohl in einem postoperativen als auch in einem präoperativen Ansatz eingesetzt werden. Der Erfolg der Therapien sollte anhand des Überlebens sowie der Metastasierungsraten ermittelt werden. Zusätzlich sollte ein möglicher Einfluss der Therapien auf die Induktion einer antitumoralen Immunantwort untersucht und die Relevanz einzelner Immunzelltypen mittels Depletionsversuchen evaluiert werden. Außerdem sollte der Einfluss der Therapien auf die unterschiedlichen Immunzellpopulationen im Blut und im Tumorgewebe bzw. nach der Resektion im Resektionsrand mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht werden. Anschließend sollte anhand des vorher analysierten Immunstatus prä- bzw. postoperativ eine NK Zellstimulation als unterstützende Therapie eingesetzt werden, um hierdurch eine antitumorale Immunantwort zu fördern. Letztendlich sollte im etablierten Modell die Tumorsektion mit einer CD8 T und NK Zellstimulation im Kontext einer konventionellen Chemotherapie eingesetzt werden, um einen synergistischen therapeutischen Effekt zu evaluieren.

3. Ergebnisse

3.1. Induktion eines resezierbaren Tumors im Pankreas mittels *in situ* Elektroporation

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell etabliert, bei dem ein singulärer Tumor im Pankreasschwanz induziert wird. Hierbei wird onkogene Plasmid DNA in den Pankreasschwanz injiziert und durch anschließende Elektroporation erfolgt eine Transduktion und Transformation der Zellen (Abbildung 1). Durch den lokalen DNA Transfer entsteht ein resezierbarer Pankreastumor, wobei die benötigte Zeit der Tumorentstehung abhängig von der Zusammensetzung der injizierten onkogenen Plasmid DNA ist.

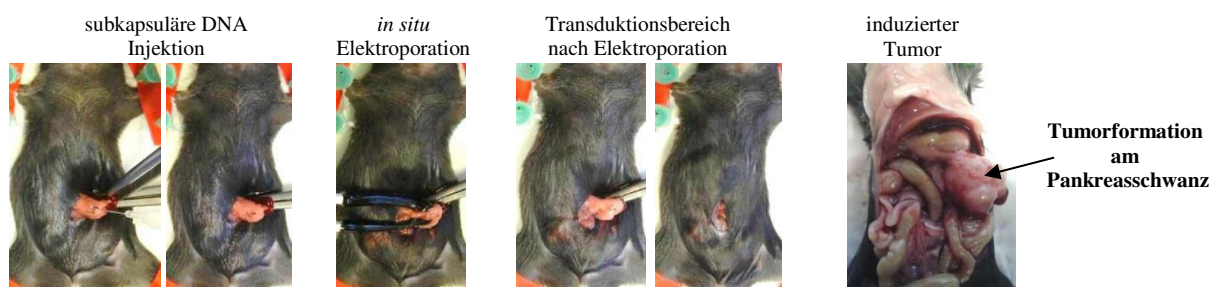


Abbildung 1 – Darstellung des *in situ* Elektroporationsvorgangs zur Tumorinduktion. Nach der Plasmid DNA Injektion wird die Blase, die durch die Injektion entsteht, mit einer Elektroporationspinzette umschlossen und das Gewebe elektroporiert. In dem transduzierten Bereich entwickelt sich ein lokal begrenzter Tumor. (Bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Das lokal begrenzte Wachstum des Tumors ermöglicht eine vollständige Resektion (R0-Resektion) (Abbildung 2). Hierzu wird der Tumor mitsamt der Milz vorgelagert, die Blutversorgung von Milz und Tumor mithilfe von Ligatur-Clipsen und anschließender Koagulation durchtrennt. Nachfolgend kann das tumortragende Gewebe abgetrennt und entfernt werden.

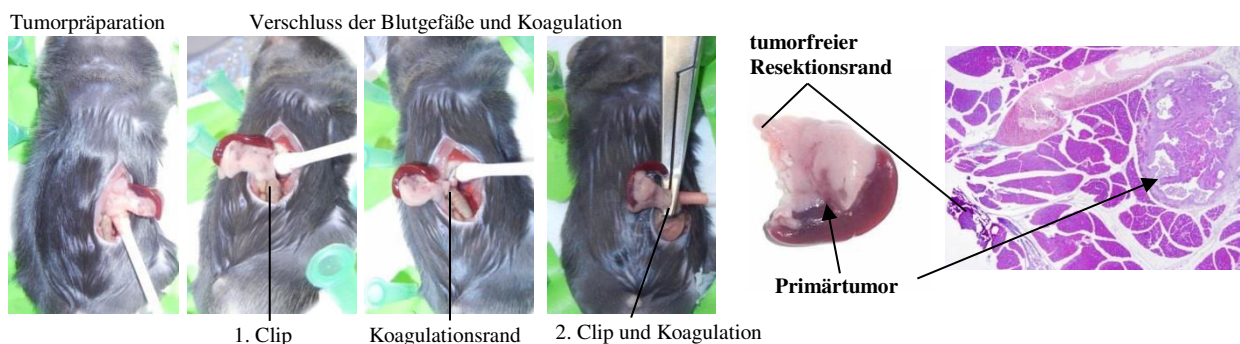


Abbildung 2 – Das Wachstum eines singulären Tumorknotens ermöglicht eine R0-Resektion. Für die Resektion wird der entstandene Pankreastumor zusammen mit der Milz vorgelagert und die versorgenden Blutgefäße werden mit Ligatur-Clipsen abgeklemmt. Mithilfe eines Elektrokauters werden die Gefäße koaguliert und der Tumor kann entfernt werden. (In Teilen bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Dieses Mausmodell ermöglicht die Untersuchung verschiedener neuer Therapieansätze für das duktales Adenokarzinom des Pankreas (Abbildung 3). Neben einer therapeutischen Behandlung ohne operativen Eingriff (palliative Therapie), die auch bei anderen genetisch modifizierten Mausmodellen

mit multifokaler Tumorentstehung wie der KPC Maus (Hingorani et al., 2005) durchführbar ist, besteht bei dem Elektroporationsmodell die Möglichkeit, nach der Tumorsektion zu therapieren (adjuvante Therapie). Dies zählt zur Standardtherapie beim humanen PDAC und ist die derzeit einzig potentiell kurative Therapie. Zusätzlich können neue therapeutische Strategien wie die neoadjuvante Therapie untersucht werden, bei der zudem präoperativ behandelt wird.

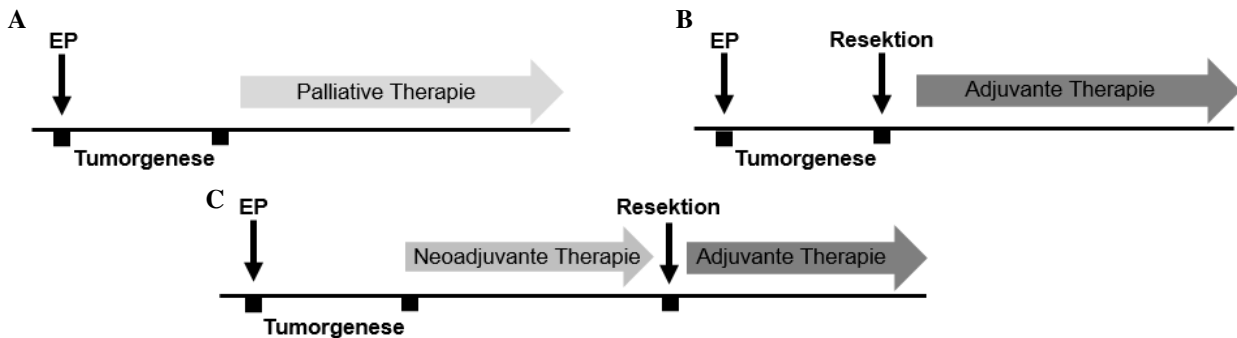


Abbildung 3 – Schematische Darstellung der therapeutischen Strategien im Kontext einer chirurgischen Resektion. Die palliative Therapie umfasst eine therapeutische Behandlung ohne chirurgischen Eingriff (A). Die adjuvante Therapie erfolgt nach einer Tumorsektion mittels unterstützender medikamentöser Behandlung (B). Bei der neoadjuvanten Therapie erfolgt eine medikamentöse Behandlung vor der Tumorsektion und es besteht die Möglichkeit nach dem operativen Eingriff eine medikamentöse Therapie anzuschließen (C). EP: Elektroporation

Zur Untersuchung neuer therapeutischer Strategien mit hoher klinischer Relevanz ist ein Tiermodell notwendig, welches das humane Krankheitsbild mit den zurzeit gültigen Therapieoptionen, insbesondere einer R0-Resektion, widerspiegelt. Das humane PDAC zeichnet sich durch ein progressives und früh metastasierendes Tumorwachstum aus. Diese Merkmale der Karzinogenese sollten im Mausmodell nachempfunden werden, wobei die häufigsten im humanen vorkommenden genetischen Veränderungen als Grundlage dienen.

3.1.1. Tumorgenese bei Expression von mutiertem Kras bei p53 *knockout*

Aktivierende Kras Mutationen sind bereits in den frühen PanIN Läsionen zu finden und werden als ein initialer Schritt bei der PDAC Entstehung angesehen. Auch die häufig auftretenden p53-Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen, zählen zu den grundlegenden genetischen Aberrationen bei der PDAC Progression. Daher wurde mit zwei unterschiedlichen Ansätzen der Einfluss einer Kras Mutation und der Deletion von p53 auf die Tumorentstehung und Metastasierung untersucht, um die häufigsten genetischen Veränderungen im humanen PDAC abzubilden. Hierbei wurde das Überleben der Mäuse, anhand festgelegter Abbruchkriterien (siehe 5.3.7.), insbesondere der Tumorgöße und des Allgemeinbefindens, ermittelt.

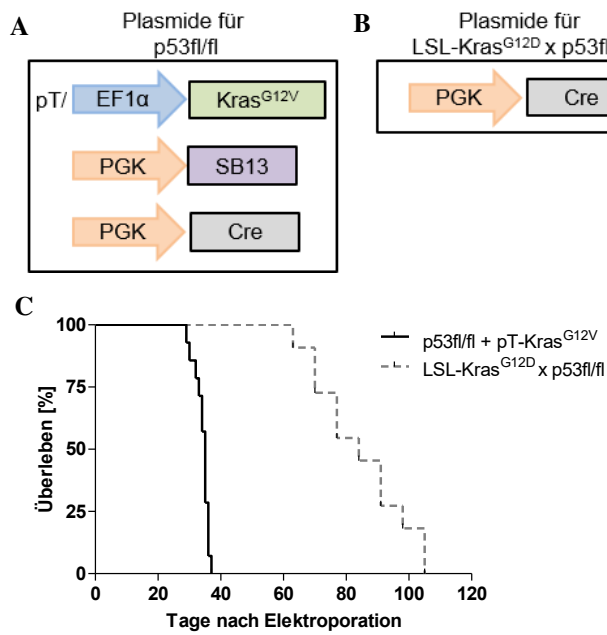


Abbildung 4 – Expression von mutiertem Kras führt in Kombination mit einer p53-Deletion zur Tumorgenese. Zur Elektroporation verwendete Plasmide für die p53fl/fl Maus (A). In diesem Modell erzeugt die Cre Rekombinase einen p53 knockout. Kras^{G12V} wird durch ein Transposon überexprimiert, wobei die SB13 eine stabile Integration hervorruft. (B) Bei der LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Maus führt die Elektroporation des Plasmids für die Cre Rekombinase zu einem p53 *knockout* und gleichzeitig zu einer endogenen Expression von Kras^{G12D}. (C) Überlebenskurve der beiden elektroporierten Gruppen. Das Überleben wurde anhand eines vorher festgelegten Scores definiert, dieser setzte sich aus der Tumorgröße und dem Allgemeinzustand der Mäuse zusammen (siehe Material und Methoden 5.3.7). Bei Erreichen eines der Abbruchkriterien wurden die Mäuse getötet und die Tumore, Lebern und Lunge histologisch untersucht. (Bereits publiziert in (Gürlevik et al. 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Gruppen	Mäuse mit Tumor	Inzidenz	Metastasen	Mittleres Überleben [Tage]
p53 fl/fl + Cre	0/5	0 %	-	-
p53 fl/fl + pT-Kras ^{G12V} + SB13	0/5	0 %	-	-
p53 fl/fl + pT-Kras ^{G12V} + Cre + SB13	14/14	100 %	0 %	35
LSL-Kras ^{G12D} x p53fl/fl + Cre	12/12	100 %	0 %	84

Tabelle 1 – Analyse der Tumorzinzidenz und des mittleren Überlebens der elektroporierten Gruppen. Nachfolgend zur Elektroporation der blau gekennzeichneten Plasmide wurde die Tumorzinzidenz, das mittlere Überleben nach Elektroporation und die Metastasierung in den einzelnen Gruppen über einen Zeitraum von 250 Tagen untersucht.

In einem ersten Ansatz wurde ein Mausstamm mit einem geflochten p53 Gen (p53fl/fl), bei dem durch die Einbringung einer Cre Rekombinase ein funktioneller *knockout* des p53 induziert werden kann, verwendet. Zur Tumorzinduktion wurde der in Abbildung 4A gezeigte Plasmid-Mix für die Elektroporation genutzt. Zusätzlich zum Cre Rekombinase-vermittelten p53 *knockout* wurde eine Überexpression von mutiertem Kras (Kras^{G12V}) mit einem pT3-basierten Plasmid induziert. Das hierfür verwendete pT3 Transposon weist aufgrund eines zusätzlichen TA-dinukleotids am 3' Ende eine erhöhte Transpositionsaktivität auf (Yant et al., 2004). Mithilfe der SB13 Transposase wurde das Gen stabil in das Zellgenom integriert. Bei der SB13 handelt es sich um eine zweifach mutierte, hyperaktive (T83A, K33A) SB10 Transposase (Yant et al., 2004). Es zeigte sich, dass die alleinige Deletion von p53 oder die alleinige Überexpression von Kras^{G12V} zu keinem Tumorzwachstum führte (Tabelle 1). Nur bei einer Kombination der beiden genetischen Veränderungen konnte bei allen Tieren ein synchrones Tumorzwachstum in einem Zeitraum von 29 zu 37 Tagen mit einer Inzidenz von 100% beobachtet werden. Dieses resultierte in einem mittleren Überleben von 35 Tagen (Abbildung 4 C). In einem zweiten Ansatz wurde ein gekreuzter Mausstamm aus LSL-Kras^{G12D} und p53fl/fl

(LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Maus) verwendet. Bei diesem ist neben dem geflochten p53 Gen ein konstitutiv aktives Kras^{G12D} unter der Kontrolle einer geflochten Stoppkassette (LSL) eingebracht. Der Einsatz einer Cre Rekombinase induziert eine p53-Deletion und zeitgleich eine Exzision der Stoppkassette vor dem onkogenen Kras, wodurch dieses exprimiert wird. Die Cre-induzierte endogene Expression von Kras^{G12D} und die p53-Deletion (Abbildung 4 B) führte im Pankreas der LSL-Kras^{G12V} x p53fl/fl Maus 60 Tage nachfolgend zur Elektroporation zu einer Tumorgenese. Diese verlief im Vergleich zu den per Kras-Transposon induzierten Tumoren in der p53fl/fl Maus langsamer und mit einer breiteren Streuung in der Tumorentwicklung. Dies spiegelte sich auch in der Überlebenszeitanalyse wider, wo das mittlere Überleben der LSL-Kras^{G12V} x p53fl/fl Maus bei 84 Tagen lag (Abbildung 4 C). Bei keiner der Mäuse konnte zum Tötungszeitpunkt makroskopisch und histologisch eine Metastasierung in Leber, Lunge oder Peritonealraum beobachtet werden.

Die generierten Tumore im p53fl/fl Modell wiesen histologisch eine geringere Differenzierung auf als die langsamer wachsenden Tumoren im LSL-KrasG12D x p53fl/fl Modell (Abbildung 5). Es konnte in beiden Tumoren immunhistochemisch eine Expression von Cytokeratin-19 (CK19) auf den dukталen Strukturen nachgewiesen werden, welches ein Marker für Adenokarzinome ist. Diese Strukturen sind von einem dichten desmoplastischen Stroma umgeben, das durch eine Färbung von α -smooth muscle actin (α Sma) detektiert wurde. Die Aktivierung des Kras Signalwegs führt zu einer Aktivierung der extrazellulären signal-regulierten Kinase Erk-1/2, was ebenfalls in den Tumoren der beiden Modelle nachgewiesen werden konnte. Somit wiesen beide Tumore mit deutlich sichtbaren CK19-positiven dukталen Strukturen neben hohen Anteilen von desmoplastischen Stroma die typischen histopathologischen Charakteristika des humanen PDAC auf.

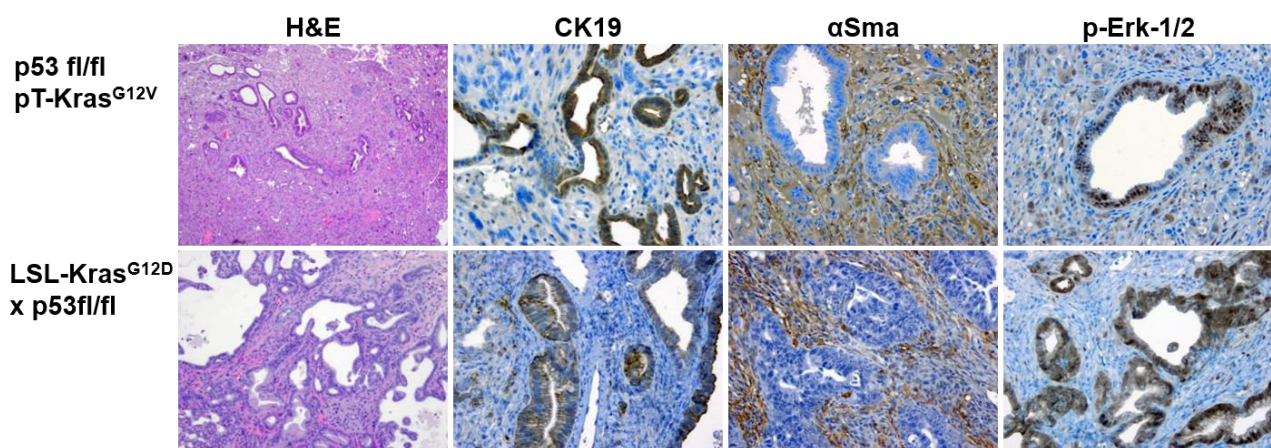


Abbildung 5 – Histologische und immunhistochemische Untersuchung der mittels Expression von mutiertem Kras und Deletion von p53 im p53fl/fl und LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Mausstamm induzierten Tumore. Die Tumore wurden isoliert und Paraffinschnitte angefertigt. Gezeigt sind die Färbung mit Hämalaun und Eosin (H&E) in 100x Vergrößerung und die immunhistochemische Färbung von CK19, α Sma und p-Erk-1/2 in 200x Vergrößerung. (Bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Anhand der histologischen Untersuchungen der induzierten Primärtumore sollten die Prozesse während der Tumorprogression evaluiert werden. Es ist beschrieben, dass eine Pankreatitis die Tumorgenese durch Induktion einer lokalen Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

fördert (Guerra et al., 2007). Zudem verlieren die Azinuszellen während der Pankreatitis oder in Kombination mit einer Aktivierung von mutiertem Kras ihre zelluläre Identität und unterliegen einem Transdifferenzierungsprozess in Form einer Azinar-Duktalen-Metaplasie (ADM). Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von prämaligen Läsionen und der Entstehung von PDAC (Wong et al., 2016). Sowohl die ADM als auch eine starke Immunzellinfiltration, die ein Anzeichen für eine Pankreatitis ist, konnten im Mausmodell über den gesamten Zeitraum der Tumorprogression beobachtet werden (Abbildung 6). In der späten Phase der Tumorprogression konnten zum einen alle Stadien der *pancreatic intraepithelial neoplasm* (PanIN), der beim PDAC auftretenden prämaligen Läsionen, gezeigt werden, zum anderen waren die typischen duktaalen Strukturen des PDAC nachweisbar (Abbildung 6). Im Mausmodell konnten somit die wesentlichen Schritte, die bei der PDAC Entstehung involviert sind, deutlich nachgewiesen werden.

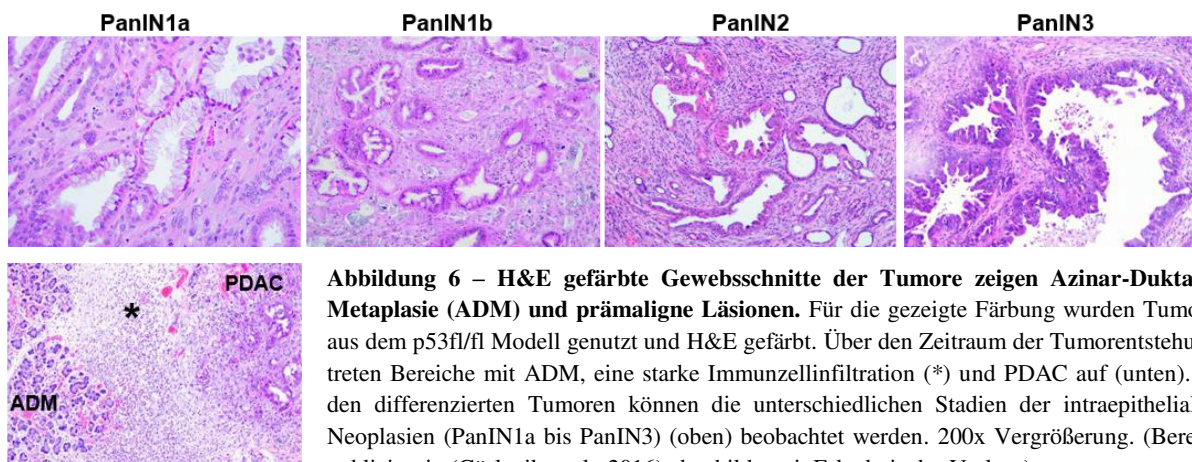


Abbildung 6 – H&E gefärbte Gewebsschnitte der Tumore zeigen Azinar-Duktale-Metaplasie (ADM) und prämale Läsionen. Für die gezeigte Färbung wurden Tumore aus dem p53fl/fl Modell genutzt und H&E gefärbt. Über den Zeitraum der Tumorentstehung treten Bereiche mit ADM, eine starke Immunzellinfiltration (*) und PDAC auf (unten). In den differenzierten Tumoren können die unterschiedlichen Stadien der intraepithelialen Neoplasien (PanIN1a bis PanIN3) (oben) beobachtet werden. 200x Vergrößerung. (Bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Die durch Expression von mutiertem Kras und Deletion von p53 generierten Tumore wiesen die typischen morphologischen Charakteristika des humanen PDAC auf. Allerdings konnte bei den untersuchten Gruppen keine Metastasierung in Gewebe wie Leber oder Lymphknoten festgestellt werden. Hierdurch wird deutlich, dass die Kombination des onkogenen Kras mit einer p53-Deletion zwar mit hoher Sicherheit PDAC induziert, jedoch die Metastasierungstendenz des humanen PDAC nicht ausreichend widerspiegelt.

3.2. Einfluss der Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 auf die Tumorentstehung und Metastasierung

Beim humanen PDAC gibt es neben den dominanten Aberrationen in Form von aktivierenden Kras Mutationen und des p53 Verlusts häufig Mutationen in Tumorsuppressorgenen, die bei der DNA Reparatur, der Apoptose oder der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Diese auftretenden Veränderungen sollten im Elektroporationsmodell nachempfunden werden, um ein möglichst dem humanen entsprechendes PDAC Modell zu generieren. Für eine höhere Flexibilität bei der Durchführung der Experimente wurde in diesen Versuchen mit *short hairpin* RNAs (shRNAs) zur Herunterregulation bestimmter Gene gearbeitet, so bestand die Möglichkeit, auf Wildtyp C57BL/6

Mäuse zurückzugreifen und eine zeitintensive homozygote p53fl/fl Mauszucht war nicht zwingend notwendig. Bei der Verwendung der shRNAs wird das Gentranskript, die mRNA, in Folge einer RNA Interferenz (RNAi), einer sequenz-spezifische Degradation der mRNA (Fire et al., 1998), abgebaut und so wird indirekt in die Genfunktion eingegriffen. Die stabile Expression von shRNAs kann in transgenen Mäusen einen effektiven Gen *knockdown* erzeugen (Carmell et al., 2003; Seibler et al., 2005) und stellt so ein effektives Mittel dar, um die Rolle bestimmter Gene z.B. bei der Tumorentstehung zu untersuchen. Für die Tumorentstehung in Wildtyp C57BL/6 Mäusen wurden shRNAs zur Herunterregulation der häufig im PDAC verändert vorliegenden Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 verwendet.

Zusätzlich wurde eine Kras^{G12V} Expression mithilfe eines pT Plasmids induziert. Die SB13 diente zur stabilen genomischen Integration der pT3 Transposon basierten Plasmide (Abbildung 7).

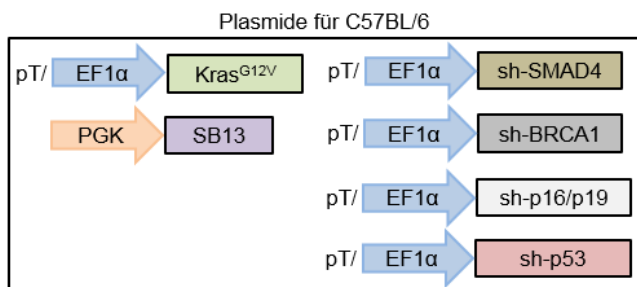


Abbildung 7 – Mittels *in-situ* Elektroporation der dargestellten Plasmide wurde im Pankreas von C57BL/6 Mäusen neben einer Kras^{G12V} Expression ein shRNA vermittelter Gen *knockdown* von SMAD4, BRCA1, p16/p19 oder p53 induziert. Die SB13 Transposase bewirkt eine stabile Integration der pT Plasmide ins Genom. Es wurden Plasmide zur Expression von Kras^{G12V} und der shRNAs gegen SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 verwendet.

Sowohl die verwendete shRNA für p53, publiziert in Brinkhoff et al., 2014, als auch die shRNA für p16/p19 waren bereits in dem Labor validiert. Die *hairpins* gegen SMAD4, die für die Generierung der sh-SMAD4 verwendet wurden, sind freundlicherweise von Michael Saborowski zur Verfügung gestellt und auf ihre Funktionalität überprüft worden. Die BRCA1 shRNAs des sh-BRCA1 Konstrukts sind bereits von Okamoto et al. beschrieben worden (Okamoto et al., 2013).

3.2.1. Untersuchungen zur Tumorinzidenz bei Verwendung von shRNAs zusätzlich zur Expression von Kras^{G12V}

Aufgrund der beschriebenen Bedeutung der aktivierenden Kras Mutation in der initialen Phase der PDAC Progression diente diese als Grundlage für die shRNA Versuche. In Abschnitt 3.1.1 konnte gezeigt werden, dass neben der Expression von onkogenem Kras weitere genetische Events notwendig sind um eine Tumorgenese zu induzieren. Daher wurde in einem ersten Ansatz der Einfluss eines *knockdowns* von SMAD4, BRCA1, p16/p19 oder p53 bei gleichzeitiger Kras^{G12V} Expression untersucht.

Plasmid Kombinationen	Mäuse mit Tumor	Inzidenz	Metastasen	Mittleres Überleben [Tage]
pT-Kras ^{G12V}	0/4	0%	-	-
pT-Kras ^{G12V} pT-shSMAD4	0/4	0 %	-	-
pT-Kras ^{G12V} pT-shBRCA1	0/4	0 %	-	-
pT-Kras ^{G12V} pT-shp16/p19	1/4	25 %	0%	nicht def.
pT-Kras ^{G12V} pT-shp53	4/5	80%	0%	63

Tabelle 2 – Tumorzinzidenz, Metastasierung und Mittleres Überleben bei Kombination von Kras^{G12V} Expression und Herunterregulation von SMAD4, BRCA1, p16/p19 oder p53. Nachfolgend zur Elektroporation der links aufgelisteten Plasmide wurde die Tumorentstehung und das Überleben der Mäuse über einen Zeitraum von 250 Tagen untersucht. Bei allen Elektroporationen wurde zusätzlich zu den aufgelisteten ein Plasmid für die SB13 Transposase verwendet, um eine stabile genomische Integration zu gewährleisten.

Hierbei führte die Expression von onkogenem Kras und die shRNA-induzierte Herunterregulation von SMAD4 oder BRCA1 zu keiner Tumorentstehung im Pankreas (Tabelle 2). Bei der Kombination aus shRNA gegen p16/p19 und Kras^{G12V} Expression konnte 48 Tage nach der Elektroporation in einer von vier Mäusen eine Tumorentstehung beobachtet werden. Die Herunterregulation von p53 führte bei Kras^{G12V} Expression zu einer Tumorzinzidenz von 80% in einem Zeitraum von 34 bis 68 Tagen nach Elektroporation. Allerdings zeigten die histologischen Untersuchungen, dass keiner der Ansätze eine Metastasierung in Leber, Lunge oder Peritoneum aufwies. Die Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Bedeutung der p53 Dysfunktion für die Tumorentstehung. Sowohl die direkte Interferenz mit dem p53 Signalweg über shRNA gegen p53 als auch der indirekte Einfluss durch die p16/p19 shRNA führten zu einer Tumorprogression. Hierbei hatte die sh-p16/p19 eine deutlich geringere Inzidenz, denn die Herunterregulation von p19 führt nur indirekt zu einem Abbau des p53 Proteins, da p19 für gewöhnlich die proteasomale Degradation des p53 verhindert. Im Gegensatz dazu induziert die sh-p53 einen direkten Abbau der p53 mRNA, was den stärkeren Einfluss auf die Tumorzinzidenz erklärt und die entscheidende Rolle des p53 Verlusts für die Tumorentstehung untermauert.

3.2.2 Inhibition von p53 zusätzlich zu SMAD4, BRCA1 oder p16/p19 ist notwendig für eine zuverlässige Tumorentstehung

Beim humanen PDAC treten oft nach den initialen Mutationen weitere in verschiedenen Tumorsuszeptibilitätsgenen auf, und diese beeinflussen zusammen die Tumorprogression. Daher sollte untersucht werden, ob die additive Herunterregulation von verschiedenen Tumorsuppressorgenen einen Einfluss auf die Tumorentstehung und auf die Metastasierung hat. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, die zeigten, dass eine Interferenz mit dem p53 Signalweg obligatorisch für die Tumorentstehung ist, wurde neben der aktivierenden Kras Mutation (Kras^{G12V}) die sh-p53 eingesetzt und die Auswirkung eines zusätzlichen *knockdowns* von SMAD4, BRCA1 oder p16/p19 analysiert.

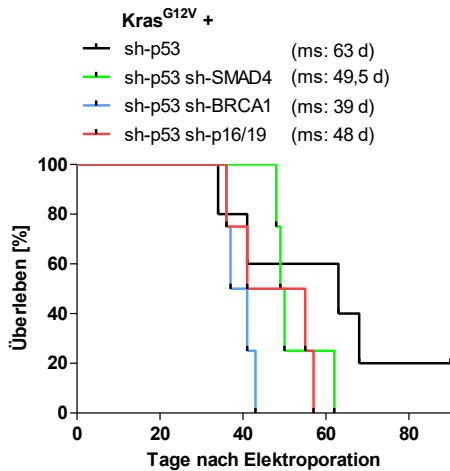


Abbildung 8 – Herunterregulation von SMAD4, BRCA1 oder p16/p19 führt bei gleichzeitiger Expression von onkogenem Kras ($Kras^{G12V}$) und p53 *knockdown* zu einer zuverlässigen Tumorprogression. Bei der Elektroporation der pT-Plasmid Kombinationen wurde zusätzlich ein Plasmid für SB13 verwendet. Es wurde das Überleben nach der Elektroporation über einen Zeitraum von 250 Tagen untersucht. Bei Erreichen eines der in 5.3.7 beschriebenen Abbruchkriterien wurden die Mäuse getötet, Organproben entnommen und die Metastasierung visuell als auch histologisch bewertet. Gruppengröße: n=4. Zum Vergleich wurde die Gruppe pT- $Kras^{G12V}$ pT-shp53 aus 3.2.1. noch einmal aufgeführt (n=5). ms: Mittleres Überleben in Tagen (d).

Die Koelektroporation mit BRCA1 induziert ein isochrones Tumorwachstum in einem Zeitraum von 36 bis 43 Tagen (Abbildung 8). Eine additive Herunterregulation von p16/p19, die ebenfalls auf den p53 Signalweg einwirkt, führt zu einer breit gefächerten Tumorprogression in einem Zeitraum von 36 bis 57 Tagen. Der zusätzliche Einsatz der shRNA gegen SMAD4 führt im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen zu einer langsameren Tumorgenese und resultiert in einem mittleren Überleben von 49,5 Tagen. Bei der histologischen Untersuchung der induzierten Tumore konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (Abbildung 9). Die Kombinationen führen zu Tumoren mit verschiedenen Anteilen an undifferenzierten Strukturen, ADM, Präläsionen in Form von PanINs und Adenokarzinom. Die genannten Strukturen konnten hierbei in allen Tumoren nachgewiesen werden.

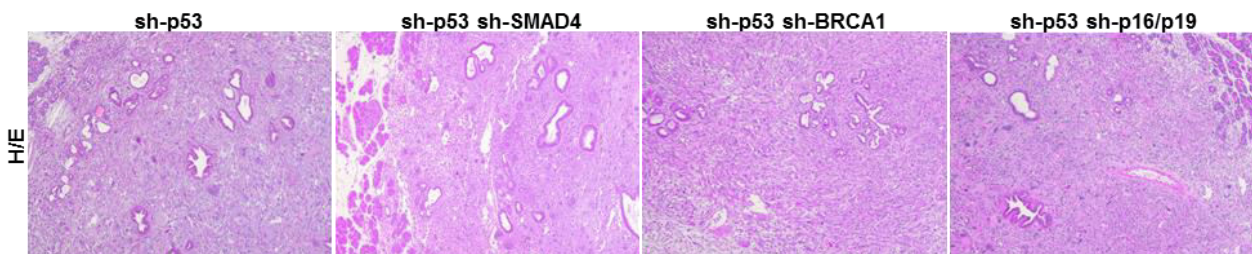


Abbildung 9 – H&E Färbung der mit $Kras^{G12V}$ sh-p53 und sh-SMAD4, sh-BRCA1 oder sh-p16/p19 induzierten Tumore. Die Gewebeproben der Primärtumore wurden nach Färbung mit Hämalaun und Eosin am Mikroskop untersucht. Für die unterschiedlichen Kombinationen sind exemplarische H&E Färbungen gezeigt. Bei allen genetischen Hintergründen können undifferenzierte Strukturen, ADM, PanINs und PDAC beobachtet werden. Vergrößerung 100x.

Die Ergebnisse zeigen, dass zusätzlich zur Expression von $Kras^{G12V}$ und der Herunterregulation von p53 ein weiterer *Gen-knockdown* eines Tumorsuppressorgens notwendig ist um eine hundertprozentige Tumorzinzidenz mit einem isochronen Wachstum in C57BL/6 Mäusen zu induzieren. Die generierten Tumore wiesen hierbei die charakteristischen Strukturen des humanen PDAC auf. Die histologische Untersuchung der Organe ergab, dass bei keiner der analysierten genetischen Aberrationen eine Metastasierung in Leber, Lunge oder in die Peritonealhöhle nachgewiesen werden konnte.

3.2.3. Additiver Tumorsuppressorgen-*knockdown* verstärkt die Tumorprogression, hat aber keinen Einfluss auf die Metastasierung

Mit voranschreitender Progression werden beim humanen Pankreaskarzinom häufig weitere Mutationen akquiriert, so dass in dem ausgewachsenen Tumor meist multiple Mutationen vorliegen. Dies könnte sowohl die Aggressivität, als auch das metastatische Potential des Tumors beeinflussen. Es wurde daher untersucht, ob durch einen umfangreicheren Tumorsuppressorgen-*knockdown* die Metastasierung des Tumors beeinflusst wird und welchen Effekt der *knockdown* auf die Tumorgenese hat.

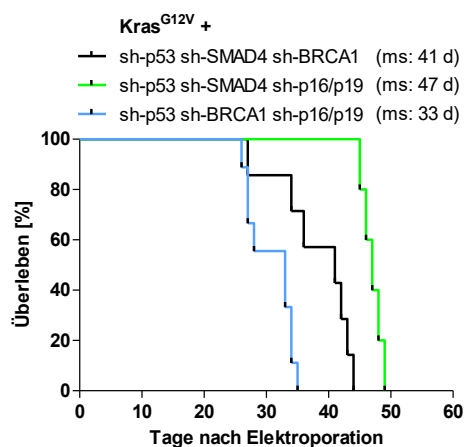


Abbildung 10 – Verstärkte und isochrone Tumorprogression durch additiven Tumorsuppressorgen-*knockdown* mit shRNA gegen p53, SMAD4, BRCA1 und p16/p19 bei gleichzeitiger $Kras^{G12V}$ Überexpression. Es wurde das Überleben bei Kombination von $Kras^{G12V}$ und sh-p53 mit zwei weiteren Plasmiden für shRNA (sh-SMAD4, sh-BRCA1 bzw. sh-p16/p19) untersucht. Nach Elektroporation der Plasmide wurde die Tumorgenese beobachtet und bei Erreichen eines der in 5.3.7 beschriebenen Abbruchkriterien wurden die Mäuse getötet. Gruppengröße: sh-p53 sh-SMAD4 sh-BRCA1 n=6, sh-p53 sh-SMAD4 sh-p16/p19 n=5, sh-p53 sh-BRCA1 sh-p16/p19 n=9. ms: Mittleres Überleben in Tagen (d).

Die zweifache Beeinflussung des p53 Signalwegs über shRNA gegen p53 und p16/p19 führte bei gleichzeitiger Herunterregulation von BRCA1 zu einer Tumorentwicklung zwischen 27 und 34 Tagen (Abbildung 10). Die Verwendung von shRNA gegen p53 und p16/p19 zusammen mit shRNA gegen SMAD4 resultierte in einer vergleichsweise langsameren aber synchronen Tumorformation mit einem mittleren Überleben der Mäuse von 47 Tagen. Die Inhibition von p53, SMAD4 und BRCA1 induzierte eine zeitlich gestreute Tumorgenese in einem Zeitraum von 27 bis 44 Tagen nach Elektroporation. Der umfangreiche Tumorsuppressorgen-*knockdown* führte zu einer schnellen und isochronen Tumorprogression, allerdings konnte bei der Analyse der Organe in den untersuchten Gruppen keine Metastasierung festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass durch den Funktionsverlust mehrerer Tumorsuppressoren zwar ein aggressiveres Wachstum des Tumors induziert wurde, hierdurch jedoch kein Einfluss auf das Metastasierungspotential des Tumors genommen wurde.

3.2.4. Erhöhte Rezidivierungsrate nach Tumorresektion bei einem Funktionsverlust von BRCA1 und p16/p19

In den shRNA Experimenten konnte während der Progression des Primärtumors keine frühe Metastasierung beobachtet werden, trotzdem war es von Interesse, in wie weit die Tumorsuppressorgene die Metastasierung des Tumors beeinflussen. Hierfür war es notwendig, die Zeitspanne für das Wachstum von detektierbaren Metastasen zu verlängern. Das progressive Wachstum des Primärtumors limitiert den Zeitraum für das Auswachsen der Metastasen, da bei

Erreichen einer kritischen Tumorgöße (gemäß der Abbruchkriterien 5.3.7.) die Mäuse getötet werden. Dies hatte zur Folge, dass in den vorherigen Versuchen keine Metastasen in den Organen detektiert wurden. Eine Resektion des Primärtumors ermöglichte zum einen den Zeitraum für eine Progression der Metastasen zu verlängern und zum anderen ergab sich hierdurch die Möglichkeit einen Einfluss der Tumorsuppressorgene auf die lokale Rezidivierung zu untersuchen. Hierfür wurde nachfolgend zur Elektroporation (entsprechend der Gruppen aus 3.2.2.) der entstandene Primärtumor, sobald dieser palpierbar war, wie in Abbildung 2 dargestellt, operativ entfernt. Hierbei variierte der Resektionszeitpunkt in den verschiedenen Gruppen aufgrund der unterschiedlichen Tumorprogression (siehe 3.2.2). Anschließend wurden die resezierten Mäuse regelmäßig palpatorisch untersucht und das Allgemeinbefinden beurteilt und bei Auftreten einer Rezidivierung, Metastasierung oder Verschlechterung des Allgemeinzustands getötet. Es erfolgten histologische Untersuchungen der Leber, Lunge und soweit vorhanden des Rezidivs bzw. des übrigen Pankreasgewebes. Abbildung 11 zeigt das Überleben nach der Resektion sowie die Häufigkeit des Auftretens einer Rezidivierung und Metastasierung. Metastasen in Leber, Lunge oder in die Peritonealhöhle wurden als Fernmetastasen zusammengefasst.

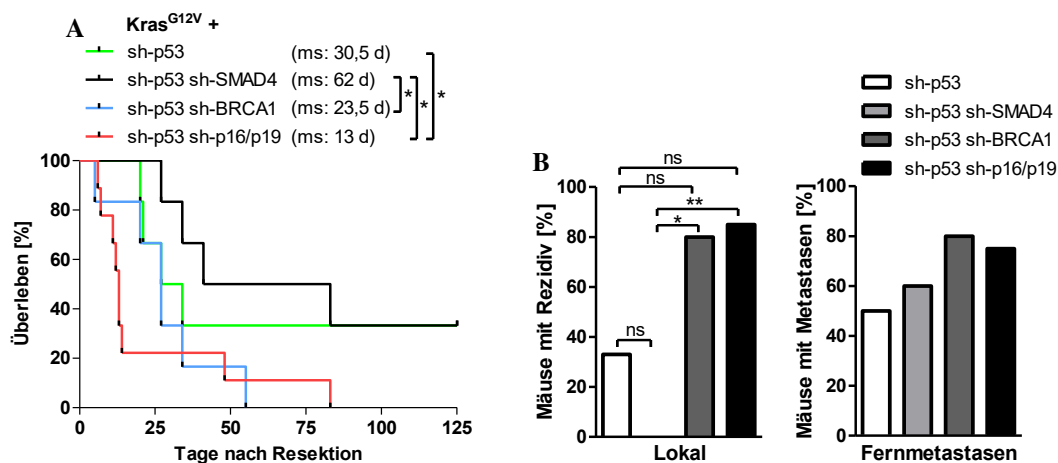


Abbildung 11 – Die erhöhte Lokalrezidivrate nach der Tumorresektion bei einem *knockdown* von BRCA1 oder p16/p19 korreliert mit einem kürzeren Überleben dieser Gruppen. Nach Elektroporation von pT-Kras^{G12V}, pT-shp53 und pT-shSMAD4, pT-shBRCA1 oder pT-shp16/p19 (wie in 3.2.2) wurden die induzierten Tumore reseziert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 250 Tagen nach Resektion das Überleben der Mäuse beobachtet (A). Hierbei wurde der Zeitpunkt erfasst, an dem die Tiere palpatorisch einen Tumor oder ein schlechtes Allgemeinbefinden aufwiesen. Anhand der histologischen Untersuchung der Organe wurde der prozentuale Anteil an Mäusen mit Lokalrezidiv und Fernmetastasen bestimmt (B). Peritonealkarzinose, Lebermetastasen und Lungenmetastasen wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Gruppengröße: sh-p53 n=6; sh-p53 sh-SMAD4 Überleben n=6 Metastasen n=5; sh-p53 sh-BRCA1 Überleben n=6, Metastasen n=5; sh-p53 sh-p16/19 Überleben n=9, Metastasen n=8. ms: Mittleres Überleben in Tagen (d). *p=0,01-0,05

Nach der Tumorresektion konnte in der Gruppe mit Kras^{G12V} + shp53 Tumoren bei zwei von sechs Mäusen ein Langzeitüberleben beobachtet werden (Abbildung 11 A). In dieser Gruppe trat bei 33% der resezierten Mäuse eine Lokalrezidivierung auf (Abbildung 11 B). Bei einer zusätzlichen Suppression von SMAD4 konnte bei keiner der Mäuse eine Lokalrezidivierung nachgewiesen werden. Das mittlere Überleben dieser Gruppe lag bei 62 Tagen und es konnte ein Langzeitüberleben bei 33% der resezierten Mäuse beobachtet werden. Dies entspricht dem Anteil an Mäusen mit

Langzeitüberleben, der bei alleinigen p53 *knockdown* und Kras^{G12V} Expression beobachtet werden konnte. Sowohl die additive Verwendung von pT-shBRCA1 als auch die Verwendung von pT-shp16/p19 führte zu einer deutlich erhöhten Rate an Mäusen mit Lokalrezidiven. Zusätzlich trat bei diesen Gruppen eine tendenziell erhöhte Frequenz von Fernmetastasen auf. Hierbei zeigte sich eine Korrelation der erhöhten Lokalrezidivrate mit dem Überleben der Mäuse. Dieses war nach der Resektion im Vergleich zum alleinigen p53 *knockdown* deutlich verkürzt (Abbildung 11). Außerdem gab es nach der Resektion bei diesen zwei Gruppen keine Mäuse mit Langzeitüberleben. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Resektion des Primärtumors der Zeitraum für ein Auswachsen von Metastasen verlängert wird, hierdurch war es möglich Fernmetastasen histologisch nachzuweisen. Bei der Analyse der Fernmetastasen konnte jedoch kein signifikanter Einfluss durch die Tumorsuppressorgen-*knockdowns* nachgewiesen werden. Allerdings kam es bei der additiven Verwendung der shRNA gegen BRCA1 bzw. p16/p19 zu einer tendenziell erhöhten Frequenz an Fernmetastasen und dies trotz einem vergleichsweise kürzeren Überleben, wodurch der Zeitraum für ein Auswachsen der Metastasen limitiert wurde. Dieses lässt darauf schließen, dass der Verlust dieser Tumorsuppressorgene einen metastasierungsfördernden Einfluss haben könnte. Die Analyse der Lokalrezidivrate zeigt, dass die zusätzliche Herunterregulation von BRCA1 bzw. p16/p19 im Gegensatz zur zusätzlichen Herunterregulation von SMAD4 oder zur alleinigen p53 Suppression zu einem deutlich erhöhten Auftreten von Lokalrezidiven führte. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein Verlust der Tumorsuppressorgene BRCA1 bzw. p16/p19 auch die lokoregionale Migration beeinflusst. Aufgrund der fehlenden Dissemination während der frühen Tumorprogression bei den shRNA Experimenten war es notwendig, den genetischen Hintergrund, der zur Tumorinduktion genutzt wurde, weiter zu variieren, um ein klinisch relevantes Modell zu etablieren, das möglichst die Charakteristiken des humanen PDAC widerspiegelt. Außerdem zeigte sich bei den Versuchen, dass der funktionelle Gen *knockdown* von p53 nicht ausreichte, um in allen Mäusen eine Tumorgenese zu induzieren. Die Herunterregulation von p53 mit shRNA in Wildtypmäusen führte bei Kras^{G12V} Expression nur in 80% der elektroporierten Mäuse zu einer Tumorprogression (Tabelle 2). Im Gegensatz dazu führte die gezielte p53-Deletion zu einer zuverlässigen Tumorprogression. Hier konnte durch die Cre induzierte p53-Deletion in p53fl/fl Mäusen und bei Kras^{G12V} Expression in allen elektroporierten Mäusen ein Tumor induziert werden (Tabelle 1, 3.1.1). Daher wurde für die weiteren Versuche erneut auf die p53fl/fl Maus zurückgegriffen.

3.3. Untersuchungen zum Einfluss von p53-Mutationen auf die Metastasierung

Bei humanen Tumoren zählt das p53 Gen zu den am häufigsten veränderten Genen und mit dem humanen Pankreaskarzinom sind sowohl p53-Deletionen als auch Mutationen assoziiert. Ein oft beschriebener Genotyp beinhaltet eine heterogene Veränderung von p53. Hierbei liegt ein p53 Allel deletiert und das zweite Allel mutiert vor. Aufgrund der vielseitigen regulatorischen Eigenschaften von p53 sollte der Einfluss der p53 Aberrationen auf die Tumorprogression und die Metastasierung im

Elektroporationsmodell untersucht werden. Für die Darstellung des heterogenen Genotyps wurden drei unterschiedliche p53 Mutanten im Pankreas exprimiert und gleichzeitig p53 in p53fl/fl Mäusen Cre Rekombinase-vermittelt deletiert.

3.3.1. Einfluss der p53-Mutationen auf die Tumorprogression

Die meisten tumorassoziierten Veränderungen von p53 sind *Missense*-Mutationen. Diese sind gehäuft im Exon 4-9 lokalisiert und betreffen die DNA Bindungsdomäne (Muller and Vousden, 2014). Das hierdurch in der Transkriptionsfunktion beeinträchtigte p53 akkumuliert meist in den Zellen. Das mutierte p53 Protein hat einerseits die tumorsuppressiven Eigenschaften des unveränderten p53 verloren, andererseits wurden ihm zusätzliche tumorunterstützende Funktionen nachgewiesen (Muller et al., 2011). Diese als *gain-of-function* beschriebenen Eigenschaften des mutierten p53 fördern die maligne Progression und beeinflussen hierbei die Migration, Invasion und die Metastasierung des Tumors (Pohl et al., 1988). Für die Untersuchung des Einfluss von mutiertem p53 auf die Tumorprogression und die Metastasierung wurden im Elektroporationsmodell drei Plasmide zur Expression der Mutanten p53-129 (K129E), p53-172 (R172H) und p53-246 (R246S) genutzt. Hierbei entsprechen die Mutationen p53-172 und p53-246 den häufig auftretenden humanen p53-Mutanten p53-175 (R175H) und p53-249 (R249S), diese liegen in der DNA Bindungsdomäne von p53. Bei der Mutante p53-129 liegt ein Austausch von Lysin zu Glutamat vor, es wurde gezeigt, dass diese Mutation eine Antwort zytotoxischer T Zellen hervorruft (Bertholet et al., 1997), und es sollte hier untersucht werden, ob dies Auswirkungen auf die Tumorprogression hat. Für die Experimente wurden pT3-basierte Plasmide verwendet, die für die unterschiedlichen Mutationen codieren. Zusätzlich wurde mit der Cre Rekombinase eine p53-Deletion und mithilfe des pT-Kras^{G12V} Plasmids eine Kras^{G12V} Expression induziert. Die SB13 Transposase vermittelte die genomische Integration der pT Plasmide (Abbildung 12A).

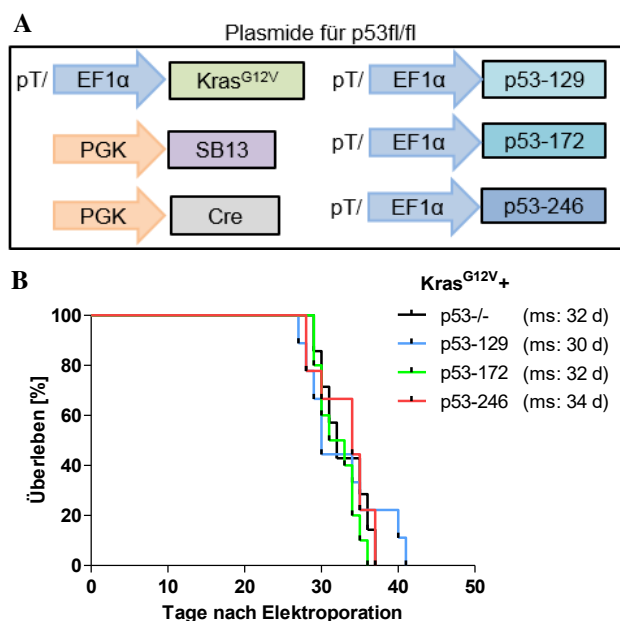


Abbildung 12 – Die p53-Mutationen K129E, R172H und R246S haben keinen Einfluss auf die Tumorprogression. (A) Überblick der zur Elektroporation verwendeten Plasmide. (B) Überleben nach Elektroporation von pT-p53-129, pT-p53-172 oder pT-p53-246 zusammen mit pT-Kras^{G12V} und SB13 zur stabilen Integration. Bei einer Gruppe wurde keine p53-Mutante exprimiert. Zusätzlich wurde bei allen Gruppen eine Cre Rekombinase zur Induktion einer p53-Deletion in der p53fl/fl Maus verwendet. Die Mäuse wurden getötet, sobald eines der beschriebenen Abbruchkriterien erfüllt war (siehe 5.3.7.), hierbei wurde das Tumorstadium und eine mögliche Metastasierung bewertet. Gruppengröße: p53^{-/-} n=7, p53-129 n=9, p53-172 n=10, p53-246 n=9. ms: Mittleres Überleben in Tagen (d).

Eine zusätzliche Expression der p53-Mutanten hatte keinen additiven Effekt auf die Tumorprogression im Vergleich zum alleinigen p53 *knockout* mit Kras^{G12V} Überexpression (Abbildung 12 B). In allen Gruppen konnte ein isochrones Tumorwachstum mit einem mittleren Überleben von circa 32 Tagen beobachtet werden. Anhand der histologischen Untersuchung der Organe (Leber und Lunge) konnte in keiner der Gruppen eine Metastasierung des Primärtumors festgestellt werden. Trotz der für mutiertes p53 beschriebenen *gain-of-function*, die sowohl die Tumorprogression als auch die Metastasierung fördern soll, konnte durch die Expression der p53-Mutanten im Elektroporationsmodell weder ein Einfluss auf das invasive Wachstum des Tumors noch auf die Metastasierung nachgewiesen werden.

3.3.2. Palliative Gemcitabinetherapie bei mutiertem p53

Aufgrund der p53-vermittelten Regulation des Zellüberlebens und der DNA Reparatur wurde mutiertem p53 neben den migrations-, invasions- und metastasierungsfördernden Eigenschaften auch ein Einfluss auf die Medikamentenresistenz nachgewiesen (Blandino et al., 1999; Chang and Lai, 2001; He et al., 2017). Daher sollte untersucht werden, in wie weit die p53-Mutationen eine Gemcitabineresistenz beeinflussen. Das Zytostatikum Gemcitabine wird als Standardtherapeutikum bei einem PDAC eingesetzt und als Pyrimidinanalogon führt Gemcitabine nach Einbau in die DNA zum Abbruch der DNA Synthese und zum Zelltod. Zur Beantwortung der Fragestellung eines möglichen Einflusses einer p53-Mutation auf den therapeutischen Effekt einer Chemotherapie mit Gemcitabine wurde zuerst ein palliativer Ansatz gewählt. Dies ermöglichte die Analyse der therapeutischen Wirkung des Chemotherapeutikums auf den Primärtumor. Hierzu wurden, wie in 3.3.1. beschrieben, Kras^{G12V} exprimierende Tumore induziert, die entweder einen alleinigen p53 *knockout* oder zusätzlich zu diesem eine p53-Mutation aufwiesen. Nach der Elektroporation wurde die Tumorgenese kontrolliert und bei positivem Tumorbefund, in der Regel nach drei bis vier Wochen, wurde die Gemcitabinetherapie begonnen. Hierfür wurde einmal wöchentlich Gemcitabine, wie in Material und Methoden 5.3.4. beschrieben, verabreicht. Sobald der Tumor eine kritische Masse erreicht hatte oder das Allgemeinbefinden beeinträchtigt war (siehe Abbruchkriterien 5.3.7.), wurde die Maus getötet und die Metastasierung in Peritonealraum, Leber und Lunge untersucht.

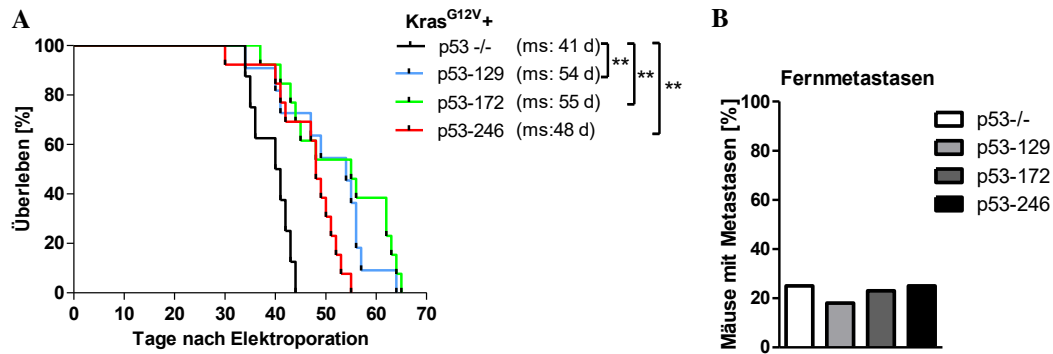


Abbildung 13 – Mutation von p53 führt zu besserem therapeutischen Effekt der palliativen Gemcitabintherapie. Nach Induktion der Tumore in der p53fl/fl Maus, wo eine p53-Deletion durch Cre Rekombinase und eine SB13 vermittelte stabile Expression von $Kras^{G12V}$ allein bzw. zusammen mit p53-129, p53-172 oder p53-246 hervorgerufen wurde, erfolgte eine palliative Therapie mit Gemcitabine. Hierzu wurde nach positivem Tumorbefund einmal wöchentlich Gemcitabine (100 $\mu\text{g}/\text{g}$ Maus) i.p. verabreicht. Die Zeitpunkt des Todes (gemäß Abbruchkriterien 5.3.7.) wurde erfasst und der Primärtumor sowie Leber und Lunge zur histologischen Analyse entnommen. **(A)** zeigt das Überleben der Mäuse unter Gemcitabintherapie. **(B)** Metastasen in Peritonealhöhle, Leber und Lunge wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Gruppengröße: p53^{-/-} n=8; p53-129 n=11; p53-172 n=13, p53-246 Überleben n=13, Metastasierung n=12. ms: Mittleres Überleben in Tagen (d). ** p=0,001-0,01

Die unbehandelten Gruppen aus 3.3.1 hatten im Schnitt ein mittleres Überleben von 32 Tagen, die palliative Therapie führte in allen Gruppen zu einem deutlich längeren Überleben. Hierdurch war in diesem Experiment ein Wachstum von nachweisbaren Metastasen möglich. Bei allen Gruppen gab es eine vergleichbare Metastasierung mit einer Frequenz von circa 20%. Mit einer vorhandenen p53-Mutation konnte bei der palliativen Therapie im Vergleich zur alleinigen p53-Deletion ein deutlich verlängertes Überleben beobachtet werden (Abbildung 13). Hierbei zeigte sich bei der p53-172 Mutation der tendenziell beste therapeutische Effekt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine vorliegende p53-Mutation im Elektroporationsmodell den Erfolg der Gemcitabintherapie entgegen der Annahme positiv beeinflusst und so in einem verlängerten Überleben resultiert.

3.3.3. Untersuchungen zur Rezidivierung und Metastasierung nach Resektion bei vorliegender p53-Mutation im Tumor

In den vorherigen Experimenten konnten den p53-Mutationen keine Tumorprogression-begünstigenden Eigenschaften in Bezug auf die Primärtumorentwicklung nachgewiesen werden. Da eine ebenfalls bekannte und häufig untersuchte *gain-of-function* des mutierten p53 in der Förderung der Migration und Metastasierung der Tumorzellen liegt (Morton et al., 2010; Muller et al., 2011), sollte dies im Hinblick auf eine Tumorprogression nach der Resektion des Primärtumors untersucht werden. Hierbei kann zum einen der Einfluss auf die Metastasierung weiter analysiert werden, da zwar im ersten Versuch (3.3.1) keine frühe Metastasierung in die Organe festgestellt werden konnte, hier jedoch durch die Tumorresektion der Zeitraum für das Wachstum von detektierbaren Metastasen verlängert wird. Zum anderen kann der Einfluss des mutierten p53 auf den Resektions-vermittelten Therapieerfolg untersucht werden. Hierzu wurde auch die Lokalrezidivierungsrate, die häufig ein Problem nach der Resektion darstellt und das Überleben maßgeblich limitiert, analysiert.

Die im Pankreas durch Elektroporation induzierten Tumore mit p53-Mutation oder p53-Deletion (siehe 3.3.1.) wurden 21 Tage nach der Elektroporation reseziert. Zu diesem Zeitpunkt war ein Tumor mit einem ungefähren Durchmesser von 30 mm palpatorisch nachweisbar. Anschließend wurde das Überleben der Mäuse analysiert und eine mögliche Lokalrezidivierung bzw. Fernmetastasierung untersucht.

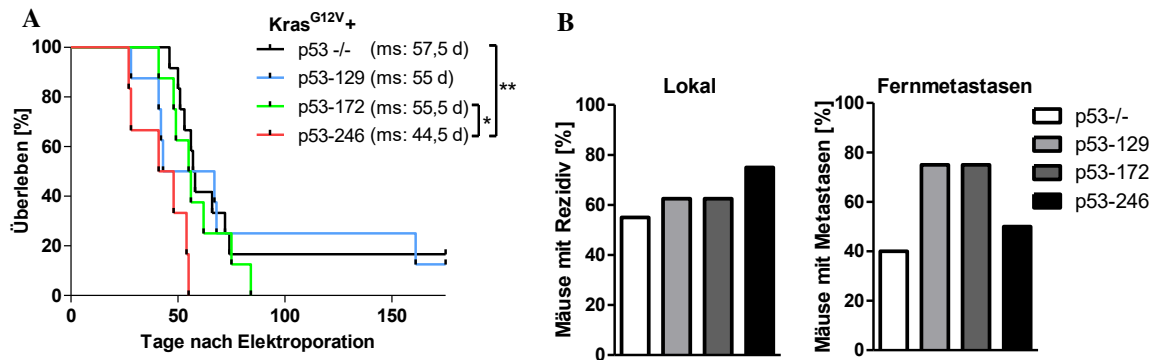


Abbildung 14 – Die p53-Mutation 246 verringert den therapeutischen Erfolg der R0-Resektion. Die Tumore wurden wie in 3.3.1. beschrieben (p53-Deletion, Expression von $Kras^{G12V}$ und Expression einer p53 Mutante (129/172/246)) induziert, eine Gruppe blieb ohne p53-Mutation. Die Tumore wurden 21 Tage nach der Elektroporation wie in 3.1.1 beschrieben operativ entfernt. Das Vorliegen eines Tumors im Resektat wurde histologisch bestätigt. Im Anschluss wurde das Überleben der resezierten Mäuse (A) sowie die Lokalrezidivierung und Metastasierung (B) analysiert. Metastasen in Leber, Lunge und Peritonealhöhle wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Gruppengröße: p53^{-/-} n=12; p53-129 n=8; p53-172 n=8, p53-246 n=6. ms: Mittleres Überleben in Tagen (d). *p=0,01-0,05 **p=0,001-0,01

Der beste Therapieerfolg durch die Tumoresektion konnte bei den Mäusen mit p53-Deletion (p53^{-/-}) beobachtet werden (Abbildung 14). Hier gab es mit 16,6% die höchste Rate an Mäusen mit Langzeitüberleben und mit 57,5 Tagen das längste mittlere Überleben. Dies steht im Einklang mit der niedrigsten Lokalrezidiv- und Metastasierungsrate im Vergleich zu den Gruppen mit p53-Mutation. Die Mutationen p53-129 und p53-172 hatten nach der Resektion ein vergleichbares mittleres Überleben von ca. 55 Tagen. Zudem führten beide Mutationen zu einem hohen prozentualen Anteil von Mäusen mit Fernmetastasen (75%). Bei einer der acht resezierten Mäuse mit vorliegender p53-129 Mutation konnte nach der Tumoresektion ein Langzeitüberleben beobachtet werden. Der stärkste Einfluss konnte der p53-246 Mutation nachgewiesen werden. Die Mutation p53-246 führte zu einer hohen Lokalrezidivrate und resultierte sowohl im Vergleich zur p53-Deletion als auch im Vergleich zu den anderen p53-Mutanten in einem kürzeren Überleben der Mäuse. Die relativ geringe Fernmetastasierungsrate von 50% kann durch das kurze Überleben erklärt werden, da hierdurch der Zeitraum für das Auswachsen der Metastasen begrenzt wurde. Ein Vergleich mit den unresezierten, tumortragenden Mäusen aus 3.3.1 (Abbildung 12), die ein mittleres Überleben von 34 Tagen hatten, zeigt, dass die operative Tumorentfernung bei der p53-246 Mutante (mittleres Überleben 44,5 Tage) nur einen geringen Überlebensvorteil bietet. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die p53-Mutationen die Migration und Metastasierung beeinflussen und hierdurch den therapeutischen Erfolg der Resektion limitieren. Bei vorliegender p53-Mutation war die Lokalrezidivrate und z.T. die Fernmetastasierungsrate erhöht, was einen negativen Einfluss auf das Überleben der Mäuse mit p53-

Mutation zur Folge hatte. Hierbei fiel besonders der negative Einfluss einer p53-246 Mutation auf den therapeutischen Effekt der Resektion auf.

3.3.4. Therapeutische Effekte der adjuvanten Gemcitabinetherapie in Abhängigkeit des p53 Status

Die vorherigen Versuche zeigten einerseits einen positiven Einfluss der p53-Mutationen auf die Wirksamkeit einer palliativen Gemcitabinetherapie im Elektroporationsmodell, andererseits konnte ein negativer Einfluss auf das Überleben nach der Tumorsektion bedingt durch eine erhöhte Lokalrezidivierung und Metastasierung festgestellt werden. Die adjuvante Gemcitabinetherapie zählt derzeit beim humanen PDAC zur Standardtherapie und stellt die einzig potentiell kurative Therapie dar. Daher sollte im Elektroporationsmodell untersucht werden, in wie weit der therapeutische Erfolg einer adjuvanten Gemcitabinetherapie durch mutiertes p53 beeinflusst wird. Hierzu wurden Tumore mit unterschiedlichem p53 Status (p53^{-/-}, p53-129, p53-172, p53-246, s.3.3.1.) induziert und 21 Tage nach der Elektroporation reseziert. Nachfolgend zur Resektion wurde einmal wöchentlich Gemcitabine verabreicht. Abbildung 15 A zeigt das Schema der adjuvanten Gemcitabinetherapie. Es wurde das Überleben analysiert und die Rezidivierung sowie die Metastasierung untersucht.

Eine Gemcitabinebehandlung nach der Resektion führte bei den Mutanten p53-129 und p53-172 zu einer Verlängerung des Überlebens von 55 Tagen (Abschnitt 3.3.3. Abbildung 14) auf 83 bzw. 69 Tage (Abbildung 15 B). Dies entspricht dem therapeutischen Effekt der bei der adjuvanten Gemcitabinegabe bei alleiniger p53-Deletion beobachtet werden konnte. Hier führte die Therapie zu einer Verlängerung des mittleren Überlebens nach der Resektion von 57,5 (Abschnitt 3.3.3. Abbildung 14) auf 72,5 Tage (Abbildung 15 B). Allerdings konnte bei der p53^{-/-} Gruppe eine erhöhte Anzahl an Mäusen mit Langzeitüberleben nach adjuvanter Gemcitabinegabe beobachtet werden. Die adjuvante Gemcitabinetherapie resultierte in einem Anstieg der Mäuse mit Langzeitüberleben von 16,6 % (Abschnitt 3.3.3.) auf 33 %. Hierbei gehen die therapeutischen Effekte auf das Überleben einher mit einer deutlich reduzierten Rate an Lokalrezidiven (Abbildung 15 C). Auch bei der p53-172 Mutation konnte mit 28% eine verringerte Frequenz an Mäusen mit Lokalrezidiven beobachtet werden. Dies spiegelt sich ebenfalls im Überleben wider, da bei zwei Mäusen dieser Gruppe ein deutlich verlängertes Überleben (über 150 Tage) festgestellt werden konnte. Trotz des therapeutischen Effekts auf das mittlere Überleben bei p53-129 gab es bei diesen Mäusen eine hohe Lokalrezidivrate. Bei der Mutation p53-246 konnte der adjuvanten Gemcitabinegabe kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden. Dies wird beim Vergleich des mittleren Überlebens deutlich. Dieses lag bei adjuvanter Gemcitabinegabe bei 44,5 Tagen (Abbildung 15 B) und bei den nach Resektion unbehandelten Mäusen bei 44 Tagen (Abbildung 14). Hierdurch ergibt sich auch in Relation zu den anderen Gemcitabine-behandelten Gruppen ein deutlich kürzeres Überleben, welches mit einer hohen Rate an Lokalrezidiven korreliert. Es ist davon auszugehen, dass die Rezidive in dieser Gruppe schneller wuchsen als in der Gruppe mit p53-129 Mutation, da hier trotz einer hohen Lokalrezidivrate ein

therapeutischer Effekt auf das Überleben nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte in dem Experiment beobachtet werden, dass bei den zwei Gruppen, die eine geringe Lokalrezidivrate aufwiesen (p53^{-/-} und p53-172) gleichzeitig eine erhöhte Frequenz an Fernmetastasen zu finden war (Abbildung 15 C). Die Ergebnisse zeigen, dass die p53-246 Mutation im Elektroporationsmodell zu einem kompletten Verlust der therapeutischen Effekte einer adjuvanten Gemcitabinetherapie führt und der deutlichste Therapieerfolg bei einer alleinigen p53-Deletion beobachtet werden konnte.

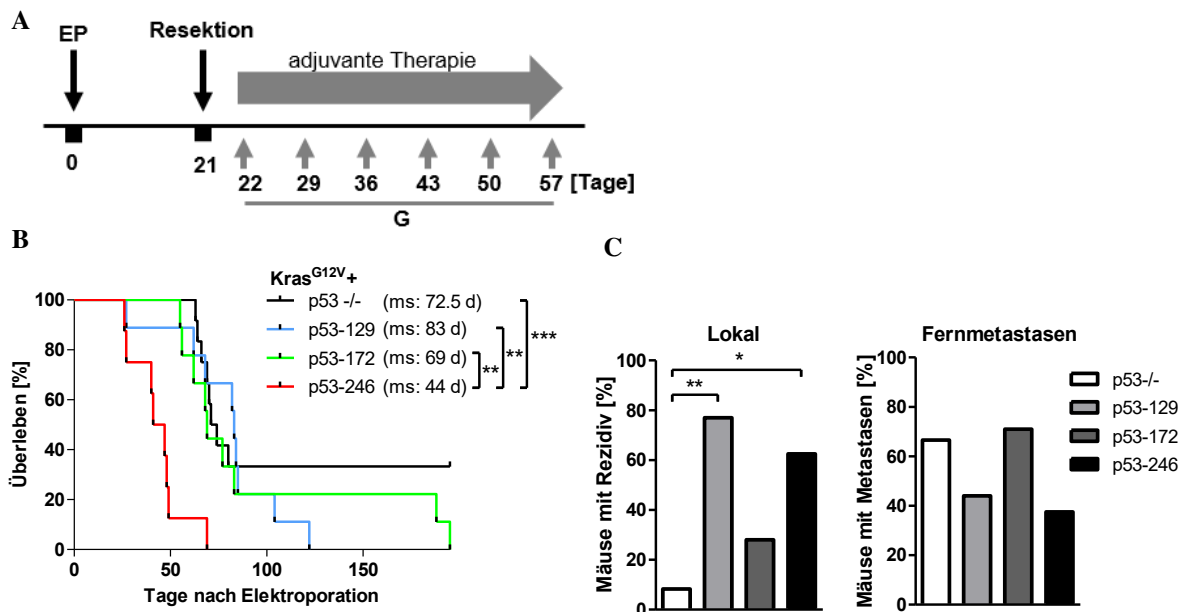


Abbildung 15 – Die Mutation von p53 an Position 246 reduziert den therapeutischen Effekt einer adjuvanten Gemcitabinetherapie. Die Tumore wurden durch Elektroporation von pT-Kras^{G12V} mit pT-p53-129, pT-p53-172, pT-p53-246 oder ohne p53-Mutation, einer Cre Rekombinase zur p53-Deletion und SB13 zur stabilen Integration der pT Plasmide induziert. 21 Tage nach der Elektroporation wurde der Pankreastumor operativ entfernt, und die Mäuse wurden nachfolgend zur Resektion einmal wöchentlich durch intraperitoneale Gemcitabine-Gabe behandelt. Es wurden die Auswirkungen der Therapie auf das Überleben sowie der Lokalrezidivierung und Metastasierung untersucht. **(A)** Behandlungsschema der adjuvanten Gemcitabinetherapie. **(B)** Überlebensanalyse der therapierten Gruppen. **(C)** Prozentualer Anteil der Mäuse mit Lokalrezidivierung und Metastasierung. Als Fernmetastasen wurden Leber- und Lungenmetastasen sowie Peritonealkarzinosen zusammengefasst. Gruppengröße: p53^{-/-} n=12; p53-129 n=9; p53-172 Überleben n=9 Metastasierung n=7, p53-246 n=8. ms: Mittleres Überleben in Tagen (d). *p=0,01-0,05 **p=0,001-0,01

Anhand von *in vitro* Experimenten sollte der zytotoxische Effekt von Gemcitabine auf die Tumorzellen bei variierendem p53 Status untersucht werden. Hierdurch ist es möglich, die direkte Wirkung auf die Tumorzellen getrennt von den *in vivo* vorliegenden Gemcitabine-induzierten Effekten auf das Tumormikromilieu zu betrachten. Dafür wurden die mit Kras^{G12V} Expression, Cre-induzierter p53-Deletion und p53-129 bzw. p53-172 bzw. p53-246 bzw. ohne p53-Mutante in der p53^{fl/fl} Maus induzierten Pankreastumore isoliert und anschließend kultiviert (siehe Material und Methoden 5.2.1.). Mittels PCR wurde der genetische Status der Tumorzellen verifiziert.

Zur Analyse des zytotoxischen Effekts wurden von den kultivierten Tumorzellen 1x10⁵ Zellen pro *well* ausgesät und nach 24 Stunden wurde Gemcitabine in unterschiedlichen Endkonzentrationen zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Bei den Tumorzellen mit p53-172 Mutation konnte bereits bei 0,025 µM Gemcitabine ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden (Abbildung 16 A). Ein geringerer Effekt konnte bei den Zellen mit p53-Deletion

festgestellt werden, hier führte eine Gemcitabinekonzentration von 0,1 μM zu einer verringerten Zelldichte. Deutlich resistenter waren die Tumorzellen die die p53-129 und p53-246 Mutation aufwiesen. Hier führte erst eine Konzentration von 0,5 μM zu einer Reduktion der Zelldichte.

In einem zweiten Ansatz sollte der Einfluss der p53-Mutationen auf die Zellproliferation in einem Gemcitabine-haltigen Milieu zur Analyse der zytostatischen Gemcitabineeffekte untersucht werden. Hierzu wurden 3×10^4 Zellen pro *well* ausgesät und direkt bei der Aussaat mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gemcitabine versetzt. Nach 72 Stunden wurde zur Darstellung der lebenden Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Bei 0,01 μM Gemcitabine konnte eine deutlich verringerte Zellzahl bei den Tumorzellen mit p53-172 Mutation beobachtet werden. Auch bei der Proliferation zeigt sich eine geringere Sensitivität bei der p53-129 und p53-246 Mutante. Ein deutlich reduzierter Zellrasen konnte für p53-129 bei 0,03 μM bzw. für p53-246 bei 0,04 μM festgestellt werden. Eine Gemcitabinekonzentration von 0,02 μM führte bei den p53-deletierten Tumorzellen zu einer Reduktion im Zellrasen. Die Kristallviolettfärbung verdeutlicht, dass Gemcitabine bereits in geringen Dosen einen zytostatischen Effekt hat und so die Proliferation hemmt. Sowohl bei der Analyse der zytotoxischen als auch der zytostatischen Wirkung von Gemcitabine konnte bei den p53-Mutationen p53-129 und p53-246 eine höhere Resistenz nachgewiesen werden.

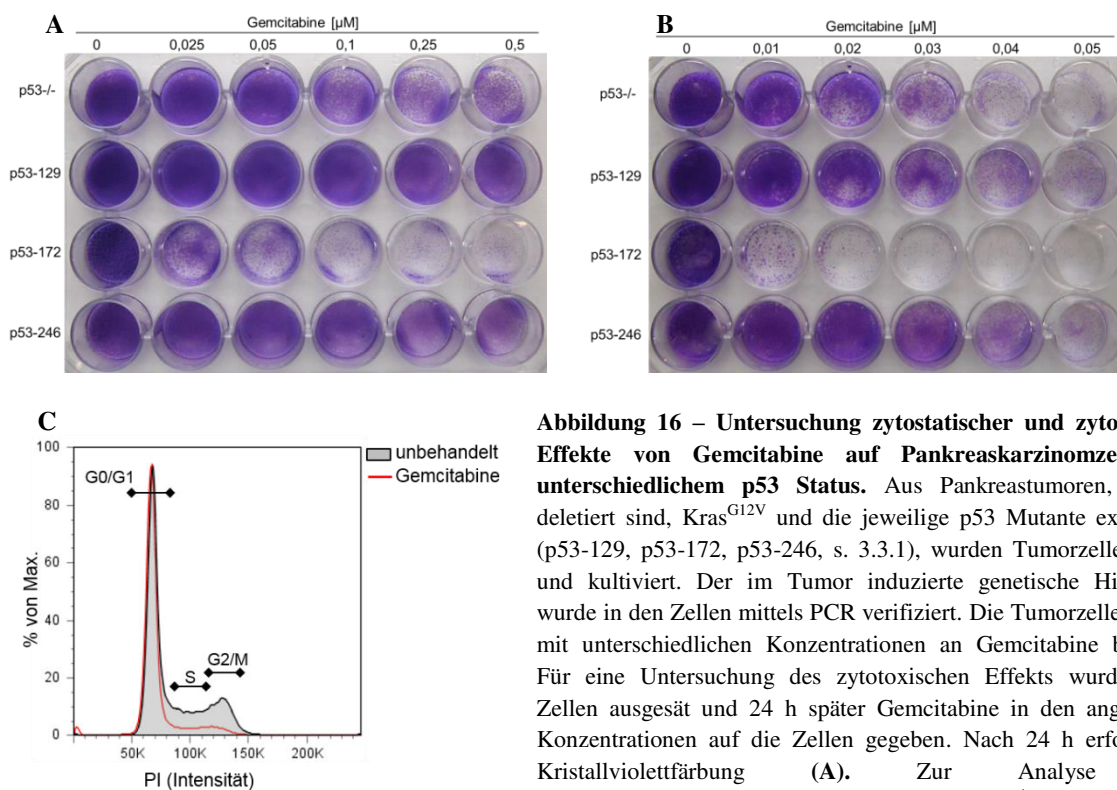


Abbildung 16 – Untersuchung zytostatischer und zytotoxischer Effekte von Gemcitabine auf Pankreaskarzinomzellen mit unterschiedlichem p53 Status. Aus Pankreastumoren, die p53 deletiert sind, Kras^{G12V} und die jeweilige p53 Mutante exprimieren (p53-129, p53-172, p53-246, s. 3.3.1), wurden Tumorzellen isoliert und kultiviert. Der im Tumor induzierte genetische Hintergrund wurde in den Zellen mittels PCR verifiziert. Die Tumorzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Gemcitabine behandelt. Für eine Untersuchung des zytotoxischen Effekts wurden 1×10^5 Zellen ausgesät und 24 h später Gemcitabine in den angegebenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte eine Kristallviolettfärbung (A). Zur Analyse eines proliferationshemmenden Effektes wurden 3×10^4 Zellen zusammen

mit der angegebenen Dosis von Gemcitabine ausgesät und nach 72 h mit Kristallviolett gefärbt (B). (C) Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse mittels Propidiumiodid Färbung. Nach der Aussaat der Zellen wurden diese mit 0,5 μM Gemcitabine behandelt. Es wurden zudem Zellen unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden nach 24 h abgelöst, mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Um den Einfluss von Gemcitabine auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden die Tumorzellen in einer 6 cm-Schale ausgesät und mit 0,5 μM Gemcitabine behandelt. Als Kontrolle wurden

unbehandelte Zellen verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen abgelöst und für eine durchflusszytometrische Analyse mit Propidiumiodid gefärbt (siehe Material und Methoden 5.4.5.). Abbildung 16 C zeigt exemplarisch das Histogramm der Zellzyklusanalyse. Hierbei wurde die Intensität des Propidiumiodidsignals linear aufgetragen. Die Inkubation mit Gemcitabine führt *in vitro* zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase, wodurch nur ein geringer Anteil an Zellen in der S und G2/M Phase zu finden sind.

Die Experimente verdeutlichen, dass der p53 Status der Tumorzellen die Wirkung einer Gemcitabinetherapie beeinflusst. Im palliativen Ansatz konnte durch die Gemcitabinetherapie die Tumorprogression verlangsamt und hierdurch der Überlebenszeitraum der Mäuse verlängert werden. Hierbei konnte bei den Tumoren mit p53-Mutation ein besserer therapeutischer Effekt im Vergleich zur alleinigen p53-Deletion beobachtet werden. Währenddessen zeigen die *in vitro* Experimente, dass die p53-Mutationen p53-129 und p53-246 gegenüber der Gemcitabineeffekte resistenter waren als p53^{-/-} und p53-172. Bei der adjuvanten Gemcitabinetherapie konnte bei der p53-246 Mutation kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden und dies spiegelt sich auch in den *in vitro* Daten wider. Hier ist die p53-246 Tumorzelllinie sowohl im Proliferations- als auch im Zytotoxizitätsassay am resistentesten gegenüber der Gemcitabinewirkung. Dies zeigt, dass neben den direkten Effekten von Gemcitabine auf die Tumorzellen auch das Tumormikromilieu für den therapeutischen Erfolg von entscheidender Bedeutung ist und vor allem die Gemcitabinewirkung auf den Primärtumor beeinflusst. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die p53-Mutationen sowohl die Lokalrezidivierung als auch die Fernmetastasierung nach der Resektion des Primärtumors beeinflussen, aber weder die Progression des Primärtumors fördern noch einen Einfluss auf die frühe Metastasierung haben.

3.4. Expression von konstitutiv-aktivem Akt2 führt zu starker Metastasierung

Für die Induktion des Pankreaskarzinoms im Elektroporationsmodell sollte eine Onkogenkombination gefunden werden, bei der das Pankreaskarzinom einerseits die morphologischen Charakteristika des humanen PDAC aufweist und andererseits bereits in einem frühen Stadium der Tumorprogression metastasiert. Daher war es notwendig, die bisher zur Tumorinduktion verwendeten genetischen Aberrationen weiter zu variieren. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde die p53^{fl/fl} Maus verwendet, bei der lokal durch Elektroporation eines Plasmids für Cre Rekombinase eine p53-Deletion hervorgerufen werden kann. Zudem wurde wie in 3.1.1. ein pT Plasmid für die Überexpression von Kras^{G12V} verwendet. Die Tumore, die mit diesem Ansatz induziert wurden, spiegelten bereits die morphologischen Charakteristika des humanen PDAC wider, allerdings mangelte es bei diesem Ansatz an einer nachweislichen Disseminierung während der Tumorprogression. Auch die Herunterregulation von weiteren Tumorsuppressorgenen, die bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms häufig alteriert sind, mithilfe von shRNA oder der Einsatz von mutiertem p53 konnte keine signifikant frühere Metastasierung auslösen.

Der PI3K Signalweg ist für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung. Ein wichtiger Mediator dieses Signalwegs ist Akt2, der durch seine regulatorische, antiapoptotische Wirkung sowohl das Zellüberleben als auch das Zellwachstum beeinflusst. Außerdem konnte für Akt2 eine entscheidende Rolle für die Metastasierung nachgewiesen werden (Rychahou et al., 2008). Eine Akt2 Amplifikation tritt in 10-20% der PDAC Patienten auf und korreliert mit einem invasivem und metastasierenden Wachstum (Ruggeri et al., 1998). Aufgrund dieser beschriebenen, tumorfördernden Eigenschaften sollte untersucht werden, ob die Expression von Akt2 einen Einfluss auf die Invasivität und das metastatische Potential des Pankreaskarzinoms im Mausmodell hat.

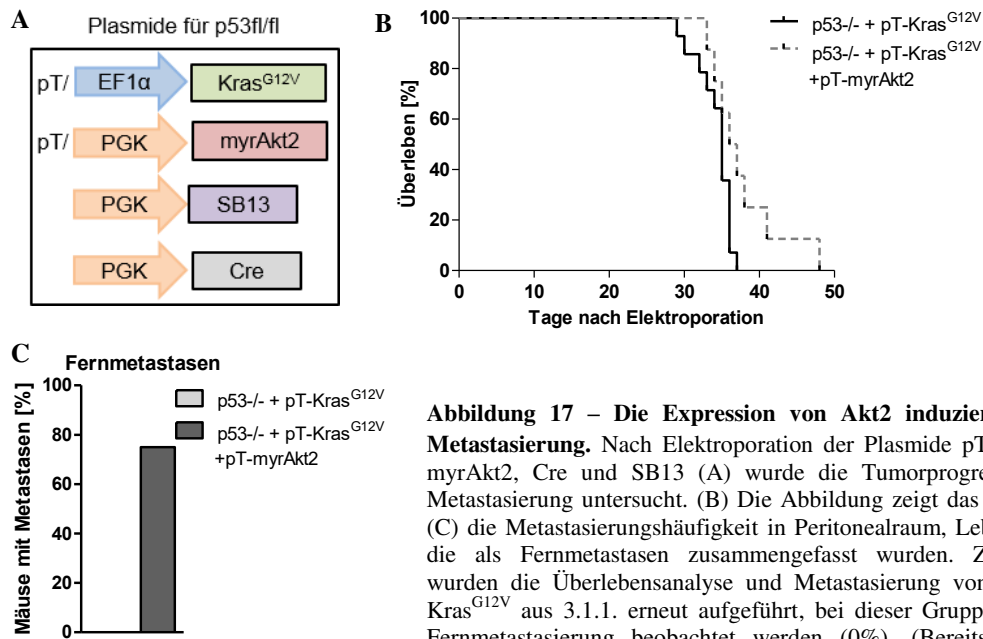


Abbildung 17 – Die Expression von Akt2 induziert eine starke Metastasierung. Nach Elektroporation der Plasmide pT-Kras^{G12V}, pT-myrAkt2, Cre und SB13 (A) wurde die Tumorprogression und die Metastasierung untersucht. (B) Die Abbildung zeigt das Überleben und (C) die Metastasierungshäufigkeit in Peritonealraum, Leber und Lunge, die als Fernmetastasen zusammengefasst wurden. Zum Vergleich wurden die Überlebensanalyse und Metastasierung von p53-/- + pT-Kras^{G12V} aus 3.1.1. erneut aufgeführt, bei dieser Gruppe konnte keine Fernmetastasierung beobachtet werden (0%). (Bereits publiziert in (Gürlevik et al. 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Plasmid Kombinationen für p53 fl/fl Maus	Langzeit Überleben	Mäuse mit Tumor	Inzidenz	Fernmetastasen	Mittleres Überleben [Tage]
pT-Kras ^{G12V} + Cre	0 %	14/14	100%	0 %	35
pT-Kras ^{G12V} + pT-myrAkt2 + Cre	0 %	8/8	100 %	75 %	36,5
pT-myrAkt2+ Cre	100 %	0/5	0 %	-	-
pT-myrAkt2	100%	0/5	0 %	-	-

Tabelle 3 – Überleben, Inzidenz und Metastasierung bei zusätzlicher Verwendung von myrAkt2. Nach Elektroporation der aufgeführten Plasmide wurden die Tumorentstehung, Metastasierung und das Überleben der Mäuse untersucht. Metastasen in Leber, Lunge und Peritonealraum wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Die Gruppe mit durch p53-Deletion und Kras^{G12V} Expression induzierten Tumore aus 3.1.1 wurde zum Vergleich erneut aufgeführt.

Für die Tumorinduktion wurde ein Plasmid für myristoyliertes Akt2, das konstitutiv aktiv ist, verwendet (Abbildung 17 A). Die zusätzliche Expression von konstitutiv aktivem Akt2 führt zu einer starken Metastasierung in der frühen Tumorprogressionsphase (Abbildung 17 C). Ein Vergleich mit p53fl/fl+pT-Kras^{G12V} (Abbildung 17 B) zeigt nur einen geringen Unterschied im Überlebenszeitraum der Mäuse, obwohl bei dieser Gruppe keine Fernmetastasierung festgestellt werden konnte. Die

Verwendung von myrAkt2 allein oder in Kombination mit einer p53-Deletion führt wiederum zu keiner Tumorentstehung (Tabelle 3) und verdeutlicht das Akt2 allein keine ausreichende onkogene Wirkung aufweist, um eine Tumorgenese zu initiieren.

Die histologischen Untersuchungen der Tumore (Abbildung 18) zeigt, dass die induzierten Pankreaskarzinome die morphologischen Charakteristika des humanen PDAC aufwiesen. Es konnte immunhistochemisch sowohl eine Expression von phosphoryliertem Erk als auch von CK19 nachgewiesen werden. In den Erk und CK19 positiven, duktalem Strukturen konnte eine Akt2 Aktivierung mittels Färbung von p-Akt2 (Abbildung 18, obere Reihe) gezeigt werden. In Abbildung 18 sind exemplarisch makroskopisch sichtbare Lebermetastasen und die histologische H&E Färbung von Lunge, Leber und Lymphknoten gezeigt, bei denen deutlich die Metastasen erkennbar sind.

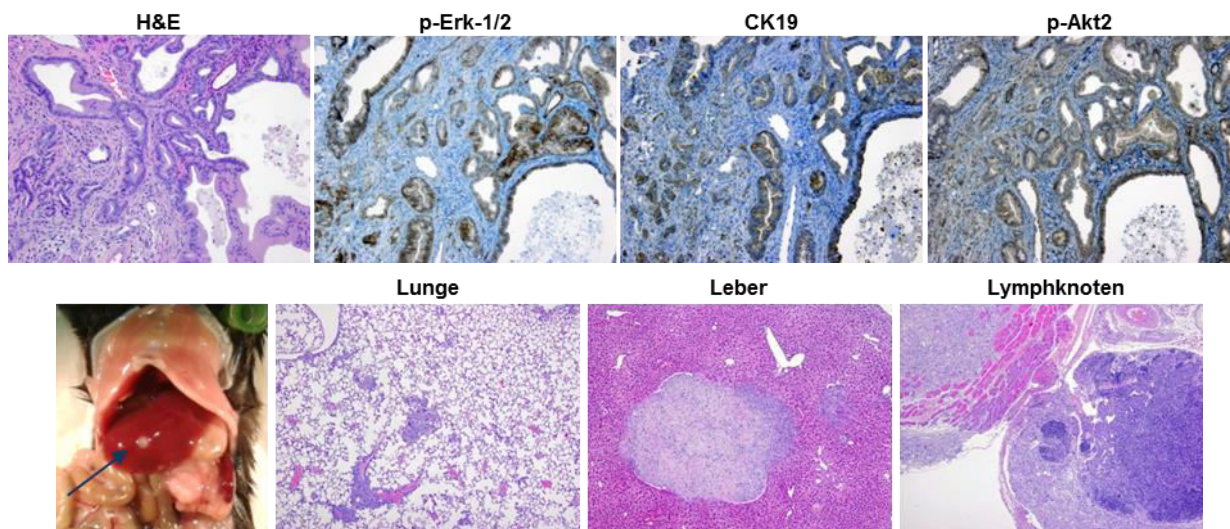


Abbildung 18 – Histologische Untersuchungen des Primärtumors und der Metastasen. Die in den p53^{fl/fl} Mäusen durch Expression von pT-Kras^{G12V}, pT-myrAkt2 und Deletion von p53-induzierten Tumore wurden zusammen mit Lunge, Leber und Lymphknoten isoliert und histologisch analysiert. Die obere Reihe zeigt die H&E- und IHC-Färbung für p-Erk-1/2, CK19 und p-Akt2 des Primärtumors. Die untere Reihe zeigt ein Bild bereits makroskopisch sichtbarer Lebermetastasen und die H&E-Färbung von Lunge, Leber und Lymphknoten, die ebenfalls einen metastatischen Befall dieser Gewebe zeigen. 100x Vergrößerung. (In Teilen bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Der hier verwendete genetische Hintergrund in Form von p53-Deletion, Expression von Kras^{G12V} und aktiviertem Akt2 spiegelt das humane PDAC zum einen morphologisch wider, zum anderen ist die klinisch charakteristische frühe Metastasierung vorhanden. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das Modell hervorragend, um verschiedene therapeutische Ansätze und neue therapeutische Strategien mit klinischer Relevanz zu untersuchen.

3.4.1. Adjuvante Gemcitabinetherapie im resezierbaren PDAC-Modell

Die adjuvante Gemcitabinetherapie hat eine deutlich lebensverlängernde Wirkung beim humanen Pankreaskarzinom und ist derzeit die einzige potentiell kurative Therapie des PDAC. Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob dieser in der Klinik beobachtete therapeutische Effekt auch in dem metastasierenden und resezierbaren PDAC Modell nachvollzogen werden kann. Zudem sollte die Wirkung der adjuvanten Gemcitabinetherapie mit den Effekten im nicht metastasierenden Modell, ohne Akt2 Überexpression, verglichen werden. Hierfür wurden Tumore mittels p53-Deletion, Kras^{G12V}

Überexpression und beim metastasierenden Modell durch zusätzliche Aktivierung von Akt2 induziert. Nach 21 Tagen, einem Zeitpunkt zu dem histologisch im Pankreas deutlich PDAC nachweisbar ist, erfolgte die operative Tumoresektion. Im Anschluss wurde die adjuvante Gemcitabinetherapie durchgeführt, hierzu wurden die Mäuse einmal wöchentlich, wie in Abbildung 19 A schematisch dargestellt, mit Gemcitabine behandelt. Die Gabe von isotonischer NaCl Lösung diente als Kontrolle. Neben dem Überleben der Mäuse wurde die Rezidivierung und Metastasierung analysiert (Abbildung 19 B+C).

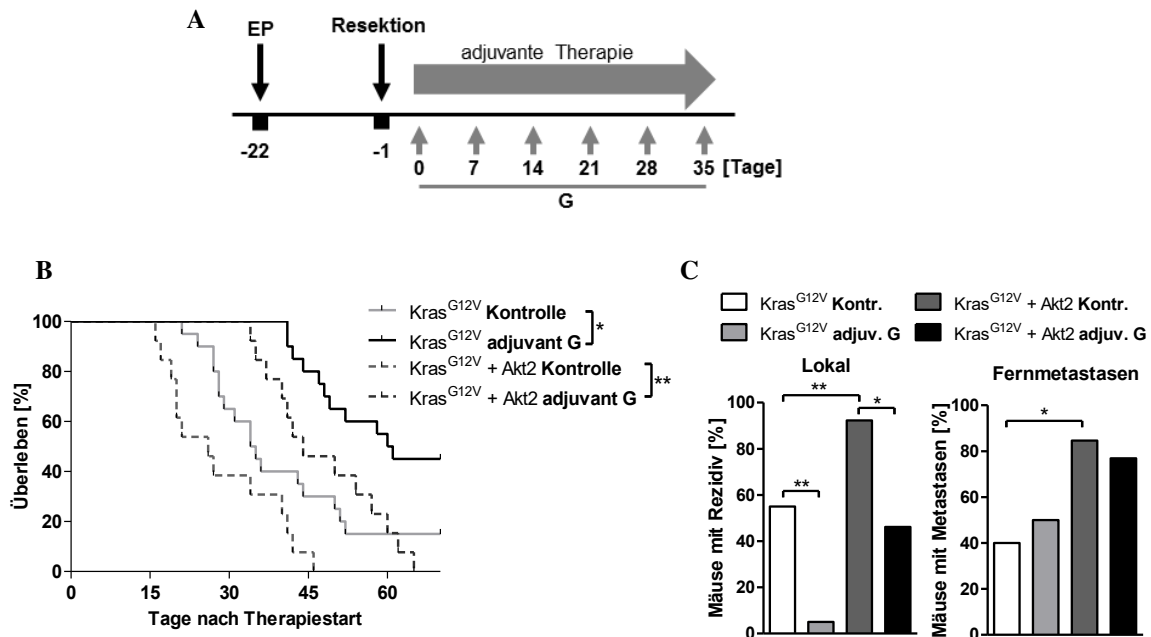


Abbildung 19 – Adjuvante Gemcitabinetherapie reduziert die Frequenz der Lokalrezidivierung. 21 Tage nach der Tumorinduktion durch p53-Deletion und Expression von pT-Kras^{G12V} +/- pT-myrAkt2 wurden die Tumore reseziert. Am folgenden Tag begann die adjuvante Gemcitabinetherapie (G), bei der Gemcitabine einmal wöchentlich intraperitoneal injiziert wurde (A). Der Kontrollgruppe wurde nach der Resektion einmal wöchentlich NaCl i.p. appliziert. Es wurde das Überleben der Mäuse (B) sowie die Rezidivierungsmuster (C) untersucht. Metastasen in Leber, Lunge und Peritonealraum wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Die Mäuse der Gruppe Kras^{G12V} adjuvant G wurden mit den Daten aus 3.3.4. zusammengefasst n=20. Gruppengröße: Kras^{G12V} n=20, Kras^{G12V}+Akt2 n=13. *p=0,01-0,05 **p=0,001-0,01. (Bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Die Therapie führte im Kras Modell (Kras^{G12V}) zu einer Verlängerung des mittleren Überlebens von 34,5 auf 60,5 Tagen, zudem bewirkte die Therapie eine Erhöhung des prozentualen Anteils von Mäusen mit Langzeitüberleben von 15% auf 45%. Auch bei dem früh metastasierenden Kras-Akt2 Modell (Kras^{G12V} + Akt2) konnte ein positiver therapeutischer Effekt bei der adjuvanten Gemcitabinegabe beobachtet werden, diese führte zu einem mittleren Überleben von 44 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 26 Tagen. Bei dem Kras-Akt2 Modell konnte eine deutlich erhöhte Häufigkeit an Lokalrezidiven festgestellt werden (Abbildung 19 C). Diese wurde durch die adjuvante Gemcitabinetherapie signifikant reduziert. Dieser Effekt konnte auch beim Kras Modell beobachtet werden, wo die Lokalrezidivrate durch die Behandlung von 55% auf 5% verringert wurde. Außerdem zeigte sich, dass durch die Verwendung von Akt2 die Frequenz an Fernmetastasen deutlich erhöht wurde und dass die Gemcitabinetherapie diese nicht beeinflusste. Die Ergebnisse zeigen, dass die adjuvante Gemcitabinetherapie in beiden Tumormodellen die Häufigkeit des Auftretens von

Lokalrezidiven signifikant reduziert. Dieses korreliert mit einem deutlich verlängerten Überleben bei den behandelten Mäusen und verdeutlicht, dass die klinisch relevanten, lebensverlängernden Effekte von Gemcitabine sowohl in dem früh metastasierenden als auch dem nicht metastasierenden PDAC Modell nachvollzogen werden konnte. Die Analyse der Fernmetastasierung ergab, dass Gemcitabine auf diese keinen therapeutischen Einfluss hatte. Dies lässt die Vermutung zu, dass das lokale Tumormikromilieu eine entscheidende Bedeutung bei der durch Gemcitabine-induzierten Wirkung hat, da Gemcitabine einen deutlichen Effekt auf die Lokalrezidive hatte, während die Metastasen nicht beeinflusst wurden.

Zur Aufklärung des therapeutischen Effekts, der bei der adjuvanten Gemcitabinegabe beobachtet wurde, erfolgte nach der Resektion im Kras-Akt2 Modell eine Analyse der Immunzellen im Resektionsrand und im Blut der behandelten bzw. der NaCl-Kontrollgruppe. Wie zuvor wurde der Tumor induziert und am Tag nach der Resektion erfolgte die Applikation von Gemcitabine oder NaCl. Am darauffolgenden Tag wurden der Resektionsrand und das Blut der Mäuse isoliert und nach Aufarbeitung des Resektionsrands zur Einzelzellsuspension wurde diese, ebenso wie das Blut, nach Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durchflusszytometrisch hinsichtlich unterschiedlicher Immunzellpopulationen analysiert. Nach der Eingrenzung der lebenden Immunzellen mithilfe der FSC/SSC Kanäle wurden die Leukozyten durch CD45.2 Expression ausgewählt. Anschließend wurden die NK Zellen anhand einer Färbung mit NK1.1 und CD49b identifiziert. Hier zeigt sich, dass die adjuvante Gemcitabinebehandlung im Resektionsrand zu einer deutlich erhöhten NK Zell Population führt (Abbildung 20 A). Im Gegensatz dazu ist die Frequenz der NK Zellen im Blut unbeeinflusst (Abbildung 20 D), was auf eine gewebsspezifische Wirkung von Gemcitabine hindeutet. Eine Analyse der CD8 T Zellen zeigt, dass Gemcitabine weder einen Einfluss auf die Frequenz in Resektionsrand noch auf die Frequenz im Blut hat (Abbildung 20 B/E). Von den immunsuppressiv wirkenden MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*) wurden Subpopulationen durch eine Färbung von CD11b, Gr1 und F4/80 analysiert. Hierbei wurden die CD45⁺CD11b⁺ Zellen auf unterschiedliche Expressionslevel von Gr1 und F4/80 untersucht. Eine starke Expression von Gr1 ist auf Granulozytenvorläufern zu finden, während Vorläuferzellen von Makrophagen eine geringe Gr1 und eine deutliche F4/80 Expression aufweisen. Über eine intermediäre Gr1 Expression können Monozyten und myeloide Vorläufer, die ein hohes immunsuppressives Potential aufweisen, bestimmt werden (Dolcetti et al., 2010). Die Abbildung 20C zeigt, dass Gemcitabine zu einer selektiven Reduktion der stark immunsuppressiven Gr1^{int}F4/80^{int} Population (P2) im Resektionsrand führt. Im Gegensatz dazu werden die Populationen Gr1^{hi}F4/80⁻ (P1) und Gr1^{low}F4/80⁺ (P3) nicht beeinflusst. Der reduktive Effekt auf die P2 Population konnte in der Blutanalyse (Abbildung 20F) nicht beobachtet werden, was wiederum auf einen gewebsspezifischen von Gemcitabine induzierten Effekt hindeutet.

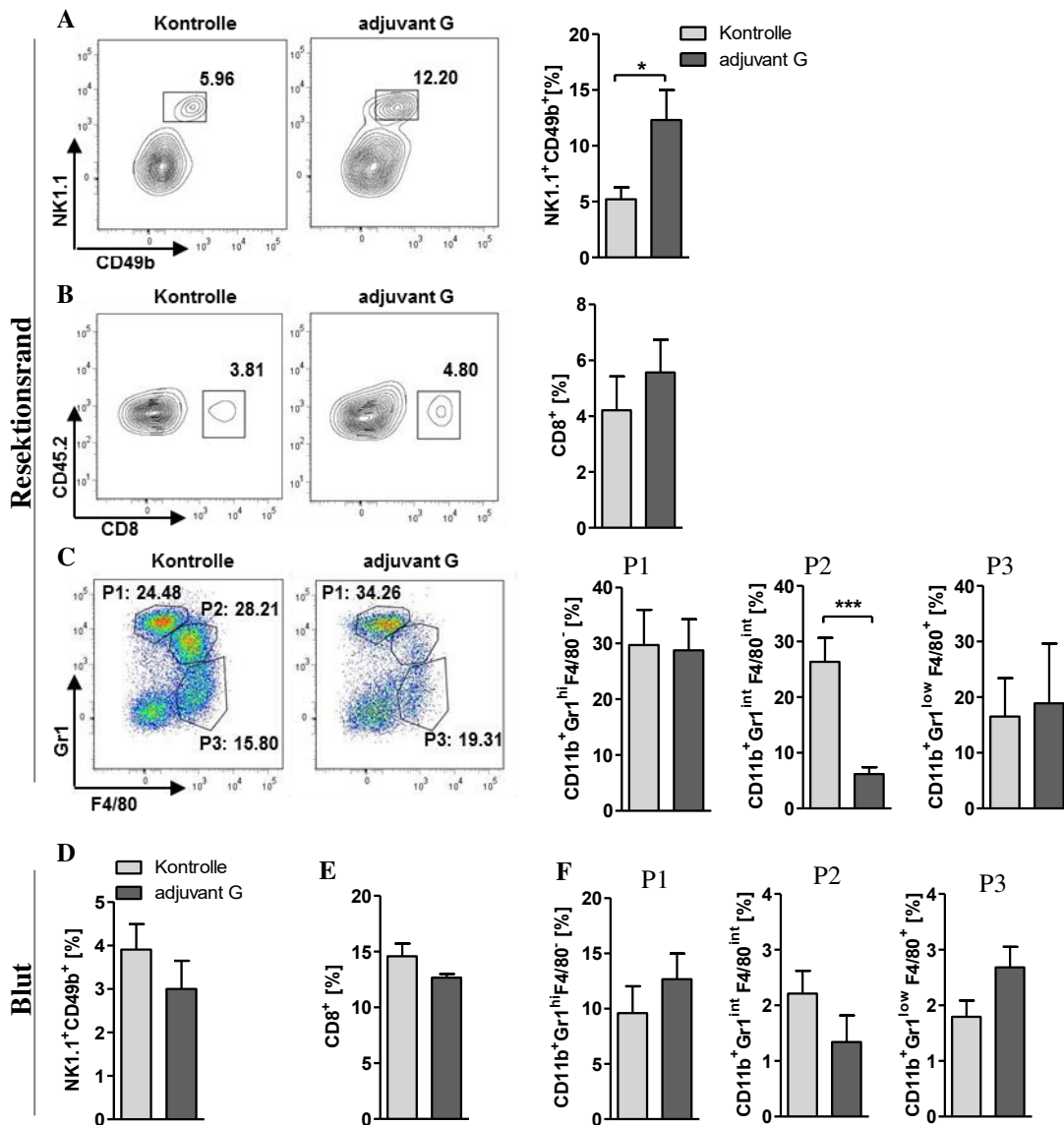


Abbildung 20 – Adjuvante Gemcitabinetherapie erhöht die NK Zellpopulation und reduziert immunsuppressive Zellen im Resektionsrand. Nach Tumorresektion erfolgte eine intraperitoneale Applikation von Gemcitabine (G) oder NaCl. Am folgenden Tag wurden die Immunzellen in Resektionsrand und Blut analysiert. Hierfür wurde der Resektionsrand zur Einzelzellsuspension aufbereitet und ebenso wie Blutproben mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt. Am Durchflusszytometer wurden anhand der Auftragung von FSC/SSC die lebenden Zellen und durch Färbung von CD45.2 die Leukozyten ausgewählt (A) Analyse der NK Zellen im Resektionsrand mittels NK1.1 und CD49b Färbung. Die Abbildung links zeigt exemplarische Contourplots, rechts ist die Quantifizierung dargestellt. Es wurde der prozentuale Anteil der Population der CD45.2 positiven Zellen bestimmt. (B) Analyse der CD8 T Zellen im Resektionsrand mittels Färbung mit α CD8, links ein exemplarischer Contourplot, rechts die Quantifizierung, % von CD45.2⁺. (C) Zeigt die Analyse der MDSC Subpopulationen im Resektionsrand. Es wurde gegen CD11b gefärbt und die unterschiedlichen Subpopulationen durch Färbung von Gr1 und F4/80 unterschieden. Die im Dotplot links gezeigten Populationen (P1-P3) wurden für die zwei Gruppen quantifiziert und der prozentuale Anteil von CD45.2⁺ bestimmt (rechts). D-F Analyse der Immunzellen im Blut. Es sind die Quantifizierung der NK-Zellen (D), der CD 8 T Zellen (E) und der CD11b⁺Gr1^{int}F4/80^{int} Subpopulationen (F) gezeigt. Es wurde der prozentuale Anteil an der CD45.2⁺ Leukozytenpopulation bestimmt. * p=0,01-0,05 ***p<0,001. (Bereits publiziert in (Gürlevik et al., 2016) abgebildet mit Erlaubnis des Verlags)

Es konnte gezeigt werden, dass die adjuvante Gemcitabinetherapie vor allem einen lokalen Effekt hatte. Mit dem durch Gemcitabine-induzierten verringerten Auftreten von Lokalrezidiven korrelierte ein deutlich verlängertes Überleben. Allerdings hatte die Therapie keine Wirkung auf die Metastasen, weshalb das Überleben der Mäuse durch das Auswachsen der Metastasen limitiert war. Die Analyse

der Immunzellen bestätigte mit einer lokal erhöhten Frequenz der NK Zellen und einer lokalen Reduktion der immunsuppressiven MDSC Population eine regionale Gemcitabinewirkung. Hierdurch wird verdeutlicht, dass für eine effektive antitumorale Therapie systemische Effekte notwendig sind, um auch disseminierte Tumorzellen, die zu Metastasen auswachsen, zu eliminieren.

3.5. Neoadjuvante und adjuvante Immuntherapie beim etablierten metastasierenden Pankreasmodell

Die Analyse der Immunzellen bei der adjuvanten Chemotherapie mit Gemcitabine konnte die Relevanz der lokalen Immunzellen für die beobachtete Wirkung auf die Lokalrezidivierung aufzeigen. Allerdings sind die lokalen Effekte aufgrund der frühen Metastasierung von PDAC nicht ausreichend für eine effektive Therapie, und das Auswachsen der Metastasen limitiert das Überleben. Hierbei stellen Metastasen durch ein im Vergleich zum lokalen Tumor verändertes Tumormikromilieu eine besondere Herausforderung für Therapien dar. Es sollte daher untersucht werden, ob durch eine gezielte Stimulation von Immunzellen auch die disseminierten Tumore adressiert werden können. Hierbei könnte die Stimulation der CD8 T Zellen bei einer Kombination mit den bereits gezeigten lokalen Effekten der Gemcitabinetherapie, die eine erhöhte NK Zellpopulation und eine Reduktion der immunsuppressiven MDSCs induzierte, zu synergistischen Effekt führen. Dieses könnte den therapeutischen Effekt auf die Rezidivierung potenzieren und einem Auswachsen der Metastasen entgegenwirken mit dem Resultat eines positiven Effektes auf das Überleben. Für eine hohe klinische Relevanz bei der Untersuchung der therapeutischen Strategien wurde das metastasierende und invasiv wachsende Modell mit p53-Deletion, Kras^{G12V} Expression und Akt2 Aktivierung (siehe 3.4.), das die Charakteristika des humanen PDAC am besten widerspiegelt, verwendet.

3.5.1. Adjuvante Immuncheckpointblockade hat keinen zusätzlichen positiven Effekt im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie

Mithilfe von Immuntherapien konnten bei soliden Tumoren verschiedener Entitäten vielversprechende therapeutische Ergebnisse erzielt werden. Eine Strategie der Immuntherapie beinhaltet die Aktivierung des Immunsystems über Immuncheckpoints. Für gewöhnlich können CD8 T Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort sowohl die Tumorprogression verlangsamen als auch die Disseminierung inhibieren (Pagès et al., 2005). Allerdings nutzen Tumore sogenannte Immuncheckpoints und supprimieren hierbei über eine Rezeptor-Liganden-Interaktion die CD8 T Zellantwort. Bei der Immuntherapie werden blockierende Antikörper z.B. gegen CTLA4 bzw. PD1 eingesetzt, die mit den inhibitorischen Signalen der T Zellantwort interferieren. Dies führt zu einer Stimulation der CD8 T Zellen und kann zu einer antitumoralen Antwort führen. Daher sollte der therapeutische Nutzen einer PD1 bzw. einer CTLA4 Blockade mit einem blockierenden Antikörper zur Stimulation der CD8 T Zellen im adjuvanten Ansatz untersucht werden. Hierzu wurde analog zum Therapieschema (Abbildung 21 A) nach der Resektion des Tumors einmal wöchentlich mit Gemcitabine therapiert,

zusätzlich erfolgte zweimal pro Woche eine Gabe von α PD1 bzw. α CTLA4. Zum direkten Vergleich wurden die unbehandelte Kontrollgruppe und die Gemcitabine behandelte Gruppe ($Kras^{G12V}$ +Akt2) aus 3.4.1. Abbildung 19 erneut aufgeführt.

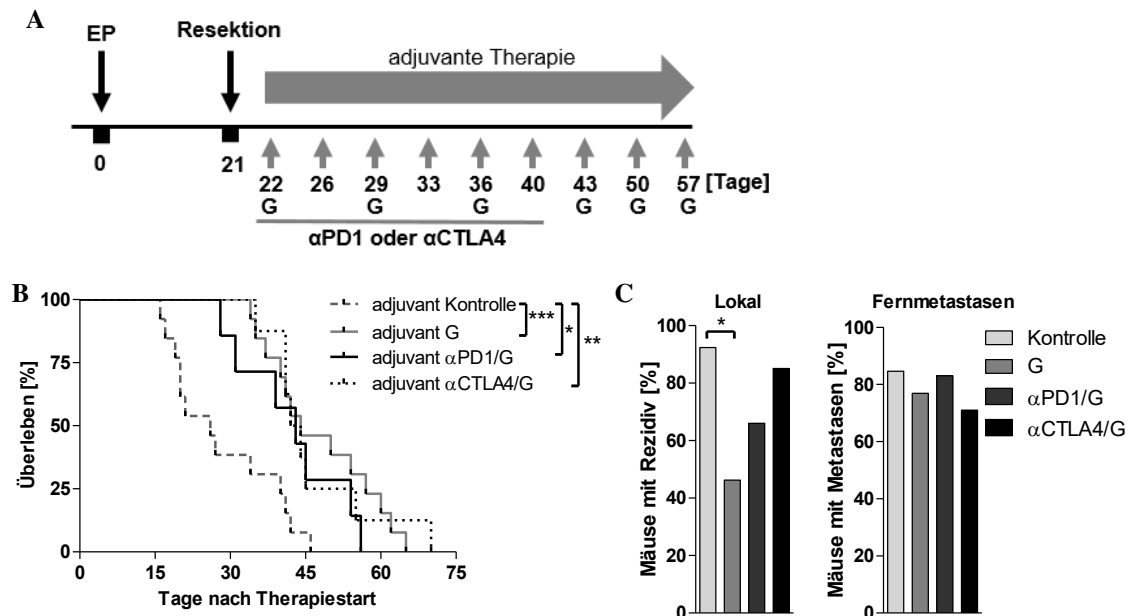


Abbildung 21 – Adjuvante Kombination mit Immuncheckpointblockade hat keinen zusätzlichen therapeutischen Nutzen. Nachfolgend zur Resektion wurde, wie in (A) dargestellt, einmal wöchentlich Gemcitabine (G) i.p. verabreicht. Zusätzlich erfolgte zweimal wöchentlich eine Applikation von α PD1 bzw. α CTLA4. Das Überleben (B) und das Auftreten von lokalen Tumoren und Metastasen (C) wurde analysiert. Hierbei wurden Metastasen in Leber, Lunge und Peritonealhöhle als Fernmetastasen zusammengefasst. Die Daten der adjuvanten Kontroll- und Gemcitabinegruppe ($Kras^{G12V}$ +Akt2), aus Abschnitt 3.4.1. Abbildung 19 B/C, wurden zum Vergleich erneut aufgeführt. Gruppengröße: Kontrolle n=13; Gemcitabine n=13; α PD1/G Überleben n=7, Metastasen n=6; α CTLA4/G Überleben n=8, Metastasen n=7. * p=0,01-0,05 **p=0,001-0,01 ***p<0,001

Es zeigt sich hierbei, dass weder der zusätzlichen adjuvanten PD1/PD-L1 Blockade noch der CTLA4 Blockade im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie ein additiver therapeutischer Effekt nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21 B/C). Die Immuncheckpointblockade scheint im Elektroporationsmodell im adjuvanten Ansatz keinen zusätzlichen therapeutischen Nutzen zu haben, daher sollte untersucht werden, ob die Blockade im neoadjuvanten Ansatz einen therapeutischen Effekt hat.

3.5.2. Neoadjuvante Kombination von α PD1 und Gemcitabine reduziert die Lokalrezidivierung und verlängert das Überleben

Da das Elektroporationsmodell die Untersuchung neuer therapeutischer Strategien und Standardtherapien wie Chemotherapie im Kontext der Resektion ermöglicht, wurde zudem die Strategie einer neoadjuvanten Therapie untersucht. Nachdem der Immuncheckpointblockade im adjuvanten Ansatz kein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden konnte, sollte diese im Folgenden in einer neoadjuvanten Strategie eingesetzt werden. Hierbei wurden das Chemotherapeutikum Gemcitabine und die Immuncheckpointblockade mit α PD1 jeweils als Monotherapie, sowie in Kombination verwendet. Zudem wurde die Wirkung einer neoadjuvanten

Inhibition mittels α CTLA4 in Kombination mit Gemcitabine untersucht. Für das Experiment wurde präoperativ dreimal mit einem Abstand von drei Tagen therapiert und nachfolgend zur Resektion erfolgte analog zu den bisherigen Experimenten eine adjuvante Gemcitabinetherapie (Abbildung 22 A). Es wurde das Überleben erfasst, und der Einfluss der Therapien auf die Lokalrezidivierung und Metastasierung untersucht. Im neoadjuvanten Ansatz ist die Monotherapie mit Gemcitabine von einer hohen Rezidivierungs- als auch Metastasierungsrate geprägt und führte zu einem mittleren Überleben von 28 Tagen. Im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie führte die neoadjuvante α PD1 Therapie zu keinem verlängerten Überleben, resultierte aber in einer tendenziell geringeren Lokalrezidivrate. Die Kombination von α CTLA4 mit Gemcitabine hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf das Überleben der Mäuse und führte im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie zu einem verlängerten Überleben. Zudem konnte bei der neoadjuvanten α CTLA4/G Therapie eine tendenziell verringerte Frequenz an Mäusen mit Lokalrezidiv im Vergleich zur Gemcitabinetherapie festgestellt werden. Im Gegensatz dazu hatte die Kombination von α PD1 und Gemcitabine (α PD1/G) im neoadjuvanten Ansatz einen deutlichen therapeutischen Effekt. Zum einen resultierte die Therapie in einem deutlich verlängerten Überleben (ms: 43,5 Tagen) im Vergleich zu den Monotherapien (Gemcitabine 28 Tage und α PD1 26 Tage), zum anderen führte die Kombinationstherapie zu einer stark verringerten Anzahl an Mäusen bei denen ein Lokalrezidiv nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22 B/C). Die Frequenz der Fernmetastasen wird weder durch die Monotherapien noch durch die Kombinationstherapie deutlich beeinflusst.

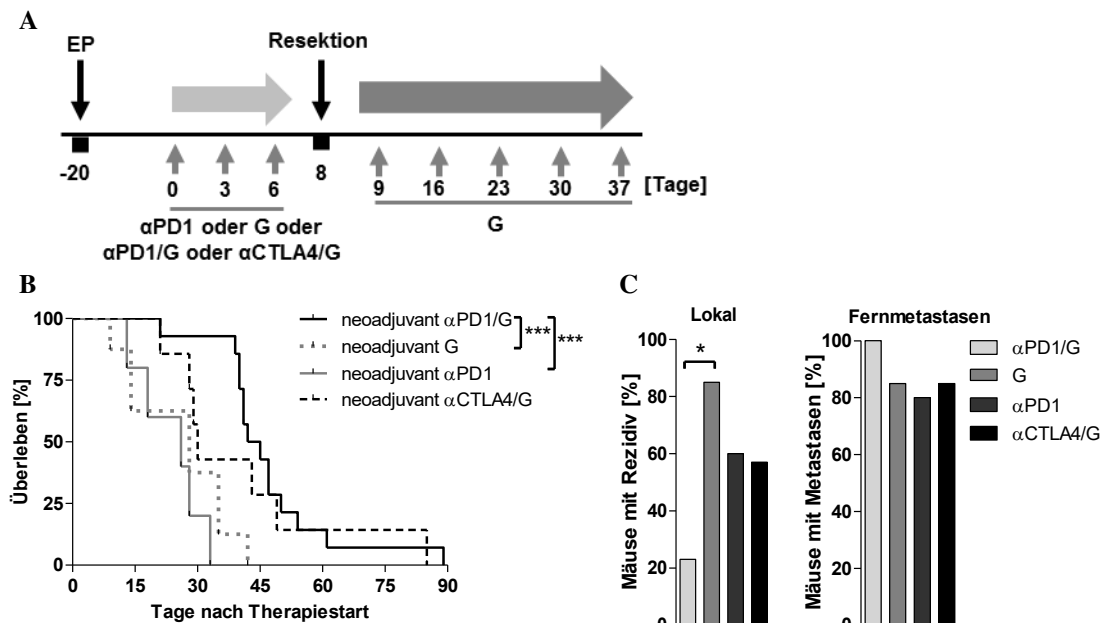


Abbildung 22 – Neoadjuvante Therapie mit α PD1/G hat einen signifikanten Einfluss auf das Überleben und die Lokalrezidivrate. 20 Tage nach der Elektroporation (EP) wurden die Mäuse an den abgebildeten Zeitpunkten mit α PD1, G, α PD1/G oder α CTLA4/G behandelt. Nach der Resektion erfolgte eine Gemcitabinetherapie (G) (1xwöchentlich i.p.). (A) zeigt das Therapieschema. Die Analyse des Überlebens und der Rezidivierung sowie Metastasierung ist in (B) und (C) dargestellt. Gruppengröße: α PD1/G n=13; G Überleben n=8, Metastasen n=7; α PD1 n=5; α CTLA4/G n=7. * p=0,01-0,05 ***p<0,001

Aufgrund der im Gegensatz zu α CTLA4 besseren Verträglichkeit von α PD1 bei der klinischen Behandlung von humanen Tumoren (Buchbinder and Desai, 2016) und der hier gezeigten deutlichen therapeutischen Wirkung der Kombination von α PD1 und Gemcitabine wurde in den weiteren Versuchen lediglich die PD1 Blockade weiter untersucht.

3.5.3. Neoadjuvante α PD1/G Therapie erhöht CD8⁺CD103⁺ T Zellpopulation im Tumor

Bei der neoadjuvanten Immuncheckpointblockade fiel besonders die offenbar bevorzugte lokale Wirkung der systemischen T Zellstimulation auf. Aufgrund dieser Wirkung der neoadjuvanten α PD1/G Therapie sollten die zugrundeliegenden lokalen Effekte genauer untersucht werden. Hierfür erfolgte eine Analyse der tumorinfiltrierenden Zellen. Um auch einen Einblick in die systemischen Effekte zu erhalten wurden die Immunzellen im Blut näher charakterisiert. Es wurde, wie in Abbildung 22 A gezeigt, neoadjuvant mit α PD1 und Gemcitabine als Monotherapie und in Kombination behandelt und zum Zeitpunkt der Resektion (Tag 8 nach Therapiebeginn) wurden der Primärtumor und das Blut isoliert. Zum Vergleich dienten Tumore und Blutproben einer unbehandelten Gruppe. Nach Aufbereitung des Tumors zu einer Einzelzellsuspension (siehe Material und Methoden 5.4.1.) wurde diese, ebenso wie die Zellen aus dem Blut, mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Da die T Zellen entscheidend an der Induktion einer antitumoralen Antwort beteiligt sind, wurde zuerst der Einfluss der Therapien auf die CD4 und CD8 T Zellpopulationen untersucht. Hierzu wurden die Proben für CD4, CD8 und CD45.2 gefärbt und der Anteil an CD4 bzw. CD8 positiver Zellen der CD45.2 positiven Population bestimmt (Abbildung 23).

Die Kombination von α PD1 und Gemcitabine (α PD1/G) führte ebenso wie die Gemcitabine Monotherapie zu einer deutlich erhöhten Frequenz von CD8 T Zellen im Blut im Vergleich zur unbehandelten und der α PD1 behandelten Gruppe (Abbildung 23 A/C). Zudem konnte bei der neoadjuvanten Kombination α PD1/G eine signifikant erhöhte CD4 T Zellpopulation im Blut beobachtet werden, diese war mit circa 25% doppelt so hoch wie in den monotherapierten Gruppen bzw. der unbehandelten Gruppe (Abbildung 23 B/D). Im Gegensatz dazu hatten die neoadjuvanten Therapien nahezu keinen Einfluss auf die T Zellpopulationen im Tumor. Hier betrug die Frequenz der CD8 T Zellpopulation bei allen Gruppen in etwa 10 %, währenddessen die Frequenz der CD4 T Zellen zwischen 10 und 15 % lag. Das Verhältnis von CD8⁺/CD4⁺, bei dem ein höherer Anteil von CD8 gegenüber CD4 als positiver prognostischer Faktor angesehen ist (Diederichsen et al., 2003; Huang et al., 2015), wurde ebenfalls analysiert (Abbildung 23 E). Hier konnte sowohl im Blut als auch im Tumor kein deutlicher Effekt durch die neoadjuvanten Therapien auf das CD8⁺/CD4⁺ Verhältnis festgestellt werden.

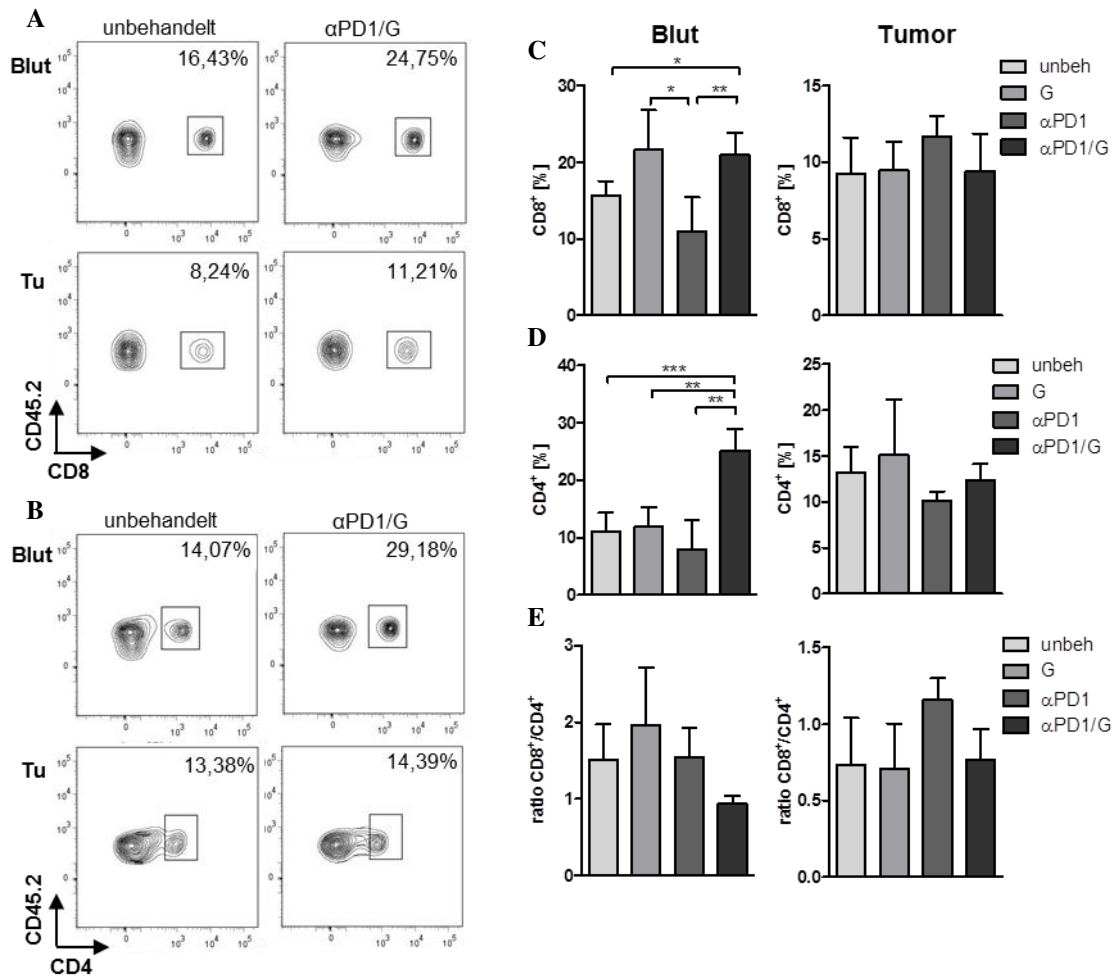


Abbildung 23 – Analyse der T Zellen in Blut und Tumor nach neoadjuvanter Therapie. Nach der Aufarbeitung des Bluts und des Tumors an Tag 8 nach Therapiebeginn wurden die Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD8 und CD4 gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurden im FSC/SSC die lebenden Zellen und mit CD45.2 die Leukozyten ausgewählt. Es sind exemplarische Contourplots der CD8 Population (**A**) und der CD4 Population (**B**) der unbehandelten und αPD1/G behandelten Gruppe in Blut und Tumor gezeigt. Es wurde der Anteil an CD8⁺ (**C**) und CD4⁺ T Zellen (**D**) der CD45.2 Population bestimmt und die Ratio (**E**) aus beidem gebildet. Gruppengröße: unbeh. n=4; G n=4; αPD1 n=3; αPD1/G n=3. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01; ***p<0,001

Aufgrund der immunsuppressiven Eigenschaften regulatorischer T Zellen, die sowohl Einfluss auf das Tumorwachstum als auch auf die Immunantwort haben können, wurden diese über die zusätzliche Färbung der CD4 T Zellen mit CD25 untersucht.

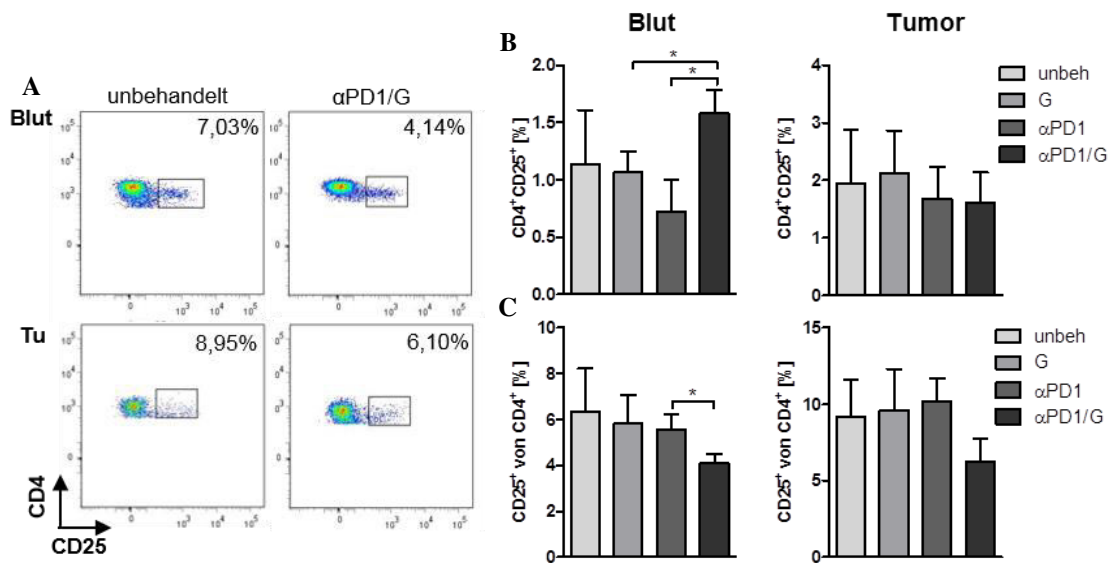


Abbildung 24 – Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf regulatorische T Zellen in Blut und Tumor. Acht Tage nach Therapiebeginn wurden die Immunzellen aus Tumor und im Blut mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD4 und CD25 gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Exemplarische Contourplots der CD4 CD25 Expression sind in (A) für die unbehandelte und die αPD1/G behandelte Gruppe in Blut und Tumor gezeigt. Es wurde der Anteil an CD4⁺CD25⁺ der CD45.2 Population (B) und der Anteil der CD25⁺ Zellen der CD4⁺ (C) Population bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=4; G n=4; αPD1 n=3; αPD1/G n=3. *p=0,01-0,05

Bei der Betrachtung der Gesamtpopulation an CD4⁺CD25⁺ Zellen innerhalb der CD45.2⁺ Leukozytenpopulation konnte im Blut ein Anstieg nach Kombinationstherapie mit αPD1 und Gemcitabine beobachtet werden (Abbildung 24 B). Die gezielte Korrelation der CD25 positiven Zellen innerhalb der CD4 T Zellpopulation (CD25⁺ von CD4⁺) zeigte allerdings, dass durch die αPD1/G Kombination kein erhöhter Anteil an CD25 exprimierenden CD4 T Zellen induziert wurde (Abbildung 24 A/C), dieser Anteil war sogar deutlich reduziert. Die Analyse der Immunzellen aus dem Tumor verdeutlichte, dass keine der Therapien einen Einfluss auf die Gesamtpopulation der CD4⁺CD25⁺ Treg hatte (Abbildung 24 B). Bei der direkten Analyse der CD4 T Zellpopulation auf CD25 Expression in Abbildung 24C zeigt sich, dass die Kombination αPD1/G auch hier zu einer Reduktion der CD25 positiven CD4 T Zellen führte, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

Da die Immuncheckpointblockade mit αPD1 vor allem auf die T Zellantwort wirkt, wurde der Einfluss der neoadjuvanten Therapien auf CD8 T Zellen genauer analysiert. Hierbei wurde die CD103⁺ CD8 T Zellpopulation untersucht, da diese Zellen als tumorinfiltrierende antigenspezifische T Zellen bekannt sind und einen positiven prognostischen Faktor darstellen (Djenidi et al., 2015). Außerdem ist die Expression des Integrins CD103 wichtig für die zytotoxische Funktion der CD8 T Zellen (Franciszkiwicz et al., 2013). Die Analyse der tumorinfiltrierenden CD8 T Zellen zeigt eine deutlich höhere Expression von CD103 nach neoadjuvanter αPD1 Therapie (Abbildung 25). Die stärkste Expression des Integrins konnte nach der Kombinationstherapie mit αPD1/G festgestellt werden, hier war die CD103 Expression mit 50% doppelt so hoch wie in der unbehandelten Gruppe (25%).

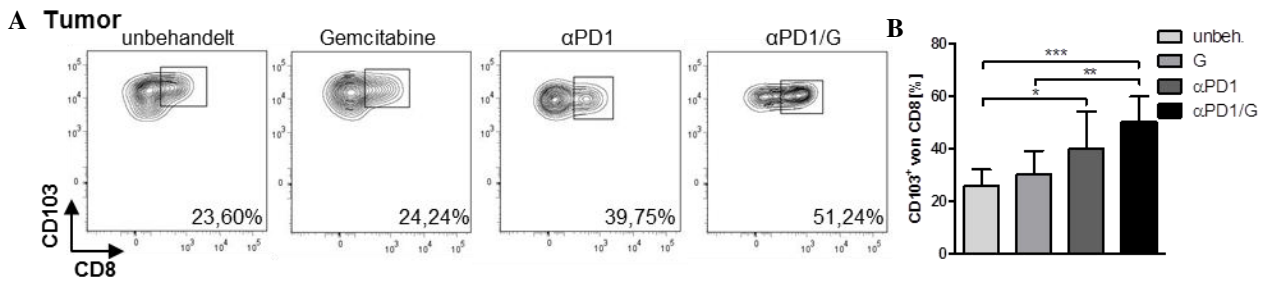


Abbildung 25 - Die neoadjuvante PD1 Blockade erhöht die Frequenz der CD8⁺CD103⁺ T Zellen im Tumorgewebe. Der Tumor wurde nach neoadjuvanter Therapie an Tag 8 isoliert, zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet und anschließend mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD90.2, CD8 und CD103 gefärbt. Nach dem Gating auf lebende Zellen (FSC/SSC) und auf CD90.2 positive Lymphozyten, wurde die CD103⁺ Population der CD8⁺ T Zellen analysiert. Exemplarische Contourplots der CD8 CD103 Expression sind in (A) gezeigt. Es wurde die Frequenz an CD103⁺ Zellen der CD8⁺ T Zellpopulation bestimmt (B). Gruppengröße: unbeh. n=9; G n=6; αPD1 n=5; αPD1/G n=5. *p=0,01-0,05; **p=0,001 0,01; ***p<0,001. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Die NK-Zellen sind wichtige Effektor Zellen der angeborenen Immunantwort und sind durch ihre zytotoxische Aktivität von besonderer Bedeutung für die antitumorale Antwort. Daher sollte der Einfluss der neoadjuvanten Therapien auf diese Immunzellen untersucht werden. Bei der Analyse der NK Zellen wurde zum einen die NK1.1 positive Population, zum anderen die doppelt positive NK1.1⁺CD49b⁺ Population zur Analyse der zirkulierenden konventionellen NK Zellen (Erick and Brossay, 2016) betrachtet.

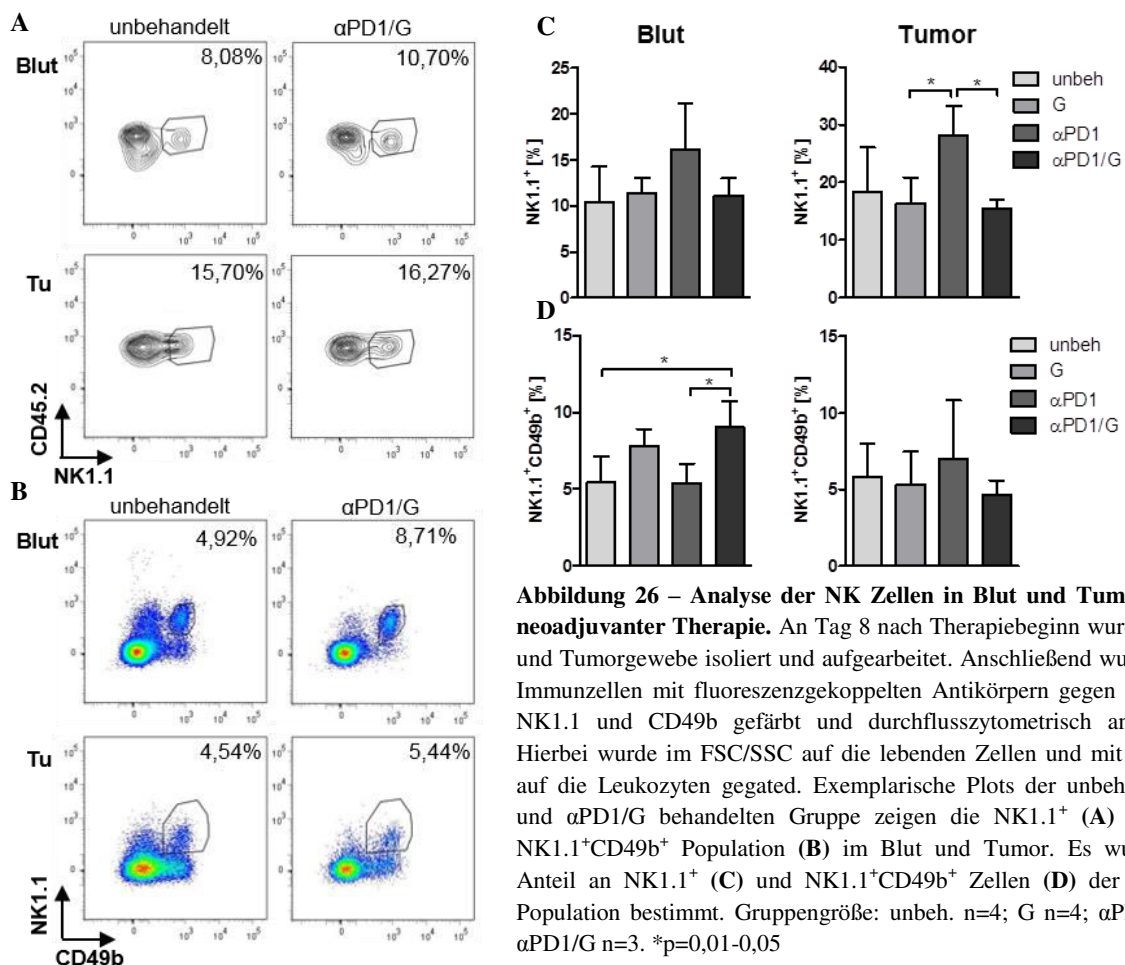


Abbildung 26 – Analyse der NK Zellen in Blut und Tumor nach neoadjuvanter Therapie. An Tag 8 nach Therapiebeginn wurden Blut und Tumorgewebe isoliert und aufgearbeitet. Anschließend wurden die Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, NK1.1 und CD49b gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Exemplarische Plots der unbehandelten und αPD1/G behandelten Gruppe zeigen die NK1.1⁺ (A) und die NK1.1⁺CD49b⁺ Population (B) im Blut und Tumor. Es wurde der Anteil an NK1.1⁺ (C) und NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen (D) der CD45.2 Population bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=4; G n=4; αPD1 n=3; αPD1/G n=3. *p=0,01-0,05

Im Blut konnte kein deutlicher Effekt der neoadjuvanten Therapien auf die gesamte NK Zellpopulation (NK1.1⁺) festgestellt werden (Abbildung 26 A/C). Die Gemcitabinetherapie führte mit 8% zu einer leicht erhöhten Frequenz der zirkulierenden NK1.1⁺CD49b⁺Zellen. Währenddessen führte die Kombination von α PD1/G zu einer signifikant erhöhten Frequenz der NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen im Vergleich zur unbehandelten und der α PD1 Monotherapie Gruppe (Abbildung 26 B/D). Bei der Analyse der Immunzellen im Tumor zeigte sich ein deutlicher Anstieg der NK1.1⁺ Population nach α PD1 Monotherapie im Vergleich zu Gemcitabine und α PD1/G (Abbildung 26 A/C). Im Gegensatz dazu wurde die Frequenz der zirkulierenden NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen durch die neoadjuvanten Therapien im Tumor nicht beeinflusst und lag in allen Gruppen zwischen 5 und 7% (Abbildung 26 B/D). Der neoadjuvanten α PD1/G Therapie konnte durch den Anstieg der doppelt positiven Zellen im Blut ein systemischer Effekt auf die zirkulierende NK Zellpopulation nachgewiesen werden. Lokal konnte lediglich bei der α PD1 Monotherapie ein Einfluss auf die NK Zellen beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass Gemcitabine einen reduktiven Effekt auf myeloide Zellen, insbesondere auf die MDSCs hat (Suzuki et al., 2005), weshalb die Wirkung der Gemcitabinetherapie auf diesen Zelltyp untersucht wurde. Hierzu wurde die Gr1⁺CD11b⁺ Population der tumorinfiltrierenden CD45.2⁺ Immunzellen und der CD45.2⁺ Immunzellen im Blut nach unterschiedlicher Therapie analysiert. Sowohl bei der Analyse der Immunzellen im Blut als auch im Tumor konnte eine starke Reduktion der Gr1⁺CD11b⁺ Population unter Gemcitabine festgestellt werden (Abbildung 27). Diese war sowohl bei der Monotherapie als auch bei der Kombination mit α PD1 nachweisbar. Hierbei führten die Gemcitabine (5%) und die α PD1/G Therapie (8%) im Tumor zu einer Reduktion der MDSC Population um z.T. mehr als die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten (16%) und α PD1 (25%) behandelten Gruppe.

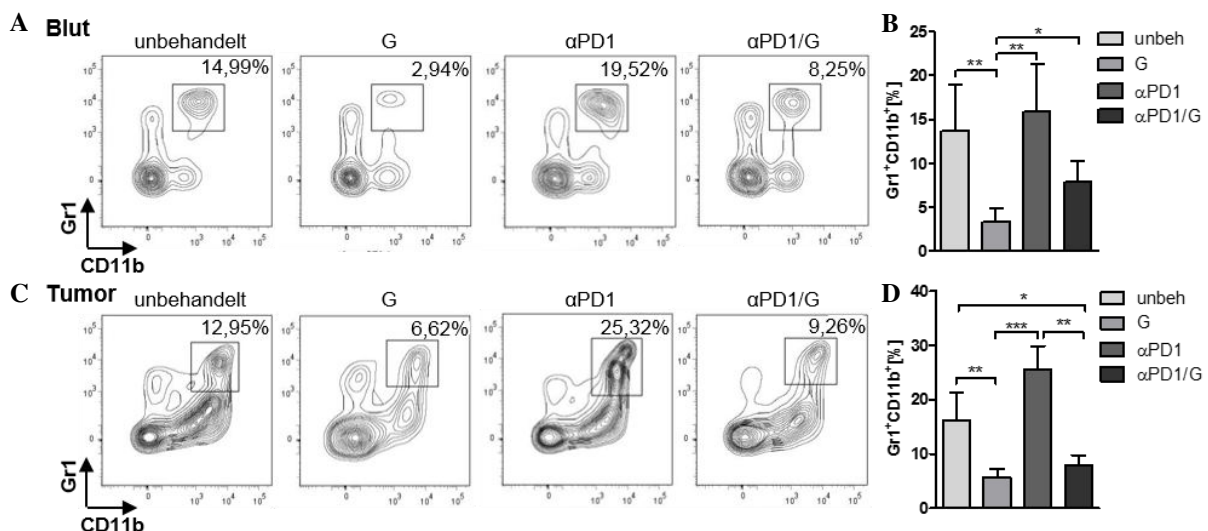


Abbildung 27 – Die neoadjuvante Gemcitabinegabe reduziert die MDSCs im Blut und Tumor. Nachfolgend zur neoadjuvanten Therapie wurden an Tag 8 die Immunzellen aus Blut und Tumor isoliert und aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Färbung der Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD11b und Gr1. Bei der Analyse am Durchflusszytometer wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Exemplarische Dotplots der analysierten Gruppe zeigen die Gr1 und CD11b Expression in Blut (A) und Tumor (C). Es wurde der Anteil der CD11b⁺Gr1⁺ Zellen der CD45.2⁺ Population für Blut (B) und Tumor (D) bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=4; G n=4; α PD1 n=3; α PD1/G n=3. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01; ***p<0,001

Zusätzlich zu den MDSCs wurden myeloide Subpopulationen betrachtet, die durch CD11b Expression und unterschiedliche Expressionslevel der Granulozyten- bzw. Makrophagenmarker Gr1 bzw. F4/80 charakterisiert werden. Hierzu wurde auf CD11b gated und anschließend Gr1 gegen F4/80 aufgetragen, es wurde der Anteil der drei Subpopulationen an der CD45.2⁺ Population bestimmt (Abbildung 28). Hierbei wird vor allem unterschieden zwischen den hoch immunsuppressiven CD11b⁺Gr1^{int} (P2), die hauptsächlich aus Monozyten und myeloiden Vorläufern bestehen, den CD11b⁺Gr1^{hi} (P1), deren Hauptanteil Granulozytenvorläufer widerspiegeln und die nur geringe immunsuppressive Eigenschaften aufweisen und den CD11b⁺Gr1^{low} (P3), die Makrophagen Vorläuferzellen darstellen und denen ebenfalls immunsuppressive Effekte nachgewiesen werden konnten (Dolcetti et al., 2010).

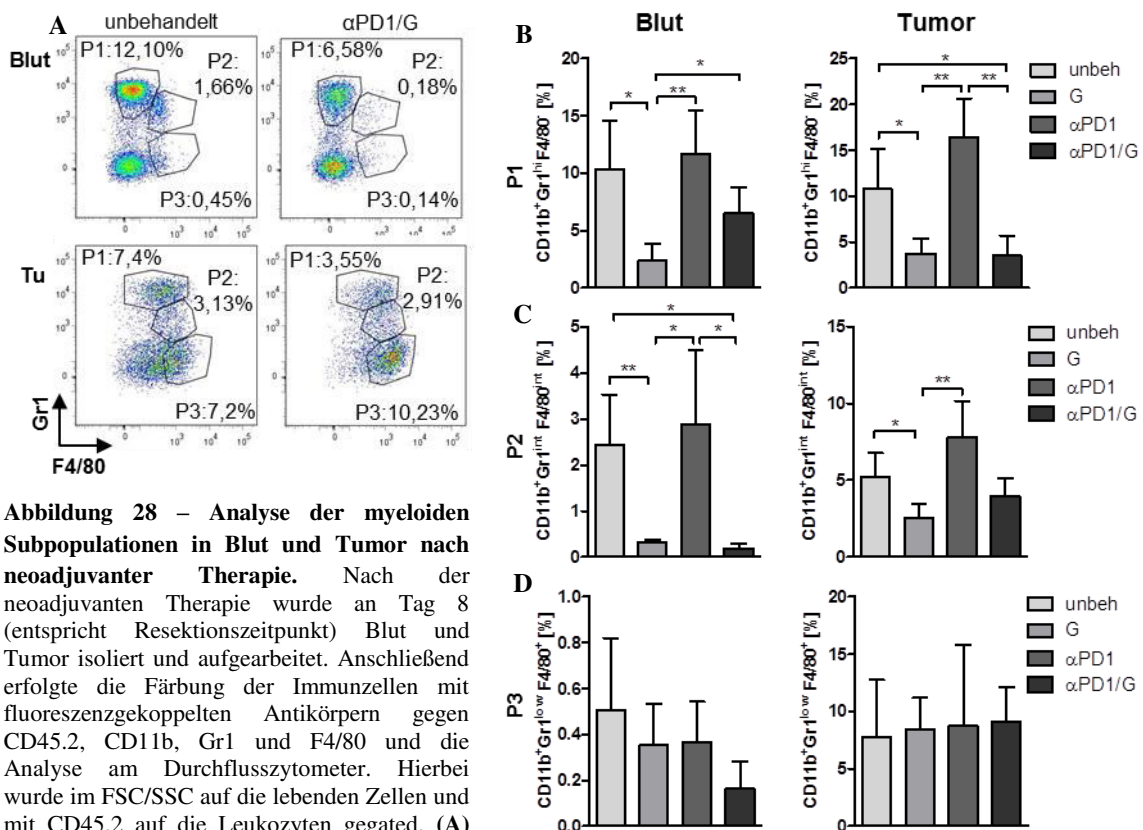


Abbildung 28 – Analyse der myeloiden Subpopulationen in Blut und Tumor nach neoadjuvanter Therapie. Nach der neoadjuvanten Therapie wurde an Tag 8 (entspricht Resektionszeitpunkt) Blut und Tumor isoliert und aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Färbung der Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD11b, Gr1 und F4/80 und die Analyse am Durchflusszytometer. Hierbei wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. (A) Exemplarische Dotplots der unbehandelten und α PD1/G behandelten Gruppe zeigen die Cd11b⁺, Gr1 und F4/80 exprimierenden Populationen im Blut und Tumor. Es wurde der Anteil an P1: CD11b⁺Gr1^{hi}F4/80⁻ (B), P2: CD11b⁺Gr1^{int}F4/80^{int} (C) und P3: CD11b⁺Gr1^{low}F4/80⁻ (D) der CD45.2⁺ Population bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=4; G n=4; α PD1 n=3; α PD1/G n=3. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01

Die Population P1 (CD11b⁺Gr1^{hi}F4/80⁻) ist bei der Analyse des Bluts nach Gemcitabinetherapie im Vergleich zur unbehandelten und α PD1 behandelten Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 28 B). Hierbei führte die Kombination α PD1/G nur zu einer geringen Reduktion. Die Untersuchung der intratumoralen Zellen zeigt, dass sowohl die Gemcitabine Monotherapie als auch die α PD1/G Therapie entsprechende reduktive Effekte auf die P1 Population hatten. Es kam bei beiden Gruppen zu einer deutlichen Reduktion auf 4% im Vergleich zur unbehandelten (10%) und α PD1 (15%) therapierten Gruppe (Abbildung 28 B). Die stark immunsuppressive CD11b⁺Gr1^{int}F4/80^{int} P2 Population wird ebenfalls deutlich durch die Gemcitabine-beinhaltenden Therapien beeinflusst

(Abbildung 28 C). Im Blut führen Gemcitabine und α PD1/G zu einer stark verringerten Frequenz an P2 Zellen. Dieser Effekt ist im Tumor nicht ganz so ausgeprägt. Hier führt die Gemcitabinetherapie zu einer signifikanten Reduktion auf 2,5%, die Kombination α PD1/G nur zu einer tendenziell verringerten Frequenz im Vergleich zur unbehandelten und α PD1 behandelten Gruppe. Die Analyse der P3 Zellen ($CD11b^+Gr1^{low}F4/80^+$) zeigt, dass die neoadjuvanten Therapien weder im Blut noch im Tumor deutliche Effekte auf diese Population hatten (Abbildung 28 D). Hierbei konnte im Blut eine tendenziell geringere Frequenz an $Gr1^{low}F4/80^{hi}$ Zellen nach α PD1/G im Vergleich zu den anderen Gruppen festgestellt werden. Dies verdeutlicht, dass Gemcitabine, sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie mit α PD1, einen starken Einfluss auf diese myeloiden Populationen hat und hierbei vor allem eine deutliche Reduktion der immunsuppressiven Population bewirkt.

Die Immunzellanalysen verdeutlichen, dass die Kombination α PD1/G zwar zu einer deutlich erhöhten Frequenz an CD8 T Zellen im Blut führt, aber gleichzeitig einen Anstieg der CD4 T Zellpopulation induziert. Diese Gegenregulation führte dazu, dass trotz des deutlichen CD8 T Zellanstiegs kein verbessertes Verhältnis von CD8/CD4 festgestellt werden konnte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nur ein geringer Anteil der induzierten CD4 T Zellen aus regulatorischen T Zellen besteht. Intratumoral führte sowohl α PD1 allein als auch die Kombination mit Gemcitabine (α PD1/G) zu einem deutlichen Anstieg der gewebspezifischen $CD103^+$ CD8 T Zellen. Gleichzeitig bewirkte die Gabe von Gemcitabine sowohl als Monotherapie wie auch in der Kombination mit α PD1 eine deutliche Reduktion der immunsuppressiven myeloiden Zellen in Tumor und Blut. Zusätzlich hierzu wurde durch α PD1/G die Frequenz an zirkulierenden NK Zellen im Blut erhöht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur durch die Kombination der Effekte von Gemcitabine, was eine Reduktion der immunsuppressiven Zellen zu Folge hat, mit α PD1, was lokale gewebspezifische T Zellen induziert, eine effektive lokale T Zellantwort induziert werden konnte. Daher führte lediglich die Kombination der neoadjuvanten Immuncheckpointblockade mit der Chemotherapie zu einem deutlichen therapeutischen Effekt auf das Überleben.

Aufgrund der vorwiegend lokalen Wirkung der neoadjuvanten Therapie auf die CD8 T Zellen und um weiteren Aufschluss über die Effekte auf die antitumorale Antwort zu erhalten, wurde zum einen die intratumorale CD8 T Zellpopulation auf Expression spezifischer Aktivierungsmarker und zum anderen eine Stimulation der $IFN\gamma$ Sekretion untersucht.

3.5.4. Charakterisierung der tumorinfiltrierenden CD8 T Zellen

Die Immuncheckpointblockade mit α PD1 interferiert mit der Inhibition der CD8 T Zellantwort und führt zu einer Stimulation der CD8 T Zellen. In Folge einer T Zellaktivierung wird die Expression spezifischer Oberflächenmarker wie z.B. CD69 oder CD11a auf den T Zellen hochreguliert. Da die neoadjuvante Therapie vor allem einen lokalen Effekt hatte, wurde der Einfluss der unterschiedlichen Therapien auf die CD8 T Zellen im Tumormikromilieu im Hinblick auf Aktivierungsmarker untersucht. Hierzu wurde nachfolgend zur neoadjuvanten Mono- oder Kombinationstherapie der Primärtumor an Tag 28 nach Elektroporation (entspricht Zeitpunkt der Resektion) isoliert und eine Einzelzellsuspension präpariert. Die Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde zuerst im FSC/SSC auf die lebenden Einzelzellen und anschließend auf die CD90.2 positive Lymphozytenpopulation gated. Es wurde die Expression von PD1, CD69, CD11a und CD44 auf den CD8 T Zellen untersucht. Der inhibitorische Rezeptor PD1 wird von Antigen-erfahrenen T Zellen exprimiert. Eine Hochregulation der PD1 Expression hat zur Folge, dass die T Zellen die Fähigkeit verlieren Tumorzellen zu eliminieren, man spricht hierbei auch von der Erschöpfung der T Zellpopulation (Fourcade et al., 2009). Diese Erschöpfung der T Zellen tritt zum Beispiel im Tumormikromilieu auf und begünstigt die Immunevasion des Tumors (Jiang et al., 2015). Wie Abbildung 29 A zeigt, führten die neoadjuvanten Therapien sowohl bei den Monotherapien als auch bei der Kombinationstherapie von α PD1/G zu einem signifikant verringerten prozentualen Anteil der PD1 positiven T Zellen (10-15%) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (30%).

Bei aktivierten T Zellen kommt es zu einer Hochregulation von CD69. Die Färbung dieses Markers ist in Abbildung 29 B gezeigt. Die Therapien haben im Vergleich zur unbehandelten Gruppe keinen deutlichen Effekt auf den prozentualen Anteil der CD69 exprimierenden T Zellen. In allen untersuchten Gruppen konnte ein Anteil von 17-28% CD69⁺ CD8 T Zellen festgestellt werden. Nach Antigenkontakt wird die Expression von CD11a hochreguliert, die Untersuchung dieses Markers auf den CD8 T Zellen nach Gemcitabinemonotherapie und Kombinationstherapie mit α PD1/G zeigte im Vergleich zur unbehandelten Gruppe keine Veränderung in der CD11a Expression (Abbildung 29 C). Circa 55% der CD8 T Zellen exprimierten dieses Integrin. Bei der Analyse von CD44 (Abbildung 29 D), einem Marker für T Zellaktivierung und Effektor T Zellen, konnte ebenfalls kein Unterschied in der Expression zwischen den unterschiedlich therapierten Gruppen festgestellt werden.

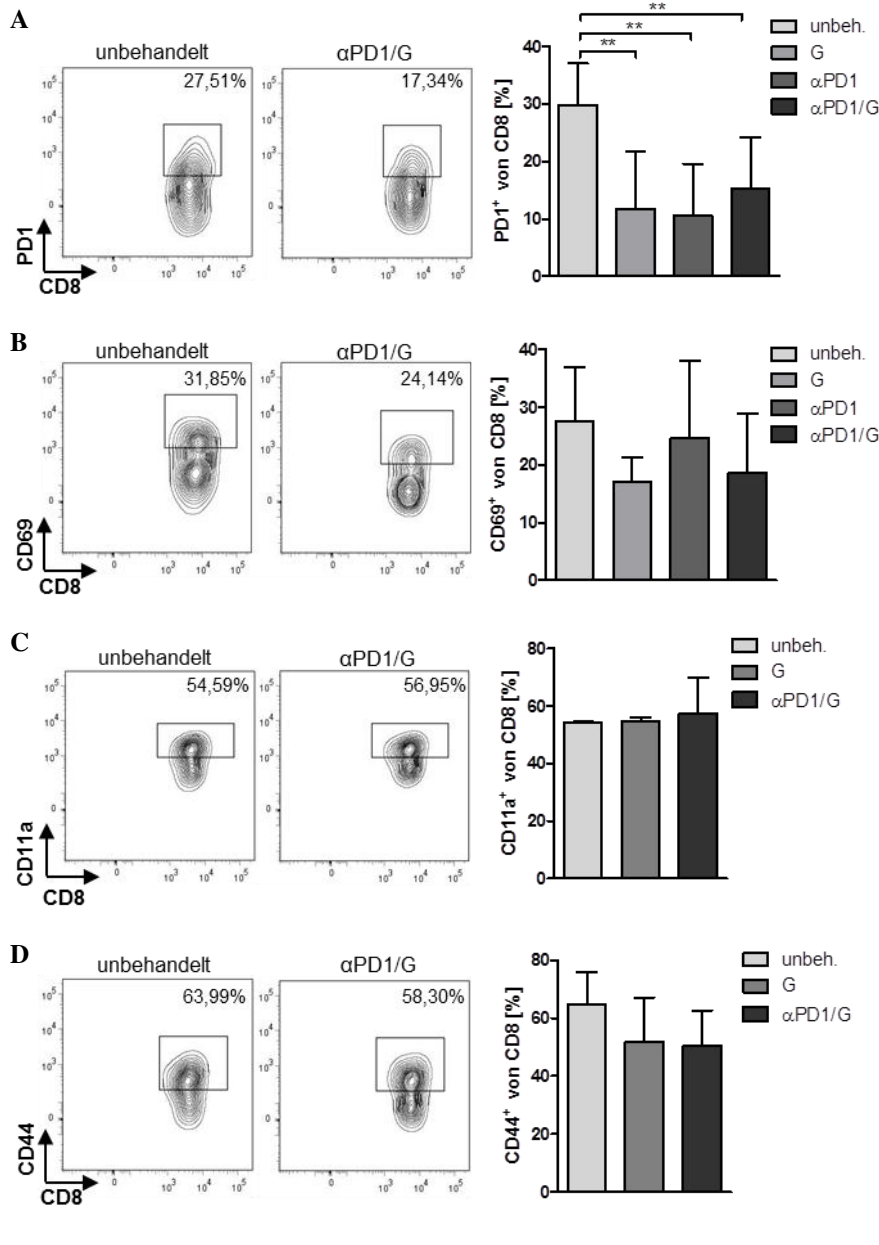


Abbildung 29 – Analyse der Expression von PD1, CD69, CD11a und CD44 auf den CD8 T Zellen nach neoadjuvanter Therapie. Nach der neoadjuvanter Therapie mit Gemcitabine, αPD1 oder αPD1/G wurden die Tumore an Tag 28 isoliert und aufgereinigt, Tumore von unbehandelten Mäusen dienten als Kontrolle. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Es wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD90.2 auf die Lymphozyten gated. Von der CD8⁺ Population wurden die Frequenzen an PD1⁺ (A), CD69⁺ (B), CD11a⁺ (C) und CD44⁺ (D) bestimmt. Links sind jeweils exemplarische Contourplots für die unbehandelte und die αPD1/G behandelte Gruppe, rechts ist die Quantifizierung für alle analysierten Gruppen gezeigt. Gruppengröße: PD1 (unbeh. n=6; G n=9; αPD1 n=7; αPD1/G n=9), CD69 (unbeh. n=9; G n=7; αPD1 n=8; αPD1/G n=7), CD11a (unbeh. n=3; G n=4; αPD1/G n=5), CD44 (unbeh. n=3; G n=7; αPD1/G n=7). **p=0,001-0,01

Die Charakterisierung der CD8 T Zellen zeigt, dass die neoadjuvanter Therapien zu einer verringerten Frequenz an CD8 T Zellen, die den Marker für eine T Zellerschöpfung PD1 exprimieren, führen. Zum anderen hatten die neoadjuvanter Therapien keinen Effekt auf die CD11a, CD44 und CD69 exprimierende CD8 T Zellpopulation und nahmen somit keinen Einfluss auf die Frequenz der aktivierten und antigenerfahrenen T Zellen. Dies verdeutlicht, dass die Therapien lediglich die T Zellerschöpfung, wodurch die T Zellen ihre Effektorfunktion verlieren, beeinflussen jedoch nicht das Ausmaß der Aktivierung der CD8 T Zellen im Tumormikromilieu verändern.

3.5.5. Die neoadjuvante Therapie mit α PD1/G induziert eine lokale tumorantigen-spezifische CD8 T Zellantwort und triggert die PD-L1 Expression auf Tumorzellen

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, die darauf schließen lassen, dass die neoadjuvante α PD1/G Therapie eine CD8 T Zellantwort stimuliert, sollte diese These durch einen tumorantigen-exprimierenden Tumor untersucht werden. Hierzu wurde zusätzlich zur Überexpression von Kras^{G12V} und der Akt2 Aktivierung ein Plasmid zur Expression des Epitop-Tags des Neoantigens LAMA4-G1254V verwendet (Abbildung 30 A). Dies ermöglicht eine Stimulation der antigenerfahrenen CD8 T Zellen durch Inkubation mit spezifischem Peptid und anschließender Messung der induzierten Antwort in Form von IFN γ Expression. Hierbei eignet sich vor allem das beschriebene tumorspezifische mutierte Antigen Laminin 4 (LAMA4-G1254V) für die Analyse einer antitumoralen T Zellantwort (Gubin et al., 2014), da das Neoantigen eine hohe Affinität zu MHC I aufweist und hierbei nicht zu einer Abstoßung des Tumors führt. Zudem ist es im Gegensatz zu Ovalbumin (OVA), das häufig als Modellantigen verwendet wird, kein Xenogen. Für die Analyse der LAMA4 gerichteten CD8 T Zellantwort wurde entsprechend des vorher gezeigten Therapieschemas an Tag 20 nach der Elektroporation neoadjuvant mit Gemcitabine und α PD1 jeweils allein oder in Kombination therapiert, zudem blieb eine Gruppe unbehandelt. An Tag 8 der Therapie, entsprechend dem Resektionszeitpunkt, wurden der Primärtumor und die Milz isoliert und zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet. Diese wurden mit LAMA4-G1254V Peptid oder einem irrelevanten Kontrollpeptid über Nacht bei 37°C stimuliert, die Zugabe von Brefeldin A verhinderte die Ausschüttung des IFN γ . Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD90.2 und CD8 extrazellulär und intrazellulär gegen IFN γ gefärbt. Es wurde am Durchflusszytometer im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und anschließend auf die CD90.2⁺ Lymphozytenpopulation gated. Innerhalb der CD8⁺ Population wurde der Anteil an IFN γ ⁺ Zellen bestimmt (Abbildung 30 B).

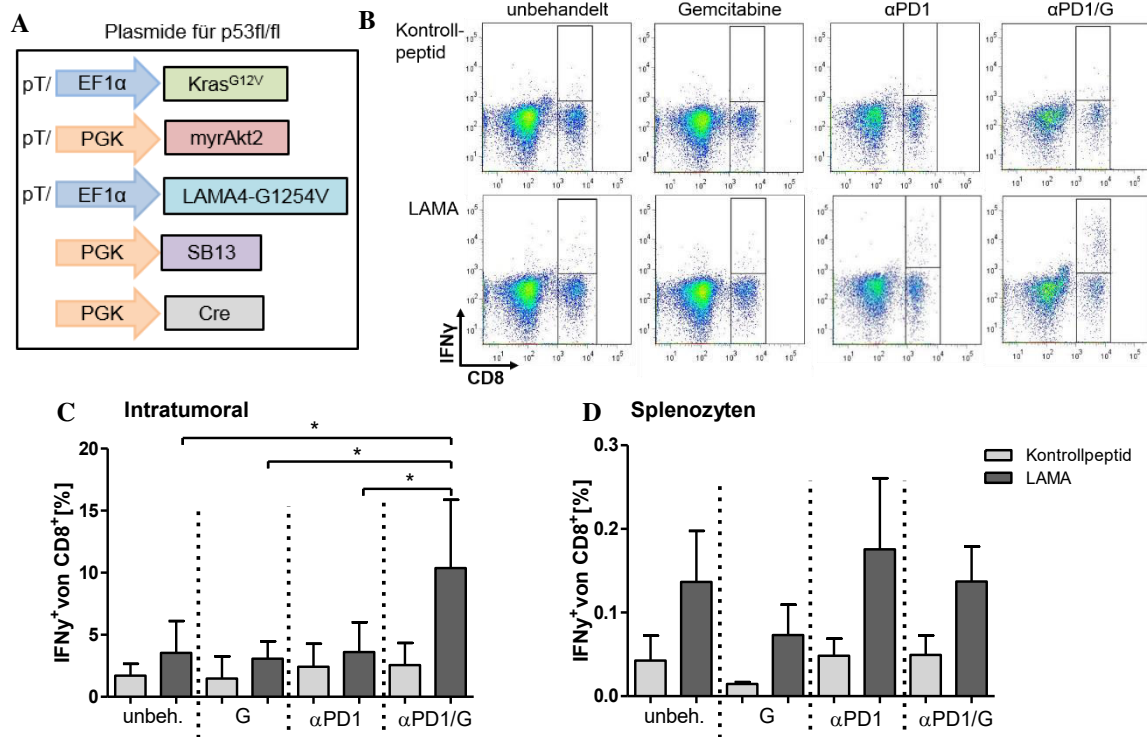


Abbildung 30 – Die neoadjuvante α PD1/G Therapie induziert eine lokale Neoantigen-spezifische CD8 T Zellantwort. Es wurde zusätzlich zur $Kras^{G12V}$ und $myrAkt2$ Expression das Plasmid pT-LAMA4-G1254V verwendet, das zur Expression des neoantigenen Epitops LAMA4-G1254V im Tumor führt (A). Nach neoadjuvanter Therapie mit α PD1 und Gemcitabine als Monotherapie oder in Kombination zu den in Abbildung 22 A dargestellten Zeitpunkten und bei einer unbehandelten Gruppe wurden die Tumore und die Milzen der Mäuse isoliert und zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit Kontroll- oder LAMA4(G1254V) Peptid stimuliert und am folgenden Tag mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD90.2 und CD8 extrazellulär und gegen $IFN\gamma$ intrazellulär gefärbt. Es wurde im FSC/SSC auf lebende Zellen und mit CD90.2 auf Lymphozyten gated. (B) zeigt die repräsentativen Dotplots der intratumoralen Analyse der $IFN\gamma^+$ CD8 T Zellen in den unterschiedlichen Gruppen. Die Quantifizierung ist in (C) für die intratumorale und in (D) für die Analyse der Immunzellen aus der Milz gezeigt. Gruppengröße: unbehandelt n=6; G n=5; α PD1 n=5; α PD1/G n=7. *p=0,01-0,05. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Die neoadjuvante Therapie mit der Kombination von α PD1 und Gemcitabine (α PD1/G) führte im Tumor zu einer deutlich erhöhten Frequenz an $CD8^+$ T Zellen, die auf Stimulation mit LAMA Peptid reagierte. Hier konnten bei α PD1/G deutlich erhöhte Frequenzen an $IFN\gamma^+$ CD8 T Zellen im Vergleich zu den Monotherapien und der unbehandelten Gruppe festgestellt werden (Abbildung 30 B/C). Bei der Betrachtung der systemischen CD8 T Zellantwort, die über die Färbung der Splenozyten analysiert wurde, gab es in allen Gruppen eine vergleichbare, leicht erhöhte Frequenz an $IFN\gamma^+$ CD8 T Zellen nach Stimulation mit LAMA Peptid. Allerdings war diese insgesamt äußerst gering (unter 0,3%) (Abbildung 30 D).

Es ist bekannt, dass es als Reaktion auf die lokale Freisetzung von Zytokinen wie z.B. bei einer CD8 T Zellantwort zur Induktion von PD-L1 Expression auf Tumorzellen und auf Immunzellen im Tumorgewebe kommt (Zitvogel and Kroemer, 2012). Zur weiteren Analyse des therapeutischen Effekts der neoadjuvanten α PD1/G Behandlung wurde die PD-L1 Expression im Tumorgewebe nach verschiedenen neoadjuvanten Therapien immunhistochemisch untersucht (Abbildung 31 A). In der immunhistochemischen PD-L1 Färbung zeigte sich sowohl beim unbehandelten als auch beim Gemcitabine behandelten Tumor eine deutliche PD-L1 Expression im umliegenden Stroma, während

beim α PD1/G behandelten Tumor eine hohe Expression des Liganden auf den glandulären Tumorstrukturen zu finden ist und das Tumorstroma eher arm an PD-L1 erscheint. Um zu verifizieren, ob es sich hierbei um Tumorzellen handelt, wurde eine Kofärbung mit CK19, einem spezifischen Marker für Adenokarzinomzellen, durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei der Gemcitabinemonotherapie eine PD-L1 Expression auf den CK19 negativen Zellen im Stroma. Im Gegensatz dazu führt die neoadjuvante α PD1/G Therapie zur PD-L1 Expression auf den glandulären Tumorzellen, die positiv für CK19 sind (Abbildung 31 B).

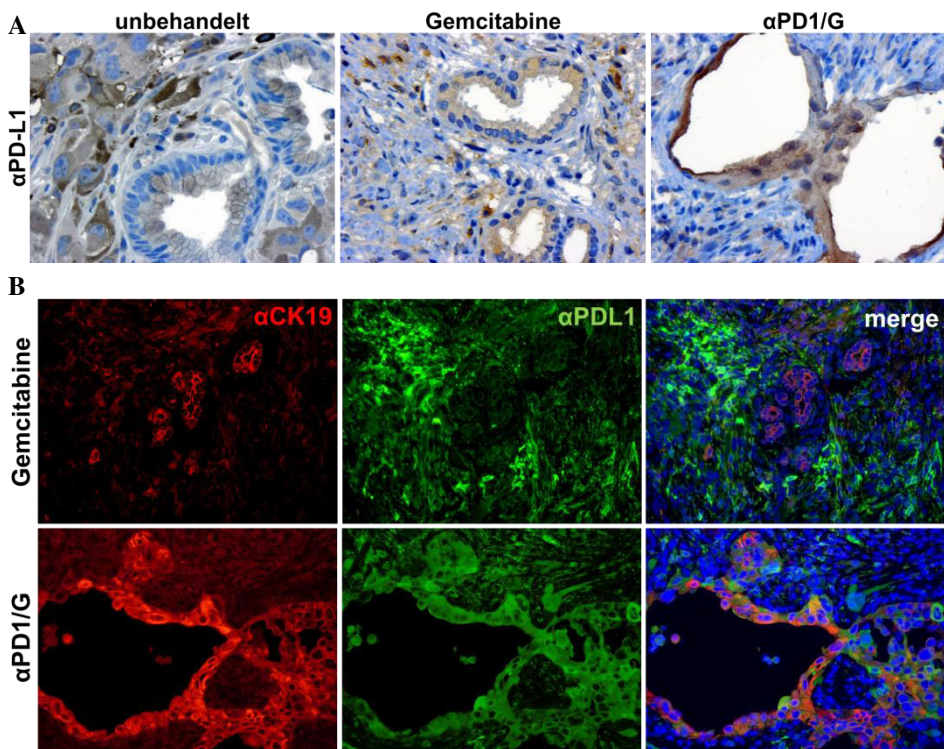


Abbildung 31 – In Reaktion auf die durch α PD1/G-vermittelte anti-tumorale T Zellantwort wird eine PD-L1 Expression auf den CK19 positiven Tumorzellen induziert.

Immunhistochemische PDL1 Färbung von unbehandelten Tumoren und Tumoren nach neoadjuvanter Gemcitabine bzw. α PD1/G Therapie (A). Das Tumorgewebe wurde mit einem Primärantikörper gegen PD-L1 und anschließend mit einem geeigneten biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Danach erfolgte die Färbung mit Avidin-HRP und DAB. (B) Ko-

expression von CK19 und PD-L1 auf Gemcitabine und α PD1/G behandelten Tumoren. Das Tumorgewebe wurde mit Primärantikörpern gegen CK19 und PD-L1 und geeigneten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Nach der Analyse der Expression am Fluoreszenzmikroskop wurden die Abbildungen zur Verdeutlichung von Koexpression überlagert (merge). 200x Vergrößerung. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Es konnte gezeigt werden, dass für eine effektive Induktion einer lokalen Tumorantigen-spezifischen T Zellantwort eine Kombination der PD1 Blockade mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine im neoadjuvanten Ansatz notwendig ist. Diese Kombinationstherapie resultierte außerdem in einer deutlichen PD-L1 Expression auf den Tumorzellen, im Gegensatz zur Monotherapie, wo ausschließlich eine Expression auf den Stromazellen zu beobachten war. Dies lässt vermuten, dass in Reaktion auf die lokale α PD1/G-induzierte antitumorale T Zellantwort und der daraus resultierenden $IFN\gamma$ Ausschüttung der CD8 T Zellen, die PD-L1 Expression auf den CK19-positiven Tumorzellen hochreguliert wird.

3.5.6. Der therapeutische Effekt der neoadjuvanten α PD1/G Therapie wird durch NK und CD8 T Zellen vermittelt

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.1. lassen den Schluss zu, dass die NK Zellen an den therapeutischen Effekten der Gemcitabintherapie beteiligt sind. Außerdem konnten sowohl bei der Untersuchung der Immunzellen aus Blut und Tumor (3.5.3) als auch bei der Analyse einer antitumoralen CD8 T Zellantwort (3.5.4.) deutliche Effekte der α PD1/G Therapie auf die CD8 T und NK Zellpopulation und z.T. der CD4 T Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund dessen sollte anhand von Depletionsversuchen die Rolle der CD4 T, CD8 T und NK Zellen in den unterschiedlichen Phasen der α PD1/G Therapie untersucht werden. Diese wurden zuerst während der neoadjuvanten Phase depletiert. Hierzu erfolgte die Applikation der depletierenden Antikörper oder des korrespondierenden Isotyps zeitgleich mit der neoadjuvanten α PD1/G Therapie (Abbildung 32 A). Anschließend wurden alle Gruppen zu den angegebenen Zeitpunkten adjuvant mit Gemcitabine behandelt.

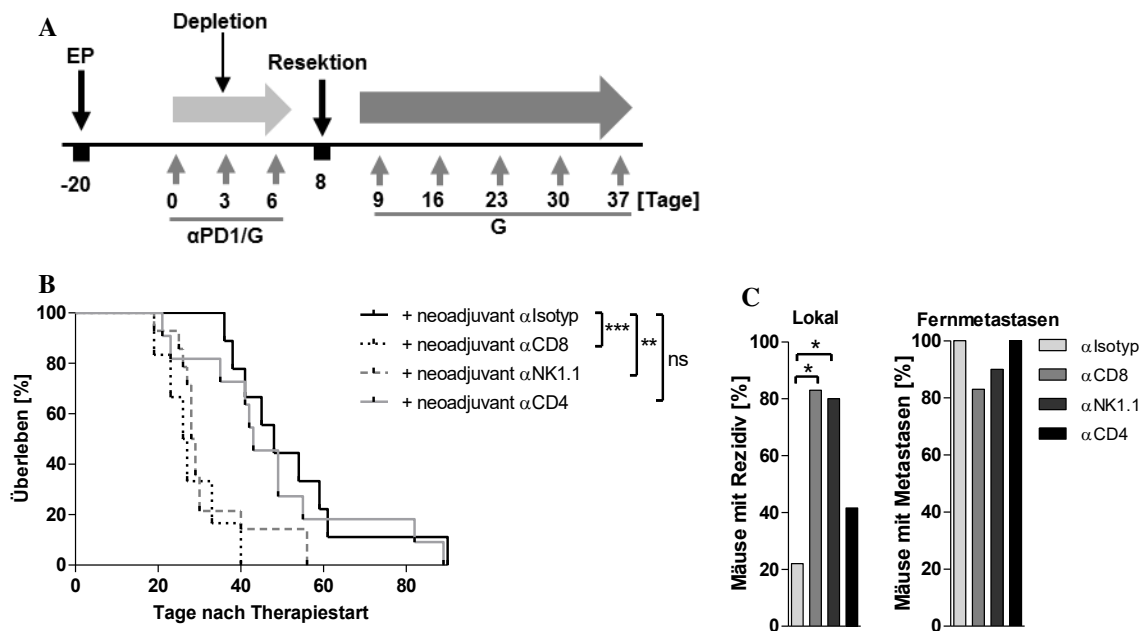


Abbildung 32 – Sowohl CD8 T- als auch NK Zellen sind in der neoadjuvanten Therapiephase entscheidend für die therapeutische Reduktion der Lokalrezidivierung. Während der neoadjuvanten α PD1/G Therapie, die 20 Tage nach Tumorinduktion beginnt, wurden CD8, CD4 T- bzw. NK Zellen depletiert, hierzu wurden an den angegebenen Tagen zusätzlich zu α PD1/G depletierende Antikörper für CD8, CD4 T- oder NK Zellen bzw. eine Isotypkontrolle i.p. appliziert. Adjuvant wurden alle Mäuse mit Gemcitabine behandelt. Das Therapieschema ist in (A) dargestellt. Das Überleben der unterschiedlichen Gruppen (B) und das lokale Tumoraufreten sowie die Fernmetastasierung (C) wurden untersucht. Leber- und Lungenmetastasen sowie Peritonealkarzinosen wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Gruppengröße: α Isotyp n=9; α CD8 n=6; α NK1.1 n=10, α CD4 n=11. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01; ***p<0,001. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Die Auswertung des Überlebens (Abbildung 32 B) zeigt, dass die Depletion der CD4 T Zellen keinen Einfluss auf den therapeutischen Effekt der neoadjuvanten Therapie hat. Das mittlere Überleben entsprach mit 43 Tagen in etwa dem Wert der Isotypkontrolle (45 d) und es konnte weder ein Anstieg in der Lokalrezidivierungsrate noch ein Einfluss auf die Frequenz der Fernmetastasen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte sowohl die NK als auch die CD8 Depletion zu einem signifikant verkürzten Überleben. Im Vergleich zur Isotypkontrolle mit einem mittleren Überleben von 45 Tagen

verkürzte sich das mittlere Überleben bei einer Depletion von CD8 T Zellen auf 27 Tage und von NK Zellen auf 28 Tage. Die Frequenz der Lokalrezidivierung stieg durch CD8 bzw. NK Zelldepletion deutlich auf circa 80% an (Abbildung 32 C), während die Häufigkeit der Fernmetastasierung durch die Depletionen nicht beeinflusst wurde. Der signifikante Anstieg bei der Lokalrezidivierung steht im Einklang mit der deutlich verkürzten Überlebensdauer in den CD8 T Zell- und NK Zell-depletierten Gruppen. Die Versuche verdeutlichen, dass sowohl die CD8 T als auch die NK Zellen eine entscheidende Rolle für den α PD1/G-vermittelten therapeutischen Effekt in der neoadjuvanten Therapiephase spielen. Hierbei hebt die Depletion vor allem die lokale, Rezidiv-verringende Wirkung auf, was sich negativ auf das Überleben der Mäuse auswirkt.

3.5.7. In der adjuvanten Therapiephase sind die NK Zellen für die Verhinderung der Lokalrezidivierung besonders relevant

In einem zweiten Versuch sollte untersucht werden, ob die gleichen Immunzellen, denen eine Rolle in der neoadjuvanten Phase für den therapeutischen Effekt nachgewiesen werden konnte, auch in der adjuvanten Phase der Therapie beteiligt sind. Hierzu wurden in der adjuvanten Therapiephase nach vorangegangener neoadjuvanter α PD1/G Therapie die NK, CD4 bzw. CD8 T Zellen depletiert, um die Rolle dieser Immunzellen nach der Tumorresektion genauer zu untersuchen.

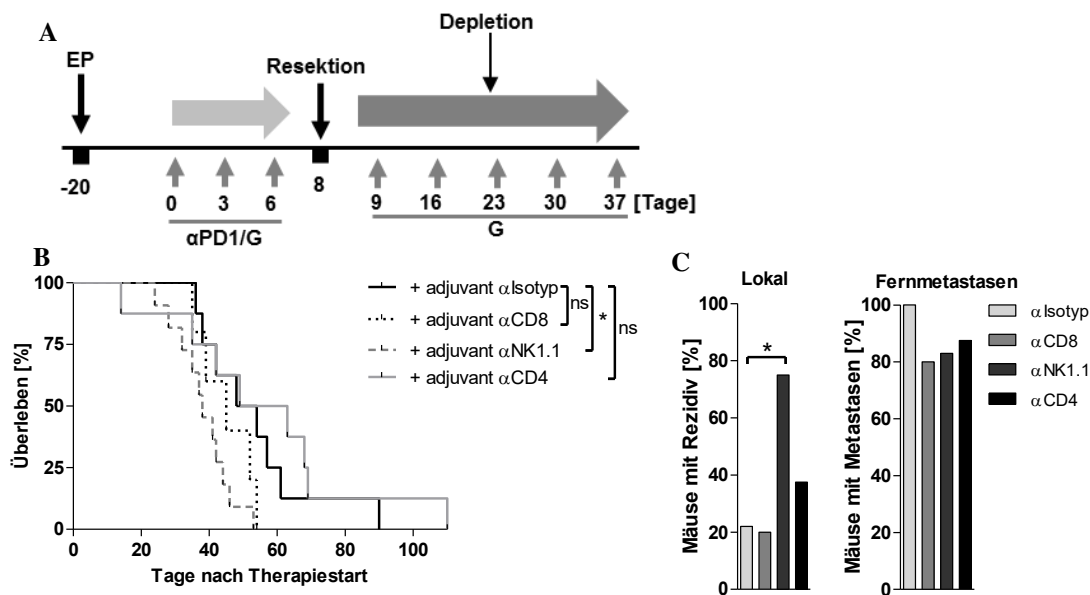


Abbildung 33 – Die Reduktion der Lokalrezidivierung ist in der adjuvanten Phase deutlich abhängig von NK Zellen. 20 Tage nach der Tumorinduktion wurde bei allen Gruppen die neoadjuvante Therapie mit α PD1/G begonnen; an Tag 8 nach Therapiebeginn wurde der Tumor reseziert und anschließend erfolgte die Behandlung mit Gemcitabine. Während dieser adjuvanten Gemcitabinetherapie wurden die NK, CD4 oder CD8 T Zellen depletiert, hierzu wurden depletierende Antikörper zweimal pro Woche für insgesamt 6 mal, i.p. verabreicht. Schematische Darstellung der Therapie (A). Es wurde der Einfluss der Depletion auf das Überleben (B) und auf die lokale Tumorentstehung (C) sowie die Disseminierung untersucht. Als Fernmetastasen wurden Metastasen in Leber, Lunge und Peritonealraum zusammengefasst. Gruppengröße: α Isotyp n=8; α CD8 n=5; α NK1.1 n=12, α CD4 n=8. *p=0,01-0,05. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Es wurde bei allen Gruppen wie zuvor beschrieben neoadjuvant mit α PD1/G behandelt und an Tag 8 der Therapie der Tumor reseziert. Nachfolgend zur Resektion wurde adjuvant wie dargestellt mit Gemcitabine therapiert, zeitgleich wurden durch Applikation von Depletionsantikörpern oder

korrespondierenden Isotypen zweimal wöchentlich über insgesamt drei Wochen die NK, CD4 bzw. CD8 T Zellen in der adjuvanten Therapiephase depletiert (Abbildung 33 A). Sowohl die Depletion der CD8 T als auch der CD4 T Zellen hatte weder einen Effekt auf das Überleben noch auf die Lokalrezidivierung oder Fernmetastasierung (Abbildung 33). Im Gegensatz dazu konnte bei der Depletion der NK Zellen ein deutlich verkürztes mittleres Überleben von 38 Tagen im Vergleich zum Isotyp mit 46,5 Tagen beobachtet werden (Abbildung 33 B). Zudem hatte die NK Zelldepletion einen signifikanten Effekt auf die Frequenz des Auftretens von Lokalrezidiven und führte zu einem deutlichen Anstieg in der Frequenz auf 75% (Abbildung 33 C). Ein Einfluss auf die Fernmetastasen konnte hierbei nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass in der neoadjuvanten Phase sowohl die CD8 T Zell- als auch die NK Zellantwort für den erzielten therapeutischen Effekt notwendig ist. Interessanterweise ist in der adjuvanten Phase hauptsächlich die NK Zellantwort an dem reduktiven Einfluss auf die Lokalrezidivierung beteiligt, wohingegen die CD8 T Zellen in der Phase nach der Resektion keine entscheidende Rolle spielen.

3.5.8. Analyse der Immunzellpopulationen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und anschließender Resektion

Die Depletionsversuche verdeutlichen, dass sich die Immunzellen, die für den therapeutischen Effekt der neoadjuvanten α PD1/G Therapie verantwortlich sind, in der prä- bzw. postoperativen Phase unterscheiden. Während in der neoadjuvanten Phase sowohl CD8 T als auch NK Zellen entscheidend sind, sind in der adjuvanten Phase hauptsächlich die NK Zellen relevant für den Therapieerfolg. Um den Einfluss der Therapie auf die Immunzellpopulationen nach der Resektion genauer zu adressieren, wurden die Immunzellen in der postoperativen Phase untersucht. Hierbei wurden zunächst aufgrund der deutlichen lokalen therapeutischen Effekte die Immunzellen im Resektionsrand analysiert. Zudem sollten die systemischen Effekte der neoadjuvanten Therapie über die Analyse der Immunzellen im Blut untersucht werden. Hierzu wurde mit α PD1, Gemcitabine oder α PD1/G therapiert und nach der Tumorresektion an Tag 9 der Therapie adjuvant mit Gemcitabine behandelt, eine Gruppe blieb untherapiert. Am folgenden Tag wurden das Blut und der Resektionsrand isoliert und nach Aufreinigung und Färbung wurden die Immunzellen am Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 34).

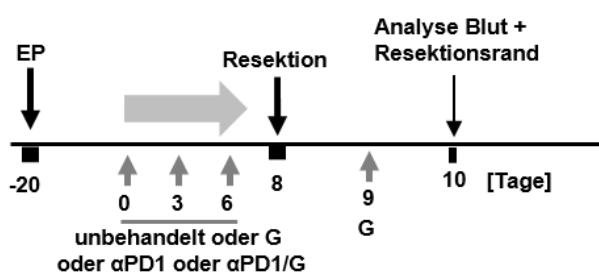


Abbildung 34 – Schematischer Ablauf der Immunzellanalyse in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie. Nach der Tumorinduktion wurde mit α PD1 und Gemcitabine als Monotherapie oder in Kombination zu den angegebenen Zeitpunkten behandelt, wobei eine Gruppe untherapiert blieb. Nach der Resektion wurde allen therapierten Gruppen an Tag 9 Gemcitabine appliziert. Am Tag 10 nach Therapiestart wurden die Immunzellen aus Blut und Resektionsrand isoliert und am Durchflusszytometer analysiert.

Für die Analyse der T Zellpopulationen wurde mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD8 und CD4 gefärbt und die Frequenz der CD45.2⁺ Leukozytenpopulation bestimmt. Zudem wurde das

Verhältnis von CD8⁺/CD4⁺ bestimmt. Bei der Analyse der CD4 T Zellen konnte im Blut kein deutlicher Unterschied zwischen den therapierten Gruppen festgestellt werden (Abbildung 35 B/D). Die Untersuchung der CD8 T Zellen im Blut ergab bei der unbehandelten und bei den monotherapierten Gruppen Frequenzen von 14-17%, bei der neoadjuvant αPD1/G therapierten Gruppe konnte mit 25% eine deutlich erhöhte Frequenz an CD8⁺ T Zellen festgestellt werden (Abbildung 35 A/C). Im Resektionsrand bewirkte die αPD1 Gabe einen leichten Anstieg der CD8 T Zellpopulation im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Im Resektionsrand wurde nach der Therapie mit αPD1/G und bei der unbehandelten Gruppe die geringste Frequenz (5%) an CD4 T Zellen beobachtet, diese war bei den Monotherapien mit 10% in etwa doppelt so hoch (Abbildung 35 B/D). Das Verhältnis von CD8 zu CD4 T Zellen lag im Blut knapp über eins, mit einem tendenziell besseren Verhältnis nach αPD1/G Therapie (Abbildung 35 E). Bei der Analyse im Resektionsrand konnte ein signifikant besseres CD8⁺/CD4⁺ Verhältnis nach αPD1/G Therapie im Vergleich zu allen anderen Gruppen festgestellt werden, was einen Hinweis für ein therapeutisches Ansprechen in dieser Gruppe gibt.

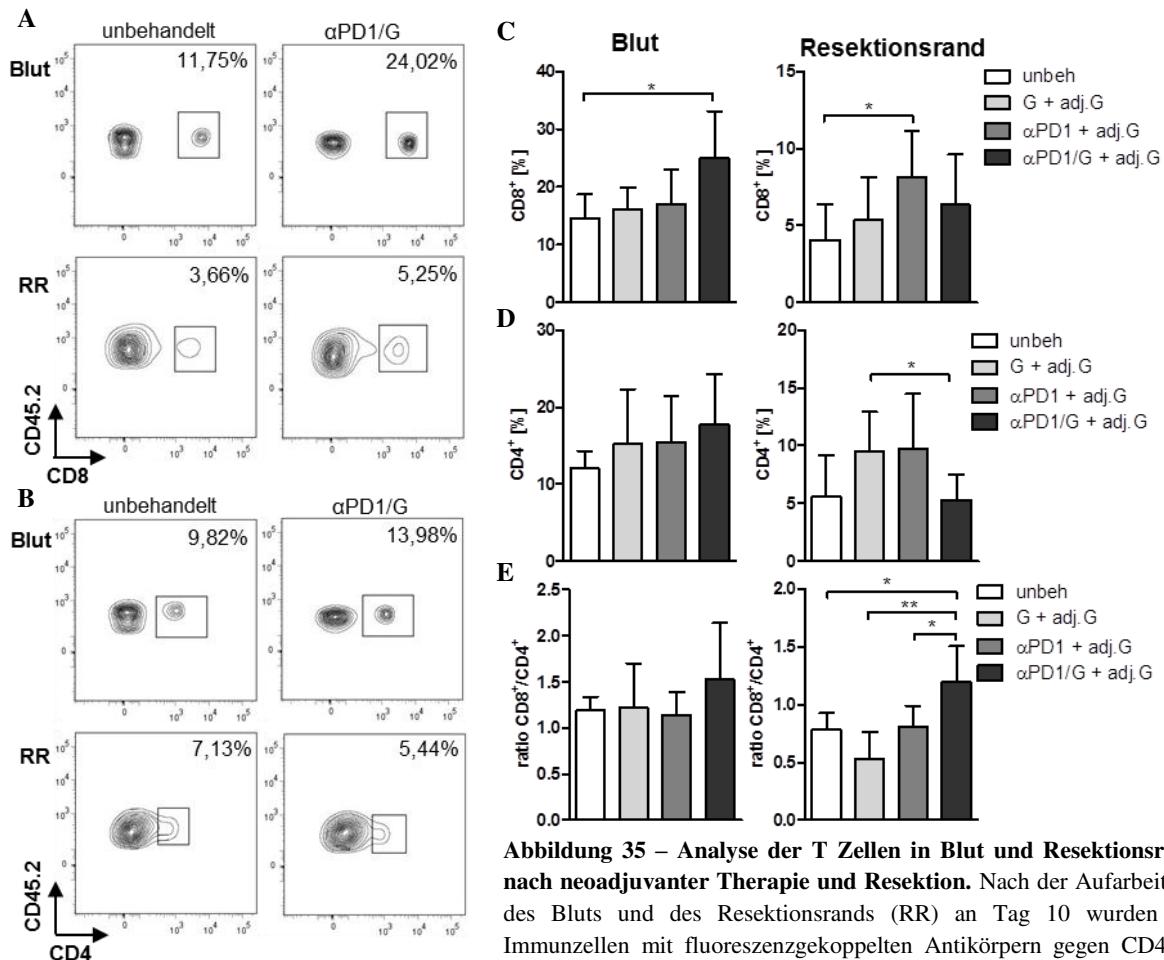


Abbildung 35 – Analyse der T Zellen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion. Nach der Aufarbeitung des Bluts und des Resektionsrands (RR) an Tag 10 wurden die Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD8 und CD4 gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Es sind exemplarische Contourplots der CD8 Population (A) und der CD4 Population (B) bei der unbehandelten und αPD1/G behandelten Gruppe in Blut und Resektionsrand gezeigt. Es wurde der Anteil an CD8⁺ (C) und CD4⁺ T Zellen (D) der CD45.2 Population bestimmt und die Ratio (E) aus beidem gebildet. Gruppengröße: unbeh. n=5; G n=5; αPD1 n=6; αPD1/G n=6. *p=0,01-0,05

Im Resektionsrand wurde zudem die Frequenz der residenten tumorspezifischen CD8⁺CD103⁺ T Zellen untersucht (Djenidi et al., 2015), die, wie in 3.5.3 gezeigt, durch neoadjuvante α PD1 und α PD1/G Therapie im Tumor deutlich erhöht war. Auch nach der Tumorresektion ist die Frequenz dieser T Zellen lokal im Resektionsrand sowohl bei neoadjuvanter α PD1 als auch bei der Kombinationstherapie α PD1/G signifikant erhöht (Abbildung 36 A/B). Hierbei führte α PD1/G zu einem Anstieg der Frequenz von 15% (unbehandelten Gruppe) auf mehr als das doppelte (35%).

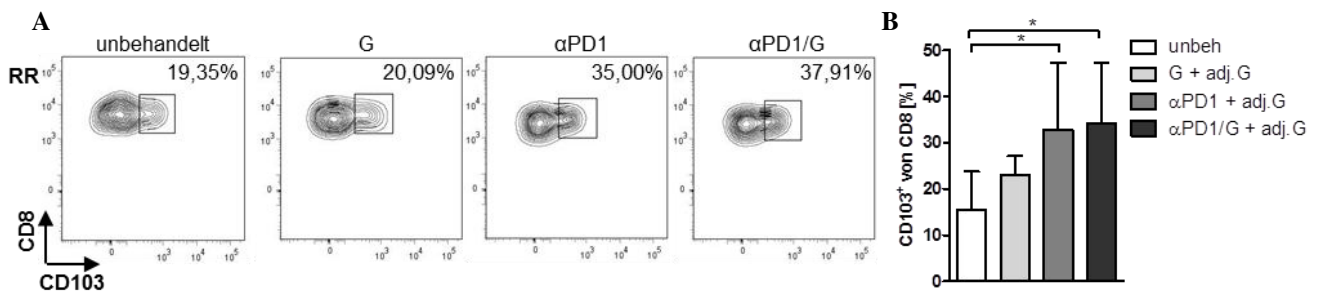


Abbildung 36 –Die neoadjuvante Therapie mit α PD1 und α PD1/G erhöht die CD8⁺CD103⁺ Frequenz im Resektionsrand. Der an Tag 10 isolierte Resektionsrand wurde zur Einzelzellsuspension aufgearbeitet und anschließend mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD90.2, CD8 und CD103 gefärbt. Nachfolgend zum Gating auf die lebenden Zellen im FSC/SSC und auf die CD90.2 positiven Lymphozyten wurde die CD103⁺ Population der CD8⁺ T Zellen analysiert. Exemplarische Contourplots der CD8 CD103 Expression sind in (A) gezeigt. Es wurde die Frequenz an CD103⁺ Zellen der CD8⁺ T Zellpopulation bestimmt (B). Gruppengröße: unbeh. n=5; G n=5; α PD1 n=6; α PD1/G n=6. *p=0,01-0,05

Bei der Analyse der NK Zellen wurde zum einen die Frequenz der Gesamtpopulation an NK1.1⁺ Zellen als auch der doppelt positiven, zirkulierenden NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen von den CD45.2⁺ Leukozyten bestimmt (Abbildung 37). Im Resektionsrand führte lediglich die Gemcitabinemonotherapie zu einer tendenziell erhöhten Frequenz der NK1.1⁺ und der zirkulierenden NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen. Im Gegensatz dazu führte die neoadjuvante Kombination von α PD1 und Gemcitabine (α PD1/G) im Blut zu einer signifikant erhöhten Frequenz der NK1.1 und der NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen im Vergleich zu der unbehandelten und den monotherapierten Gruppen.

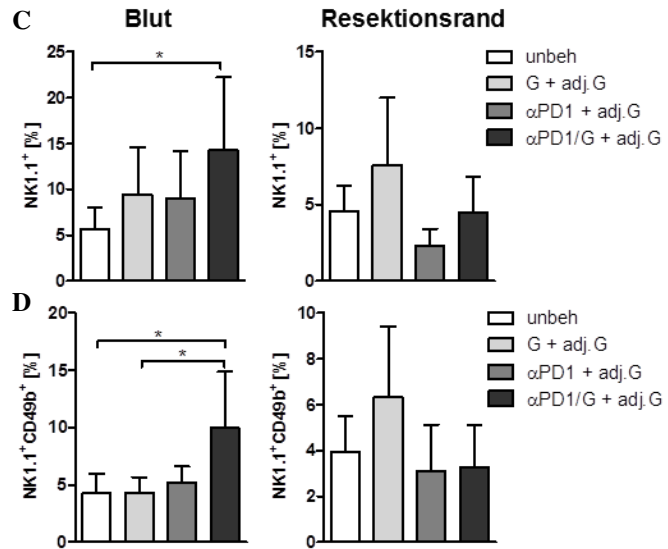
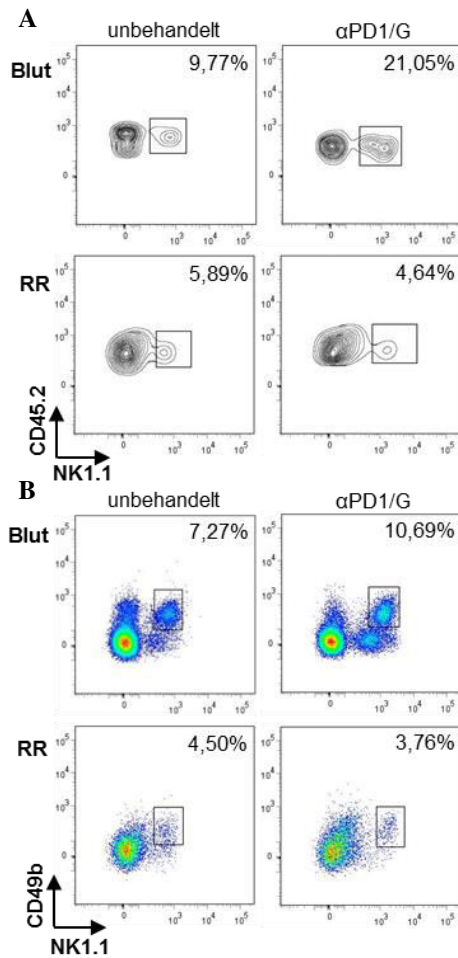


Abbildung 37 – Untersuchung der NK Zellen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion. An Tag 10 nach Therapiestart erfolgte die Isolation und Aufarbeitung des Bluts und des Resektionsrands (RR). Anschließend wurden die Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, NK1.1 und CD49b gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Exemplarische Plots der unbehandelten und αPD1/G behandelten Gruppe zeigen die NK1.1⁺ (A) und die NK1.1⁺CD49b⁺ Population (B) in Blut und Resektionsrand. Es wurde der Anteil an NK1.1⁺ (C) und NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen der CD45.2 Population bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=5; G n=5; αPD1 n=6; αPD1/G n=6. *p=0,01-0,05

Für die Betrachtung der myeloiden Zellen wurden die Immunzellen aus Blut und Resektionsrand gegen CD45.2, CD11b, Gr1 und F4/80 gefärbt. Hierbei wurde zuerst im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Zunächst wurden die MDSCs untersucht, die durch Expression von CD11b und Gr1 charakterisiert sind (Abbildung 38). Im Blut konnte eine leicht verringerte Frequenz an Gr1⁺CD11b⁺ Zellen nach Gemcitabine und αPD1/G beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die Frequenz an MDSCs im Resektionsrand insgesamt sehr hoch (in allen Gruppen bei circa 40%) und wurde nicht durch die Therapien beeinflusst. Die MDSC Frequenz ist im Resektionsrand auch im Vergleich zu der Frequenz im Primärtumor (Abbildung 27) deutlich erhöht, was vermutlich auf einen, durch die Resektion bedingten, Wundheilungseffekt zurückzuführen ist.

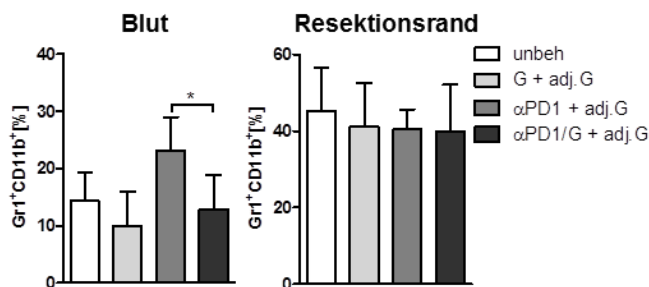


Abbildung 38 - Analyse der Gr1⁺CD11b⁺ MDSCs in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion. Blut und Resektionsrand wurden an Tag 10 des oben dargestellten Versuchsablaufs isoliert und aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Färbung der Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD11b und Gr1. Im FSC/SSC wurde auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. Es wurde der Anteil an Gr1⁺CD11b⁺ Zellen der CD45.2⁺ Population in Blut und Resektionsrand bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=5; G n=5; αPD1 n=6; αPD1/G n=6. *p=0,01-0,05

Zusätzlich wurde der Einfluss der Therapien auf die verschiedenen myeloiden Subpopulationen untersucht, hierzu wurde auf CD11b gated, anschließend Gr1 gegen F4/80 aufgetragen und der prozentuale Anteil der Subpopulationen von der CD45.2 Population bestimmt (Abbildung 39).

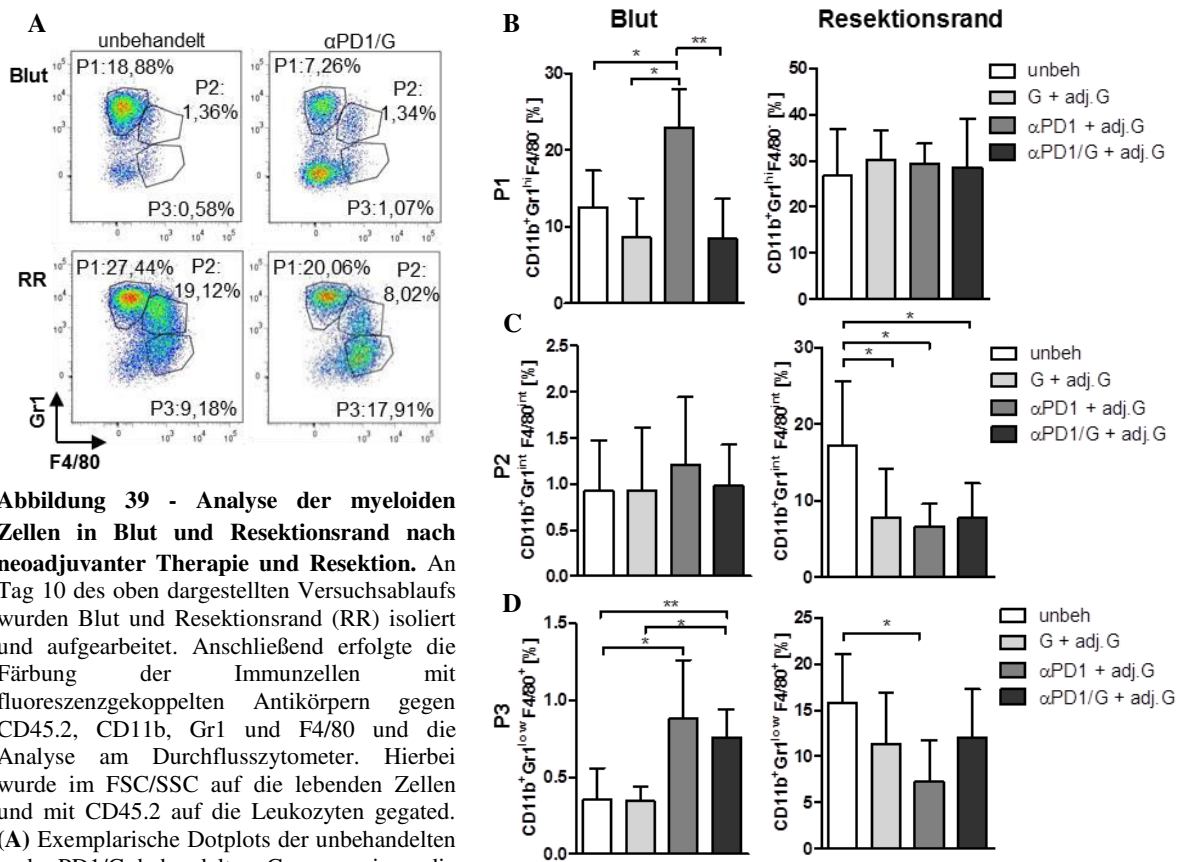


Abbildung 39 - Analyse der myeloiden Zellen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion. An Tag 10 des oben dargestellten Versuchsablaufs wurden Blut und Resektionsrand (RR) isoliert und aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Färbung der Immunzellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, CD11b, Gr1 und F4/80 und die Analyse am Durchflusszytometer. Hierbei wurde im FSC/SSC auf die lebenden Zellen und mit CD45.2 auf die Leukozyten gated. (A) Exemplarische Dotplots der unbehandelten und α PD1/G behandelten Gruppe zeigen die Gr1 und F4/80 exprimierenden Populationen in Blut und Resektionsrand (RR). Es wurde der Anteil an P1: CD11b⁺Gr1^{hi}F4/80⁺ (B), P2: CD11b⁺Gr1^{int}F4/80^{int} (C) und P3: CD11b⁺Gr1^{low}F4/80⁺ (D) der CD45.2⁺ Population bestimmt. Gruppengröße: unbeh. n=5; G n=5; α PD1 n=6; α PD1/G n=6. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01; ***p<0,001

Bei der Betrachtung der Population P1 (Abbildung 39 B), bei der es sich hauptsächlich um Granulozyten handelt und die durch eine CD11b und eine hohe Gr1 Expression gekennzeichnet ist, zeigt sich im Blut eine deutliche Beeinflussung durch die α PD1 Therapie. Hier führt die Therapie zu einem signifikanten Anstieg in der Frequenz im Vergleich zu den anderen neoadjuvanten Therapien bzw. der unbehandelten Gruppe. Im Resektionsrand zeigt sich die Frequenz der Population durch die Therapien unbeeinflusst und liegt in allen Gruppen bei circa 25%. Die Gr1^{int}F4/80^{int} Population (P2) (Abbildung 39 C), die ein stark immunsuppressives Potential aufweist, ist im Blut mit einer Frequenz von etwa 1% in allen Gruppen gering vorhanden. Im Resektionsrand bewirkt die Therapie in allen Gruppen eine deutliche Reduktion dieser suppressiven Zellpopulation im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Dies ist vermutlich bedingt durch die Gemcitabinegabe nach der Resektion an Tag 9. In 3.4.1. und 3.5.3. konnte bereits der reduktive Effekt von Gemcitabine auf diese Immunzellen gezeigt werden. Die Analyse der Population P3 (Abbildung 39 D) zeigt eine signifikant erhöhte Frequenz im Blut nach Kombinationstherapie mit α PD1/G und nach Therapie mit α PD1 im Vergleich zur unbehandelten und Gemcitabine behandelten Gruppe. Bei diesen F4/80 exprimierenden CD11b⁺ Zellen handelt es sich um

Vorläufer von Makrophagen. Im Resektionsrand wird diese Population durch die Therapien nur geringfügig beeinflusst, lediglich die α PD1 Gabe führte zu einer Reduktion der Population.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Kombinationstherapie mit α PD1/G auch nach der Resektion des Tumors die Frequenz an CD8 T und NK Zellen, die für eine effektive Eliminierung von Tumorzellen notwendig sind, lokal bzw. systemisch erhöht und gleichzeitig die Frequenz an immunsuppressiven myeloiden Zellen reduziert. In der Konsequenz kommt es vor allem zu einer lokalen Induktion der gewebspezifischen und antigenerfahrenen CD103⁺ CD8 T Zellen, die auch zuvor bei der Analyse der intratumoralen Immunzellen beobachtet werden konnte (Abschnitt 3.5.3.; Abbildung 25) und eine Erklärung dafür liefern könnte, warum primär lokale Effekte mit der Therapie erzielt werden.

3.5.9. Analyse der Expression von Immuzellliganden auf Tumorzellen

Die bisher gezeigten Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz der Immunzellen für die therapeutische Wirkung der neoadjuvanten α PD1/G Therapie. Durch die neoadjuvante PD1 Blockade wird lokal eine erhöhte Frequenz der gewebspezifischen CD103⁺ CD8 T Zellen induziert und in Kombination mit Gemcitabine führt dies zu einer messbaren, antitumoralen CD8 T Zellantwort. Ein Interaktionspartner von CD103 ist E-Cadherin und eine Interaktion ist für die zytotoxische Funktion der T Zelle notwendig (Le Floc'h et al., 2007), daher wurde untersucht, ob die induzierten Tumore dieses Oberflächenmolekül exprimieren. Hierzu wurden isolierte Primärtumore immunhistochemisch für E-Cadherin gefärbt (Abbildung 40 A). Während gesundes Pankreasgewebe eine starke E-Cadherin Expression aufweist, wird im Tumorstroma kein E-Cadherin exprimiert. Im Gegensatz dazu weisen die duktaalen Tumorstrukturen eine deutliche E-Cadherin Expression auf. Dies zeigt, dass die Tumorstrukturen zugänglich für eine Interaktion mit CD103 sind und dass die CD8 T Zellen über diese Struktur eine Effektorfunktion ausüben können.

Die Depletionsversuche gaben einen Hinweis auf die Bedeutung der NK Zellen für den therapeutischen Effekt in der postoperativen Phase der Gemcitabinetherapie. Daher sollten die Tumorzellen auf die Expression von NK Zell-Interaktionspartnern untersucht werden mit dem Ziel, neue therapeutische Angriffspunkte zu finden, um die T Zellorientierte neoadjuvante α PD1/G Therapie zu komplementieren und systemische Effekte zu erzielen, die auch Fernmetastasen bekämpfen. Hierfür wurden die Tumorzellen, die aus einem induzierten Primärtumor gewonnen und anschließend kultiviert wurden, nach der Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern am Durchflusszytometer untersucht. Es konnte keine Expression der NK Zellliganden Mult1 und Rae1 γ festgestellt werden, zudem wiesen die Zellen nur eine geringe Expression von MHC I und PD-L1 auf (Abbildung 40 B). Bei der Analyse von CD155 konnte eine starke Expression des Liganden auf der Zelloberfläche der Tumorzellen festgestellt werden (Abbildung 40 C). Zudem zeigte eine Analyse von Tumorzellen, die aus Lokalrezidiven und Lebermetastasen gewonnen und anschließend kultiviert wurden, auch auf diesen Zellen eine hohe Expression dieser Struktur. CD155 interagiert mit CD96, dieser Rezeptor ist unter anderem auf der Oberfläche von NK Zellen zu finden und hat einen

inhibitorischen Effekt (Chan et al., 2014). Eine Inhibition dieser Interaktion könnte sich daher für eine Stimulation der NK Zellen eignen.

Sowohl die Analysen der Immunzellpopulationen als auch die Depletionsversuche verdeutlichen die Rolle der NK Zellen an den durch die α PD1/G Therapie-vermittelten lokalen antitumoralen Effekten. Bevor über die die ermittelte therapeutische Achse eine mögliche Stimulation der NK Zellen induziert werden konnte, sollte verifiziert werden ob die NK Zellen dazu in der Lage sind eine zytotoxische Aktivität gegenüber den durch die Elektroporation induzierten Tumorzellen auszuüben.

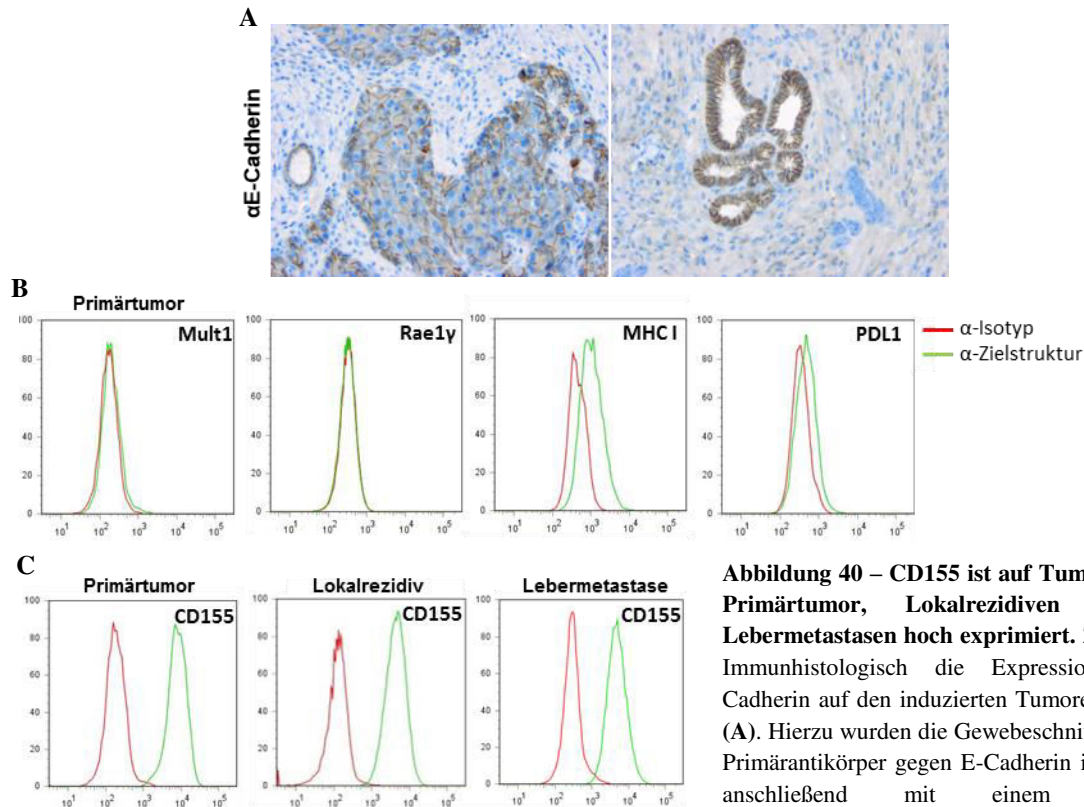


Abbildung 40 – CD155 ist auf Tumorzellen aus Primärtumor, Lokalrezidiven und auf Lebermetastasen hoch exprimiert. Zuerst wurde Immunhistologisch die Expression von E-Cadherin auf den induzierten Tumoren untersucht (A). Hierzu wurden die Gewebeschnitte mit einem Primärantikörper gegen E-Cadherin inkubiert und anschließend mit einem geeigneten Sekundärantikörper mit DAB gefärbt. Für die

Analyse der Immunzellliganden wurden die Tumorzellen aus den per Elektroporation induzierten Primärtumoren in Kultur genommen. Es wurde die Expression von MHC1, PD-L1 und der NK Zellliganden Mult1, Rae1 γ (B) und CD155 (C) untersucht. Hierzu wurden die Tumorzellen mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern oder den entsprechenden Isotypen gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Zudem wurde die CD155 Expression auf Tumorzellen, die aus einem Lokalrezidiv und einer Lebermetastase isoliert und anschließend kultiviert wurden, analysiert. Vergrößerung 200x. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Dies erfolgte durch eine Koinkubation von Tumorzellen mit isolierten NK Zellen und hierbei sollte untersucht werden, ob es *in vitro* eine Lyse der Tumorzellen durch die NK Zellen gibt. Hierzu wurden Luciferase-exprimierende Tumorzellen zu unterschiedlichen Verhältnissen mit NK Zellen gemischt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Überstand und im Zellysate wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Im Überstand konnte ein verhältnisabhängiger Anstieg und dementsprechend im Lysat eine Abnahme der Luciferaseaktivität festgestellt werden (Abbildung 41). Dies zeigt, dass die NK Zellen einen potentiell zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen haben.

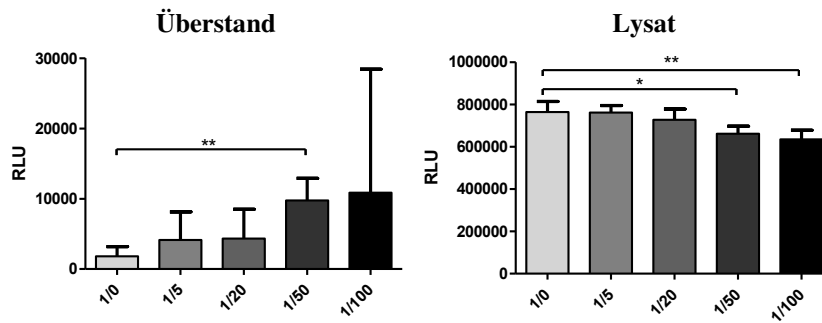


Abbildung 41 – Untersuchung der NK Zell-vermittelten Zytotoxizität *in vitro*. Nach Präparation einer Einzelzellsuspension aus Splenozyten wurden die NK Zellen über eine negative MACS Selektion isoliert. Diese wurden mit Luciferase exprimierenden Tumorzellen (p53-Akt2-Luc) in

unterschiedlichen Ziel/Effektor Verhältnissen (1/5,1/20,1/50,1/100) kokubiert. Die Überstände und die Zellysate wurden nach 4 h gesammelt, und es wurde die Luciferaseaktivität gemessen. RLU-*relative light units*. n=4, gemessen in Duplikaten. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

3.5.10. Adjuvante Blockade der NK Zellinhibition reduziert die Metastasierung

Aufgrund der deutlichen Expression von CD155 auf den Tumorzellen, was durch Interaktion mit CD96 einen inhibitorischen Effekt auf die NK Zell Aktivierung haben kann, bietet eine Blockade dieser Interaktion einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt zur NK Zell Stimulation. In den vorherigen Experimenten konnte eine stärkere Bedeutung der NK Zellen in der adjuvanten Therapiephase gezeigt werden, weshalb die CD96-CD155 Blockade mittels α CD96 Antikörper additiv in der adjuvanten Therapie eingesetzt wurde. Zuerst sollte der Effekt in einem komplett adjuvanten Ansatz untersucht werden. Hierzu wurde, wie zuvor beschrieben, ein Tumor durch Elektroporation induziert und nach 21 Tagen reseziert. Am folgenden Tag begann die Therapie bestehend aus zweimal wöchentlicher α CD96 Gabe über drei Wochen und Gemcitabinegabe einmal wöchentlich für sechs Wochen (Abbildung 42 A). Es wurde die Wirkung der α CD96 Antikörper 6A6 und 8B10 untersucht und mit der adjuvanten Gemcitabinetherapie (siehe 3.4.1) verglichen. Beide α CD96 Klone binden mit hoher Affinität an den Rezeptor CD96 (Meyer et al., 2009) jedoch nur der 6A6 Antikörper blockiert die Bindung des Rezeptors zu CD155 vollständig (Seth et al., 2007). Die Therapie mit 8B10 hatte weder einen positiven therapeutischen Effekt auf das Überleben noch auf die lokale oder disseminierte Tumorentstehung. Bei der 6A6 Therapie konnte bei 25% der Mäuse ein verlängertes Überleben im Vergleich zur konventionellen Gemcitabinetherapie beobachtet werden (Abbildung 42 B). Zudem zeigte sich ein deutlich reduktiver Effekt auf die Frequenz der Fernmetastasen, währenddessen die Frequenz der Lokalrezidivierung nicht beeinflusst wurde (Abbildung 42 C).

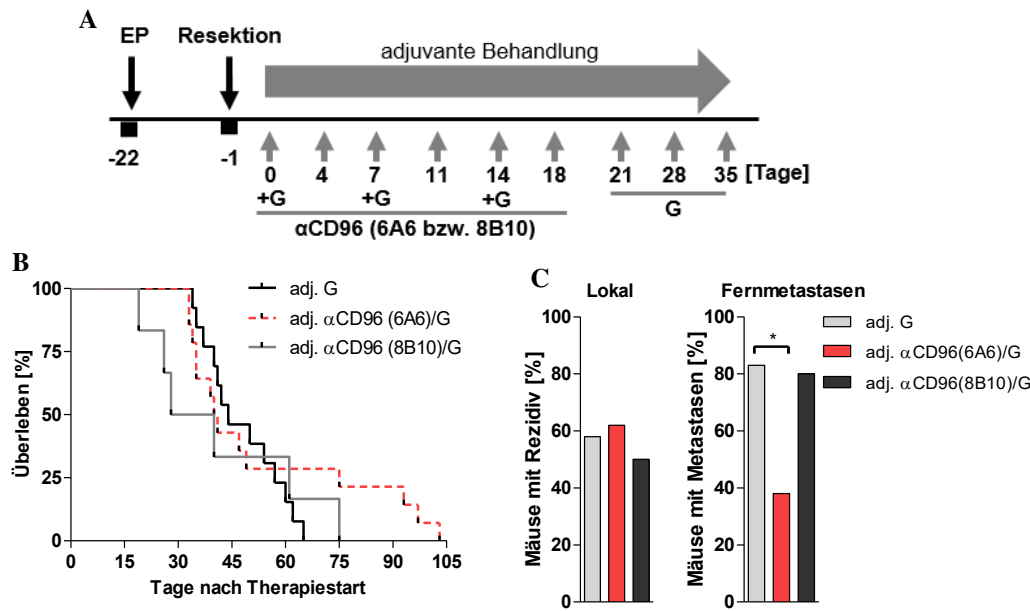


Abbildung 42 – Adjuvante Therapie mit dem CD96 Antikörper 6A6 reduziert die Frequenz an Fernmetastasen.

21 Tage nach der Elektroporation wurde der Tumor reseziert und am folgenden Tag startete die adjuvante αCD96/G Therapie. Die Wirkung von zwei unterschiedlichen αCD96 Antikörpern, 6A6 und 8B10, wurde untersucht. Diese wurden zweimal wöchentlich, insgesamt sechsmal, i.p. zu den angegebenen Zeitpunkten verabreicht. Zeitgleich wurde einmal wöchentlich wie dargestellt mit Gemcitabine (G) behandelt. (A) zeigt das zugrundeliegende Therapieschema. Es wurde der Einfluss der Therapie auf das Überleben (B) und die Frequenz an Lokalrezidiven und Metastasen (C) untersucht und mit den Ergebnissen nach adjuvanter Gemcitabinetherapie (Abschnitt 3.4.1, Abbildung 19, Gruppe $Kras^{G12V}+Akt2$) verglichen. Metastasen in Leber, Lunge und Peritonealraum wurden als Fernmetastasen zusammengefasst. Gruppengröße: adj. G n=13; adj αCD96 (6A6) n=14; adj. αCD96 (8B10) n=6. * p=0,01-0,05. (Bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

3.5.11. Sequenzieller Einsatz der neoadjuvanten CD8 T Zellstimulation mit adjuvanter Blockade der NK Zellinhibition führt zu progressionsfreiem Langzeitüberleben

Um den bestmöglichen therapeutischen Effekt zu erzielen wurden die CD96 Blockade, die einen deutlichen Einfluss auf die Metastasierung hatte, und die neoadjuvante αPD1/G Therapie, die eine Reduktion in der Frequenz der Lokalrezidive zur Folge hatte, mit dem Ziel kombiniert, die beiden therapeutischen Effekte zu verbinden. Die Therapie der Mäuse begann 20 Tage nach der Elektroporation mit neoadjuvanter αPD1/G Behandlung, dann erfolgte die Resektion des Tumors an Tag 8 der Therapie. Anschließend wurde adjuvant mit αCD96 und Gemcitabine behandelt. Hierzu wurden die blockierenden CD96 Antikörper zweimal wöchentlich über drei Wochen und Gemcitabine einmal wöchentlich über sieben Wochen zu den angegebenen Zeitpunkten verabreicht (Abbildung 43 A). Es wurde das Überleben und die Metastasierung für die Verwendung der unterschiedlichen αCD96 Antikörper 6A6 und 8B10 analysiert und mit den Ergebnissen der neoadjuvanten αPD1/G in Kombination mit adjuvanter Gemcitabinetherapie (siehe 3.5.2.) verglichen. Die zusätzliche Therapie mit dem 8B10 Antikörper führte mit einem mittleren Überleben von 64 Tagen zu einem verlängerten Überleben im Vergleich zur Gruppe mit neoadjuvanter αPD1/G und adjuvanter Gemcitabinetherapie (ms: 43,5 Tagen) (Abbildung 43 C). Die 8B10 Therapie resultierte in einer tendenziell erhöhten Frequenz an Lokalrezidiven aber in einer verringerten Frequenz bei der Fernmetastasierung (Abbildung 43 D). Die sequenzielle Therapie von αPD1/G und 6A6/G hatte einen erheblichen

therapeutischen Effekt und führte zu einer Verlängerung des mittleren Überlebens auf 87 Tage. Ganz besonders auffällig ist, dass die Therapie bei 35% der Mäuse zu einem Langzeitüberleben führte. Die Analyse der Lokalrezidivrate und der Fernmetastasierung zeigen, dass die α PD1/G+6A6/G Therapie in einer signifikanten Reduktion der Fernmetastasen auf 44% resultierte und insgesamt ein ausgeglicheneres Verhältnis in der Häufigkeit von Lokalrezidiven und Fernmetastasen vorlag. Um die Bedeutung der NK Zellen für diese Therapie zu verdeutlichen, wurden während der adjuvanten Therapiephase gleichzeitig mit der 6A6/Gemcitabinetherapie die NK Zellen für drei Wochen depletiert. Dies führte zu einem drastisch verkürzten Überleben und zu einem Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen in allen Mäusen dieser Gruppe. Dies zeigt, dass die NK Zellen eine entscheidende Rolle bei dem erzielten therapeutischen Erfolg spielen. Zusätzlich wurden die Auswirkungen der additiven α CD96 (6A6) Therapie auf die systemische NK Zellantwort untersucht, indem an Tag 21 der Therapie Blut von den therapierten Mäusen entnommen wurde (Abbildung 43 A). Zum Vergleich wurde Blut von Mäusen, die neoadjuvant mit α PD1/G behandelt wurden und adjuvant nur Gemcitabine erhalten haben, isoliert. Die durchflusszytometrische Analyse der NK Zellen zeigte nach 6A6 Therapie im Vergleich zur Gemcitabinetherapie sowohl eine deutlich erhöhte Frequenz der NK 1.1 positiven Gesamtpopulation als auch der zirkulierenden NK1.1⁺CD49b⁺ Population (Abbildung 43 B).

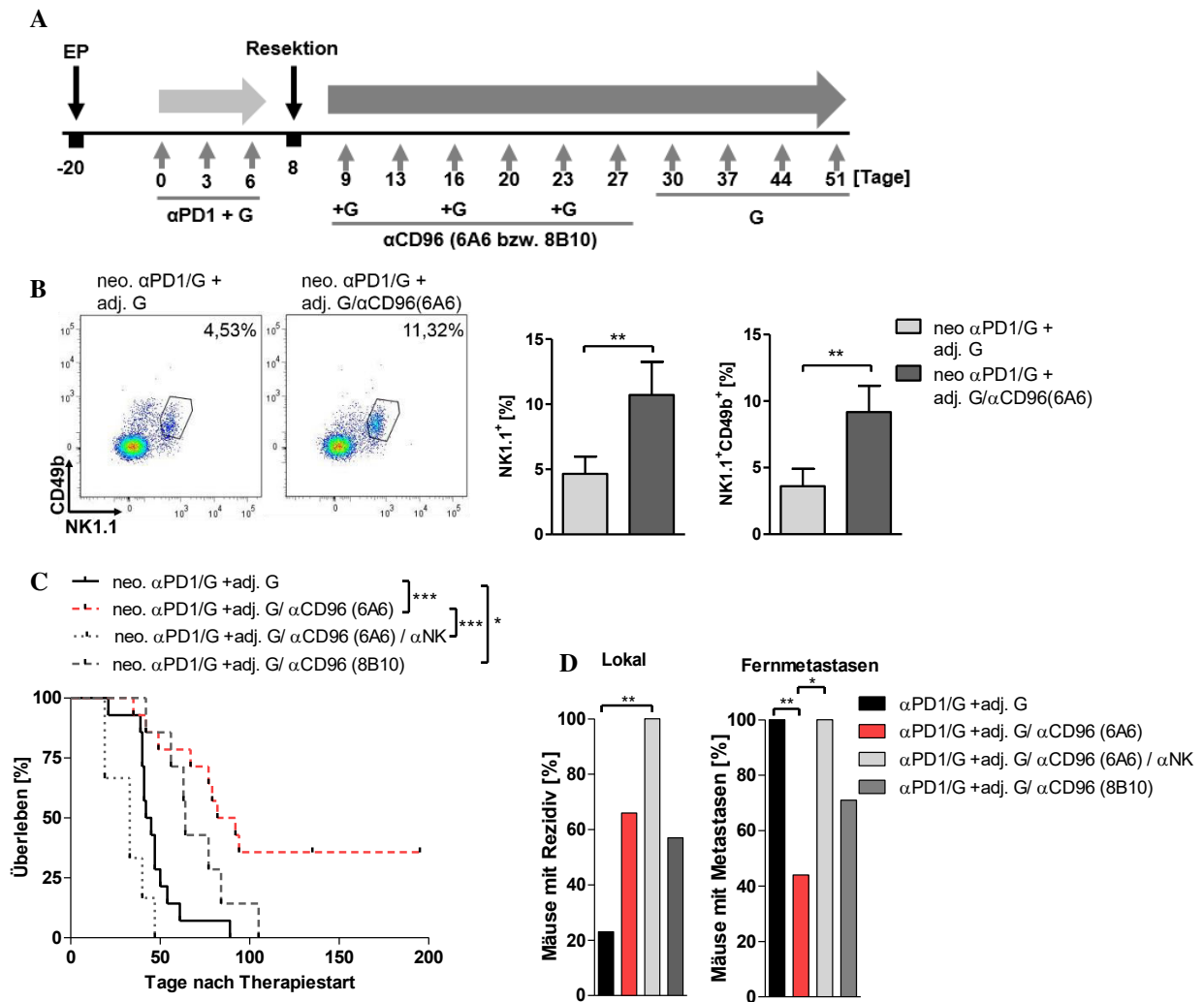


Abbildung 43 – Die gezielte Kombination von neoadjuvanten αPD1/G mit adjuvanter CD96 Blockade ermöglicht progressionsfreies Langzeitüberleben. In (A) ist das Behandlungsschema der sequenziellen Therapie gezeigt. Die neoadjuvante αPD1/G Behandlung begann an Tag 20 nach der Elektroporation. Nach dreimaliger Applikation erfolgte die Resektion. αCD96 wurde zweimal pro Woche, insgesamt sechsmal, adjuvant verabreicht. Zeitgleich wurde mit Gemcitabine einmal wöchentlich über sieben Wochen behandelt. Um den Effekt der CD96 Blockade auf die NK Zellen zu untersuchen wurde an Tag 21 der Therapie (nach viermaliger αCD96 Gabe) Blut entnommen und zur durchflusszytometrischen Analyse mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD45.2, NK1.1 und CD49b gefärbt. Als Kontrolle wurde das Blut von Mäusen, die neoadjuvant αPD1/G und adjuvant Gemcitabine erhalten haben, zum gleichen Zeitpunkt entnommen. (B) zeigt exemplarische Dotplots und die Quantifizierung, bei der die Frequenz der NK1.1⁺ bzw. der NK1.1⁺CD49b⁺ Zellen von der CD45.2⁺ Population bestimmt wurde (G n=2; αCD96(6A6) n=12). Bei der Kombinationstherapie wurde das Überleben (C), die Lokalrezidivierung und die Metastasierung untersucht (D). Hierbei wurde zum einen die NK Zellabhängigkeit des Effekts der CD96 Blockade mit 6A6 untersucht. Dafür wurden in der adjuvanten Phase gleichzeitig mit der CD96 Therapie die NK Zellen durch Applikation von Depletionsantikörpern zweimal pro Woche über drei Wochen, depletiert. (grau gepunktete Linie). Zum anderen wurden die therapeutischen Effekte der αCD96 Antikörper 6A6 und 8B10 miteinander verglichen. Die Ergebnisse der neoadjuvanten αPD1/G und adjuvanter Gemcitabinetherapie wurden (Abschnitt 3.5.2, Abbildung 22) erneut aufgeführt. Gruppengröße: αPD1/G n=14; αPD1/αCD96(6A6)/G n=14; αPD1/αCD96(6A6)/αNK/G n=6; αPD1/αCD96(8B10)/G n=7. *p=0,01-0,05; **p=0,001-0,01; ***p<0,001. (Teile bereits publiziert in (Brooks et al., 2018); siehe Abschnitt 9. Publikationen)

Die hier entwickelte Strategie der gezielten Kombination einer neoadjuvanten CD8 T Zellstimulation mit einer adjuvanten Stimulation der NK Zellen, im Kontext einer konventionellen Chemotherapie, stellt einen äußerst vielversprechenden Therapieansatz zur kurativen Behandlung des PDAC dar. Diese resultierte als einzige in einem progressionsfreien Langzeitüberleben im invasiv wachsenden und früh metastasierenden *Kras*^{G12V}+Akt2 Modell. Die neoadjuvante αPD1/G Therapie reduzierte wesentlich

die Lokalrezidivrate, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser Effekt sowohl NK als auch CD8 T Zell abhängig ist. Die Kombination von Gemcitabine mit der PD1 Blockade führte synergistisch einerseits zur Reduktion der immunsuppressiven myeloiden Populationen und andererseits zur Induktion einer lokalen antitumoralen CD8 T Zellantwort, sowie zu einer deutlichen Erhöhung der NK Zellpopulation im Blut. Die zusätzliche adjuvante CD96 Blockade zur NK Zellstimulation unterstützte effektiv die Eliminierung der Metastasen, erhöhte additiv die Frequenz der NK Zellen im Blut und komplementierte den therapeutischen Effekt der neoadjuvanten α PD1/G Therapie.

Die gezeigten synergistischen Effekte verdeutlichen das herausragende Potential der selektiven Kombination innovativer immunstimulatorischer Therapien mit Standardtherapien mit dem Ziel der kurativen Behandlung von PDAC.

4. Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist aufgrund seines aggressiven Wachstums und der limitierten Behandlungsmöglichkeiten von einer hohen Mortalität geprägt. 20-25% der PDAC Patienten werden mit einem resezierbaren Tumor diagnostiziert und es ist davon auszugehen, dass diese Anzahl in Zukunft aufgrund weiterentwickelter diagnostischer Verfahren steigen wird (Rahib et al., 2014). Zurzeit wird die Tumorsektion mit anschließender adjuvanter Chemotherapie als einzige potentiell kurative Therapie angesehen, wobei die häufige Rezidivierung des Tumors weiterhin ein Problem darstellt (Neoptolemos et al., 2004). Eine neoadjuvante Therapie vor der Resektion kann zu besseren Resultaten führen, da die allgemeine Vitalität des Tumors beeinträchtigt wird. Allerdings stellen das immunsuppressive Tumormikromilieu und die geringe Infiltration von Effektorlymphozyten eine Herausforderung bei der effektiven Therapie des PDAC dar. Diese bedingen zusammen mit der Medikamentenresistenz des Pankreaskarzinoms die begrenzte Wirksamkeit vieler Therapien und verdeutlichen die dringende Notwendigkeit effizienterer und multimodaler Strategien. Ein entscheidendes Problem bei der Untersuchung der Wirksamkeit von adjuvanten Therapien in klinischen Studien ist die lange Studiendauer, daher sind gerade hierfür spezielle Tiermodelle nötig. Bei den etablierten Mausmodellen für PDAC wird über genetische Veränderungen im Pankreas eine multifokale Tumorentwicklung induziert. Diese Modelle ermöglichen die Analyse der palliativen Wirkung einer Therapie. Allerdings entspricht die palliative Wirksamkeit nicht notwendigerweise der Therapieeffizienz im adjuvanten Ansatz, da hier aufgrund der Resektion andere Grundvoraussetzungen vorliegen. Das multifokale Auftreten der Tumore in den etablierten Mausmodellen macht die Untersuchung von adjuvanten Therapien unmöglich, da hierfür eine vollständige Entfernung des befallenen Organs notwendig wäre. Daher ist die Entwicklung von Mausmodellen, die nicht nur die Mechanismen der PDAC Karzinogenese widerspiegeln, sondern auch einer Resektionstherapie zugänglich sind, von besonderem Interesse. Zurzeit wird in der Krebstherapie große Hoffnung in Immuntherapien gesetzt, die auch für die Therapie des Pankreaskarzinoms vielversprechend sein könnten. Eine Antikörper-vermittelte Blockade von Immuncheckpoints ermöglicht die Stimulation antitumoraler Immunantworten und mit dieser Therapie konnten z.B. bei Melanompatienten deutliche Erfolge mit z.T. langanhaltenden Immunantworten erzielt werden (Ott et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Berücksichtigung der häufigsten genetischen Aberrationen im humanen PDAC ein Mausmodell etabliert, das einen lokal begrenzten und resezierbaren Tumor entwickelt. Die phänotypischen Charakteristika des Tumors und ein hohes metastatisches Potential wurden anhand von histologischen Untersuchungen bestätigt. Mithilfe dieses Modells wurden die therapeutischen Effekte von Immuncheckpointinhibitoren in Kombination mit Chemotherapie im Kontext der Tumorsektion evaluiert, um ein Beispiel für eine perioperativ optimal abgestimmte Chemo- und Immuntherapie entwerfen zu können.

4.1. Etablierung eines metastasierenden und resezierbaren PDAC Mausmodells

4.1.1 Überexpression von mutiertem Kras und p53-Deletion führt zu einem PDAC ohne frühe Metastasierung

Aktivierende Kras Mutationen gelten, da sie bereits in den frühen PanIN Läsionen auftreten, als initialer Schritt bei der Pankreaskarzinomentstehung (Kanda et al., 2012). Dieses ist bereits in dem etablierten Modell der KC Maus, bei der über die alleinige Cre-vermittelte Expression von Kras^{G12V} eine PanIN Entwicklung und eine altersabhängige PDAC Progression induziert wird, beschrieben worden (Hingorani et al., 2003). Im Gegensatz hierzu konnten im Elektroporationsmodell durch die alleinige Überexpression von Kras^{G12V} weder prä maligne Läsionen noch eine PDAC Progression induziert werden (Abschnitt 3.1.1, Tabelle 1). Offenbar ist die alleinige Onkogenaktivierung von Kras nicht ausreichend, um in den transduzierten Zellen des Pankreas eine maligne Transformation hin zur Bildung von Neoplasien zu induzieren. Im Gegensatz zur KC Maus erfolgt die Alteration der Pankreaszellen im Elektroporationsmodell erst in der adulten Maus und nicht schon während der Embryogenese. Zudem wird durch die Elektroporation eine viel geringere Anzahl an Zellen transformiert, so dass es sich auch um einen statistischen Effekt handeln könnte. Während der Entwicklung der PanIN Läsionen treten Aberrationen weiterer Gene auf, die entscheidend an der Progression beteiligt sind. Besonders häufig liegen Veränderungen im p53 Gen vor (Redston et al., 1994), wodurch dessen tumorsuppressive Eigenschaften verloren gehen. Bei den etablierten Mausmodellen ist bereits beschrieben worden, dass die gleichzeitige Alteration von p53 zu einem progressiv wachsenden PDAC führt (Bardeesy et al., 2006; Hingorani et al., 2005). Auch im Elektroporationsmodell konnte durch die gezielte Kombination der genetischen Veränderungen ein PDAC induziert werden. Sowohl im p53fl/fl Modell, bei dem zusätzlich Kras^{G12V} über ein pT Transposon überexprimiert wurde, als auch im LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Modell führte die p53-Deletion bei gleichzeitiger Kras Aktivierung zu einer Tumorprogression in allen Mäusen (Abschnitt 3.1.1, Tabelle 1). Hierbei gab es im LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Modell eine insgesamt langsamere Progression als im p53fl/fl Modell mit Kras Überexpression (Abschnitt 3.1.1, Abbildung 4). Dies könnte zum einen bedingt sein durch den relativ starken EF1 α Promotor des pT Konstrukts im Vergleich zur Kras Expression im LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Modell unter der Kontrolle eines endogenen Promotors. Zum anderen ist bei der Transduktion der Zellen per Elektroporation eine mehrfache Integration des pT-Kras-Plasmids in die Zelle möglich, was zu einer nochmalig erhöhten Expression des aktiven Kras führen und die schnellere Tumorprogression im Pankreas der p53fl/fl Mäuse erklären könnte. Diese schnelle Progression bedingt vermutlich die, im Vergleich zu den langsamer wachsenden Tumoren der LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl Mäuse, histologisch geringere Differenzierung der Tumore. Immunhistochemisch wiesen beide Tumore in gleichem Maße die charakteristischen Marker von PDAC auf. Neben einer Expression des Adenokarzinommarkers CK19 konnte mittels α -Sma Färbung eine starke desmoplastische Reaktion nachgewiesen werden (Abbildung 5). Diese zeigt, dass ein

Großteil des induzierten Tumors aus Stroma besteht. Dies ist charakteristisch für das humane Pankreaskarzinom, das z.T. mehr als 90% desmoplastische Stromaanteile aufweist (Neesse et al., 2011). In den Tumoren beider Modelle konnte die Aktivierung des Kras-getriggerten RAF-MEK-ERK Signalwegs über die Phosphorylierung von Erk nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die histologischen Untersuchungen, dass die PDAC Entwicklung in diesen Modellen über eine Azinar-Duktale-Metaplasie läuft. Die Karzinogenese ist begleitet von einer Pankreatitis, die auch bei der Entwicklung von humanen PDAC involviert ist (Malka et al., 2002). Die Entzündungsreaktion könnte bedingt sein durch die Kras-vermittelte maligne Transformation der Pankreaszellen. Allerdings ist auch eine durch die Elektroporation bedingte Verletzung des Pankreasgewebes als Ursache für die Infiltration denkbar. Während der PDAC Progression konnten prämaligene Läsionen (PanINs) beobachtet werden. Hierbei traten neben den frühen Läsionen (PanIN1 und PanIN2) auch die PanIN3 Läsionen mit dem stärksten Potential zur PDAC Progression auf (Abbildung 6). Die Untersuchungen der Organe zeigten, dass in beiden Modellen keine Metastasierung auftrat, die hingegen charakteristisch für das humane Pankreaskarzinom ist. Man geht davon aus, dass die meisten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine metastatische Erkrankung haben (Haeno et al., 2012), weshalb PDAC zumindest zum Diagnosezeitpunkt schon als systemische Krankheit angesehen werden kann. Haeno et al. beschreiben, dass PDACs exponentiell wachsen und dass während dieser Expansion bereits früh Zellen mit hoher metastatischer Kompetenz generiert werden. Zudem konnten Rhim et al. zeigen, dass bereits die prämaligen Läsionen migratorisches Potential aufweisen und unterstützen hiermit die Theorie, dass schon sehr früh während der Tumorprogression eine Absiedelung stattfindet (Rhim et al., 2012).

4.1.2. Einfluss der Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 auf die Metastasierung und Progression des PDAC im Mausmodell

Um ein bereits früh metastasierendes Modell zu generieren, wurde die Auswirkung weiterer genetischer Veränderungen untersucht, die in der Progression des humanen PDAC involviert sind. Neben der initialen Kras Aktivierung wurde der Verlust der Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 durch shRNA-vermittelte *knockdowns* nachempfunden. In klinischen Untersuchungen wurde bei PDAC und Kolonkarzinompatienten eine Korrelation eines SMAD4 Verlustes mit dem Auftreten einer Metastasierung beschrieben (Iacobuzio-Donahue et al., 2009; Tanaka et al., 2006). Aguirre et al. konnten für p16/p19 im Mausmodell bereits einen Zusammenhang zwischen einem Verlust des Proteins und einer erhöhten Metastasierung feststellen (Aguirre et al., 2003). Die klinische Bedeutung der BRCA1-Mutationen, die beim Pankreaskarzinom eher seltener auftreten, ist für diese Entität noch nicht vollständig geklärt. Allerdings ist bekannt, dass eine verringerte mRNA Expression von BRCA1 im Zusammenhang mit der Metastasierung bei sporadischem Brustkrebs steht (Seery et al., 1999).

Im Elektroporationsmodell zeigt sich, dass ein Verlust von BRCA1 oder SMAD4 als zusätzliches Ereignis zur Kras Aktivierung nicht ausreicht, um eine maligne Transformation zu induzieren

(Abschnitt 3.2.1. Tabelle 2). Es ist davon auszugehen, dass die Veränderungen von SMAD4 und BRCA1, die vermutlich erst später in der Karzinogenese auftreten (Wilentz et al., 2000), nicht als initialer Auslöser für die PDAC Progression bei gleichzeitiger Kras Aktivierung geeignet sind. Sowohl der Verlust von p16/p19 als auch der Verlust von p53 führt zu einer PDAC Progression (Abschnitt 3.2.1. Tabelle 2), wodurch die zentrale Relevanz des p53 Signalwegs für die Induktion eines PDAC im Elektroporationsmodell verdeutlicht wird. Die geringe Inzidenz bei einem Verlust von p16/p19 könnte dadurch zu erklären sein, dass p19 nur indirekt in der Regulation des p53 Signalwegs involviert ist (Zhang et al., 1998). Außerdem deutet die Tumorzinidenz von 80% bei dem Einsatz der shRNA gegen p53 darauf hin, dass hierdurch kein vollständiger Funktionsverlust des Gens induziert wird, da bei genetischer p53-Deletion und einer Kras Aktivierung eine Inzidenz von 100% vorlag (siehe Abschnitt 3.1.1.).

Da meist während der PDAC Progression mehrere synergistisch wirkende genetische Veränderungen auftreten und die Ergebnisse die Notwendigkeit des p53-Verlusts für die PDAC Initiierung aufzeigen, wurde der p53 *knockdown* mit der Kras Aktivierung als Grundlage genutzt, um die Auswirkung weiterer Tumorsuppressorgenverluste auf die Progression und Metastasierung zu untersuchen. Der additive Einsatz der shRNA gegen SMAD4, BRCA1 bzw. p16/p19 führte in allen Mäusen zu einer Tumorprogression (Abschnitt 3.2.2., Abbildung 8). Hierbei hatte der Verlust von BRCA1 die stärkste Auswirkung und resultierte in schnellem und isochronem Wachstum. Es ist bekannt, dass der Verlust von BRCA1 zu einer genomischen Instabilität führt, die sowohl Einfluss auf die Initiierung und Progression hat (Ferguson et al., 2015), und die die schnellere Progression der Tumore erklären könnte. SMAD4, p16/p19 und p53 sind an der Regulation der Proliferation, Apoptose und Migration beteiligt und die ähnliche Funktion dieser Proteine könnte daher auch die ähnliche Tumorprogression erklären. Trotz der unterschiedlichen Genotypen wiesen die induzierten Tumore histologisch keine Unterschiede auf und zeigten die charakteristischen Strukturen des Pankreaskarzinoms (Abbildung 9), wobei jedoch bei keinem dieser Genotypen eine Metastasierung nachgewiesen werden konnte. Es wurde daher untersucht, ob der zusätzliche Verlust eines weiteren Tumorsuppressorgens Einfluss auf die Metastasierung nimmt. Hierbei führte der umfangreiche Tumorsuppressorgen-*knockdown* in den drei untersuchten Gruppen lediglich zu einem isochronen und beschleunigten Wachstum des Primärtumors (Abschnitt 3.2.3. Abbildung 10), was vermutlich durch die kooperativen Effekte auf die chromosomale Integrität, die Migration und die Apoptose bedingt ist.

Diese Analysen verdeutlichen, dass die alleinige Veränderung der Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1 und p16/p19 nicht für eine PDAC Progression ausreicht und nur bei gleichzeitigem p53 Verlust und Kras Aktivierung zu einer PDAC Entwicklung führen. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass während der PDAC Progression mehrere genetische Events auftreten, die die Karzinogenese fördern. Im Elektroporationsmodell konnte die beschriebene Rolle der Tumorsuppressorgene bei der Metastasierung nur bedingt bestätigt werden. Während der Progression des Primärtumors konnte keinem der Tumorsuppressorgene ein Einfluss auf die Metastasierung

nachgewiesen werden. Weder bei dem alleinigen *knockdown* noch bei der additiven shRNA Verwendung konnte ein metastatischer Organbefall detektiert werden. Um dennoch den Einfluss der einzelnen Tumorsuppressorgene auf die Metastasierung untersuchen zu können, erfolgte eine Resektion des Tumors, um das Auswachsen von möglicherweise vorhandenen unter der Detektionsgrenze liegenden Metastasen zu ermöglichen. Sowohl bei der Kras Aktivierung mit p53 Verlust als auch bei zusätzlichem *knockdown* von SMAD4 konnte eine relativ geringe Lokalrezidivierung und eine geringe Fernmetastasierung festgestellt werden (Abschnitt 3.2.4. Abbildung 11). Dies verdeutlicht, dass in dem Elektroporationsmodell entgegen der Annahme ein zusätzlicher SMAD4 Verlust im Vergleich zum alleinigen p53 Verlust nur einen geringen Einfluss auf die Metastasierung hat. Im Gegensatz dazu führte ein Verlust von BRCA1 oder p16/p19 zu einer hohen Frequenz an Lokalrezidiven und auch zu einer erhöhten Metastasierungsrate. Hierbei ist zu beachten, dass die Metastasen aufgrund des kürzeren Überlebens der Mäuse in einem kürzeren Zeitraum zu bereits detektierbaren Metastasen auswuchsen. Somit konnte die für den Verlust von p16/p19 beschriebene Assoziation mit einer erhöhten Metastasierung (Aguirre et al., 2003) in dem Elektroporationsmodell nachvollzogen und eine Beteiligung von BRCA1 bei der Migration und Metastasierung gezeigt werden. Die Resektion der Tumore ermöglichte die Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Verlust der Tumorsuppressorgene und einer Rezidivierung bzw. Metastasierung. Allerdings wurde erst spät nach der Resektion eine Metastasierung beobachtet und für das humane Pankreaskarzinom ist neben einem aggressiven Wachstum eine frühe Metastasierung charakteristisch. Die per shRNA generierten Tumore sind daher als Resektionsmodell, da sie diese frühe Metastasierung nur bedingt widerspiegeln, für die Etablierung neuer therapeutischer Strategien nicht praktikabel.

4.1.3. Einfluss der Mutation von p53 auf die Karzinogenese und Metastasierung

p53 liegt in PDACs häufig mutiert vor und es ist ein Zusammenhang der p53 Aberrationen mit einem progressiven Wachstum und einer Metastasierung beschrieben (Morton et al., 2010). Zudem sind für die, durch den Funktionsverlust bedingte, p53 Akkumulation sogenannte *gain-of-function* Effekte gezeigt worden, die sowohl die Progression als auch die Medikamentenresistenz des Tumors beeinflussen können (Masciarelli et al., 2014; Vogiatzi et al., 2016). Im Elektroporationsmodell wurde daher der Einfluss von den zwei in der DNA Bindedomäne-liegenden p53-Mutationen R172H und R246S und von der Mutation K129E, die eine zytotoxische T Zellantwort hervorrufen kann (Bertholet et al., 1997), auf die Karzinogenese untersucht und mit einer p53-Deletion verglichen. Außerdem wurde aufgrund der beschriebenen *gain-of-function* die Auswirkung einer vorliegenden p53-Mutation auf eine chemotherapeutische Behandlung mit Gemcitabine untersucht.

Die Expression der verschiedenen p53-Mutationen hatte im direkten Vergleich zur p53-Deletion keinen Effekt auf die Tumorprogression (Abschnitt 3.3.1., Abbildung 12) und es konnte in keiner der untersuchten Gruppen eine Metastasierung nachgewiesen werden. Trotz der von Morton et al. beschriebenen metastasierungsfördernden Eigenschaften der p53-172 Mutation konnte dies nicht im

Elektroporationsmodell nachvollzogen werden (Morton et al., 2010). Auch die anderen untersuchten Mutationen schienen die Metastasierung nicht zu beeinflussen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse in den Mausmodellen könnten dadurch bedingt sein, dass in dem von Morton et al. verwendeten Modell die p53-Mutation und die Kras Aktivierung schon während der Embryogenese eingebracht werden und zudem der Zeitraum, in dem die Pankreastumore entstehen, im Vergleich zum Elektroporationsmodell deutlich länger ist. Hierdurch ist die Zeitspanne für eine metastatische Disseminierung im Elektroporationsmodell stark limitiert. Eine Resektion des Tumors ermöglicht es, den Untersuchungszeitraum für ein Auswachsen von Metastasen zu verlängern. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass bei der Mutation p53-172, wie bereits von Morton et al. beschrieben, und auch bei einer vorliegenden p53-129 Mutation eine tendenziell erhöhte Metastasierungsrate vorliegt (Abschnitt 3.3.3., Abbildung 14). Außerdem korreliert die in der DNA-Bindedomäne lokalisierte p53-246 Mutation mit einem erhöhten Auftreten von Lokalrezidiven und verkürzt das Überleben der Mäuse. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die unterschiedlichen p53 Mutanten tatsächlich die Karzinogenese beeinflussen.

Anhand der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine sollte die Auswirkung der p53-Mutanten auf die Resistenz untersucht werden. Fiorini et al. konnten *in vitro* eine durch mutiertes p53 verstärkte Resistenz gegenüber Gemcitabine zeigen (Fiorini et al., 2015). Dieses konnte anhand der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente zum Teil nachvollzogen werden (Abschnitt 3.3.4., Abbildung 16). Sowohl für die Zellen mit p53-246 Mutation als auch für die mit p53-129 Mutation konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zur p53-Deletion resistenter gegenüber den Gemcitabine-induzierten zytotoxischen und zytostatischen Effekten waren. Im Gegensatz dazu vermittelte die p53-172 Mutation eine höhere Sensitivität gegenüber der Chemotherapie. Die zytostatischen Effekte konnten ebenfalls in einer durchflusszytometrischen Analyse bestätigt werden, bei der ein Gemcitabine-bedingter Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase nachgewiesen wurde. Dieser beobachtete Effekt steht im Einklang mit den Untersuchungen zu Gemcitabineeffekten bei Blasenkarzinomzellen (da Silva et al., 2010). Im Gegensatz zu den Beobachtungen *in vitro* wurde im palliativen Ansatz *in vivo* bei Vorliegen einer p53-Mutationen eine stärkere progressionshemmende Wirkung von Gemcitabine beobachtet (Abschnitt 3.3.2., Abbildung 13). Dieses könnte durch das beim PDAC stark ausgeprägte Tumormikromilieu bedingt sein. Es ist bekannt, dass Gemcitabine selektiv die immunsuppressiven MDSCs reduziert (Suzuki et al., 2005). Hier liegt die Vermutung nahe, dass durch die verringerte Immunsuppression Immunantworten aktiviert werden, die gegen die Tumore mit dem akkumulierten, mutierten p53 gerichtet sind, wobei auch das mutierte p53 selbst als Neoantigen dienen könnte (Ciernik et al., 1996). Dies resultierte in einer verzögerten Progression der Tumore mit p53-Mutation. Die Induktion einer zytotoxischen T Zellantwort wurde bereits für die p53-129 Mutante beschrieben (Bertholet et al., 1997). Andererseits konnten bei der adjuvanten Therapie ähnliche Effekte in Abhängigkeit des p53 Status wie in den *in vitro* Studien gezeigt werden. Bei der adjuvanten Therapie konnte bei den p53 Mutationen 129 und 246, die *in vitro* die größte Resistenz gegenüber

Gemcitabine vermittelten, die geringsten therapeutischen Effekte durch die Gemcitabinetherapie erzielt werden (Abschnitt 3.3.4., Abbildung 15). Im Gegensatz dazu konnte sowohl bei der p53-172 Mutation als auch bei der p53-Deletion ein reduktiver Effekt auf die Lokalrezidive durch die Gemcitabinetherapie beobachtet werden, wodurch ein deutlich besseres Überleben und bei einigen Mäusen ein Langzeitüberleben ermöglicht wurde. Dies deckt sich mit den bei einer adjuvanten Gemcitabinetherapie erzielten therapeutischen Effekten bei PDAC Patienten. Bei der CONKO-001 Studie mit 354 Patienten konnte durch die adjuvante Gemcitabine Therapie ein verlängertes Überleben im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe erzielt werden, einhergehend mit einem verringerten Auftreten von Lokalrezidiven (Oettle et al. 2007, Rate der Lokalrezidive der CONKO-001 Studie reanalysiert in Gürlevik et al. 2016). Die bei der adjuvanten Therapie beobachteten Effekte im Mausmodell bestärken erneut die Annahme, dass das Tumormikromilieu für die therapeutische Wirkung der Gemcitabinetherapie entscheidend ist. Die *in vitro* Daten decken sich größtenteils mit den Daten der adjuvanten Therapie *in vivo*, bei der durch die Resektion des Primärtumors auch das Tumormikromilieu entfernt wurde und eher die Wirkung von Gemcitabine auf vereinzelte disseminierte Tumorzellen entscheidend ist. Die Beteiligung des Tumormikromilieus an der Resistenzbildung gegenüber verschiedenen Therapien ist bekannt. Hierbei sind sowohl die desmoplastische Reaktion, die z. B. den Tumor vor dem Therapeutikum abschirmt (Netti et al., 2000), als auch epigenetische Veränderungen involviert wie z.B. für den Transport des Medikaments verantwortliche Transportkanäle (Giovannetti et al., 2006). Bei der palliativen Therapie konnten die *in vitro* Effekte vermutlich bedingt durch das Tumormikromilieu des Primärtumors nicht nachvollzogen werden. Die Beobachtung einer verbesserten therapeutischen Wirkung im palliativen Ansatz entspricht nicht der allgemeinen Annahme, dass eine p53-Dysfunktion mit einer erhöhten Chemotherapie-Resistenz und einer schlechteren Prognose korreliert. Diese Annahme resultiert zumeist aus klinischen Studien im adjuvanten Setting oder aus zahlreichen *in vitro* Studien (Masciarelli et al., 2014; Wörmann et al., 2016). Diese bilden jedoch eher die adjuvante als die palliative Situation ab, so dass die genaue Rolle der p53 Mutation für die palliative Therapie in der Klinik nicht vollständig aufgeklärt ist. Bei den untersuchten p53-Mutationen konnte während der Progression des Primärtumors kein metastasierungsfördernder Einfluss nachgewiesen werden. Eine frühe Metastasierung ist für das humane Pankreaskarzinom jedoch charakteristisch. Daher war es notwendig das genetische Setup zur Tumorinduktion weiter zu variieren, um ein früh metastasierendes Modell für die Untersuchung neuer therapeutischer Strategien zu etablieren.

4.1.4. Konstitutiv-aktives Akt2 induziert eine frühe Metastasierung im Elektroporationsmodell

Es ist bekannt, dass eine Überexpression von Akt2 sowohl bei Brustkrebszellen als auch bei Kolonkarzinomzellen nachweislich die Metastasierung und die Migration fördert (Arboleda et al., 2003; Rychahou et al., 2008). Zudem wurde die Bedeutung der Akt2 Aktivierung für die Invasivität von Pankreaskarzinomzellen beschrieben (Tanno et al., 2001). In 55% der PDAC Fälle kann eine Akt2

Aktivierung nachgewiesen werden (Gürlevik et al., 2016). Durch eine zusätzliche Überexpression von Akt2 konnte im nicht-metastasierenden Elektroporationsmodell mit p53-Deletion und Überexpression $Kras^{G12V}$ eine frühe Metastasierung induziert werden (Abschnitt 3.4., Abbildung 17). Die histologischen Untersuchungen bestätigen die Charakteristika und Marker des humanen PDAC und es konnte neben einer Akt2 Aktivierung eine Metastasierung in Leber, Lunge und Lymphknoten verifiziert werden (Abbildung 18). Dieses progressiv wachsende und früh metastasierende Modell eignet sich durch sein lokal begrenztes Wachstum hervorragend für die Etablierung therapeutischer Strategien in Kombination mit einer Resektion. Um den Nutzen des Modells für präklinische Studien zu belegen, wurde eine adjuvante Gemcitabinetherapie durchgeführt. Der Einsatz von Gemcitabine ist eine adjuvante Standardtherapie und führt zu einer Verlängerung des Überlebens (Oettle et al., 2007). Bei dieser Lebensverlängerung spielt, wie auch in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, die Unterdrückung des Rezidivs eine wichtige Rolle (Gürlevik et al., 2016; Ueno et al., 2009). Dieser Gemcitabine Effekt konnte sowohl im metastasierenden Akt2 Modell als auch im nicht metastasierenden Modell nachvollzogen werden (Abschnitt 3.4.1., Abbildung 19). Gemcitabine führte neben einer Verlängerung des Überlebens zu einer deutlichen Reduktion der Lokalrezidivrate. Der reduktive Effekt war aufgrund der insgesamt geringeren Lokalrezidivierungstendenz im nicht metastasierenden Modell deutlicher. Da ein Großteil der Patienten (75%) nach der Resektion eine Rezidivierung hat (Hishinuma et al., 2006) und beim Akt2 Modell in über 80% der Mäuse eine Rezidivierung auftrat, wurde durch dieses Modell die Rezidivierungstendenz in der Klinik besser widerspiegelt. Zudem wies das Akt2 Modell eine hohe Metastasierung auf, die in der Klinik ebenfalls einen stark limitierenden Faktor für den Erfolg der Resektion darstellt.

Um den Effekt der bevorzugt lokalen Wirkung von Gemcitabine genauer zu analysieren, wurden die in den Resektionsrand infiltrierenden und die systemischen Immunzellen untersucht. Hierbei zeigt sich, dass Gemcitabine lokal zu einer erhöhten Frequenz der konventionellen NK Zellen und gleichzeitig zu einer Reduktion der immunsuppressiven MDSC Subpopulation $CD11b^{+}Gr1^{int}F4/80^{int}$ führt (Abbildung 20). Der reduktive Effekt von Gemcitabine auf die immunsuppressiven Zellen der myeloiden Reihe wurde bereits von Suzuki et al. beschrieben (Suzuki et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigt die Analyse der Immunzellen im Blut, dass Gemcitabine hier keinen Effekt auf die untersuchten Immunzellen wie NK Zellen und MDSC hat, was die lediglich lokale Wirkung von Gemcitabine erklären könnte.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte metastasierende Elektroporationsmodell weist demnach nicht nur die morphologischen Charakteristika des humanen PDAC auf, sondern es konnten auch klinische Charakteristika der adjuvante Gemcitabinetherapie bei Patienten nachvollzogen werden. Außerdem geben die Analysen der Immunzellpopulationen einen ersten Hinweis darauf, dass eine lokal begrenzte therapeutische Wirkung nicht ausreicht, um die häufig zum Resektionszeitpunkt bereits systemisch metastasierte Erkrankung effektiv zu therapieren.

4.2. Evaluation einer neoadjuvanten und adjuvanten Immuntherapie mit Immuncheckpointinhibitoren

4.2.1. Therapeutische Wirksamkeit der Immuncheckpointinhibition mit α CTLA4 und α PD1

Zytotoxische T Zellen sind in der Lage, gezielt Tumorzellen zu erkennen und zu lysieren (Overwijk et al., 2003; Yee et al., 2002). Immuntherapien, die sich diese Eigenschaft zu nutzen machen, werden in der Klinik intensiv untersucht. Eine Option ist hierbei die Stimulation einer T Zellaktivierung über Immuncheckpointinhibitoren, für die gezeigt werden konnte, dass hierdurch eine deutliche antitumorale Antwort induziert wird (Patnaik et al., 2015). Hiermit konnten bei fortgeschrittenen soliden Tumoren mit bereits metastatischer Disseminierung, wie beim fortgeschrittenen Melanom, herausragende Erfolge erzielt werden (Schachter et al., 2017) und es ist davon auszugehen, dass neben einer lokalen antitumoralen Antwort auch eine antimetastatische Aktivität induziert wird.

In dieser Arbeit wurde die Immuncheckpointinhibition mittels Antikörper gegen CTLA4 bzw. PD1 in Kombination mit einer Gemcitabinetherapie eingesetzt, um die lokale Gemcitabinewirkung durch eine systemische Immuntherapie optimal zu ergänzen. Der Einsatz des Chemotherapeutikums könnte aufgrund der zytotoxischen Effekte auf die Tumorzellen durch die hierdurch vermittelte erhöhte Verfügbarkeit von Tumorantigenen (Hannani et al., 2011) einen Zusatznutzen für die Immuncheckpointblockade haben. Es wurde untersucht, ob durch den zusätzlichen Einsatz der blockierenden Antikörper auch ein therapeutischer Effekt auf die Metastasierung ausgeübt werden kann. Hierbei zeigte sich, dass in diesem Modell die zusätzliche adjuvante Checkpointinhibition weder bei der Blockade von PD1 noch von CTLA4 einen therapeutischen additiven Effekt im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie hat (Abschnitt 3.5.1., Abbildung 21). Eine mögliche Erklärung für die ineffektive Immuntherapie könnte die anzunehmende, geringe Menge von Neoantigenen sein, die in diesem Tumormodell durch die schnelle und von starken Onkogenen-determinierte Tumorprogression bedingt ist. Therapiestudien haben gezeigt, dass die Anzahl von klonalen Neoantigenen maßgeblich entscheidend für das Ausmaß der CD8 T Zellantwort ist (McGranahan et al., 2016) und mit der Tumorantwort bei der Checkpointinhibition korreliert (Rizvi et al., 2015). Die Last an Neoantigenen wird als wichtiger prognostischer Faktor für das Ansprechen einer Checkpointinhibition gesehen (Snyder et al., 2014) und daher könnte bei einem Modell mit höherer Neoantigen-Last die adjuvante Immuncheckpointinhibition möglicherweise zu einem therapeutischen Erfolg führen. Zusätzlich zur geringen Verfügbarkeit von Neoantigenen wird mit der Resektion der Tumor als Antigenquelle für die Induktion der antitumoralen Antwort dem System entzogen. Außerdem gilt ein PDAC als vergleichsweise nicht-immunogener Tumor der neben einer geringen Effektorlymphozyteninfiltration (von Bernstorff et al., 2001) auch ein stark immunsuppressives Milieu aufweist. Hierdurch liegt die Vermutung nahe, dass in der Zeit der Tumorprogression keine ausreichende antitumorale T Zellantwort induziert wird, so dass der adjuvante Einsatz der Checkpointinhibition keinen

therapeutischen Effekt hat. Die essentielle Bedeutung der Induktion einer CD8 T Zellantwort als Grundlage für eine erfolgreiche Immuncheckpointinhibition ist in einem PDAC Mausmodell beschrieben worden (Winograd et al., 2015). Zudem konnte bei PDAC Patienten gezeigt werden, dass durch eine neoadjuvante immuntherapeutische Vakzinierung eine T Zellinfiltration induziert werden kann, die zu einer Konversion des nicht-immunogenen Tumors zu einem immunogenen Tumor führt und so für eine erfolgreiche Checkpointinhibition genutzt werden kann (Lutz et al., 2014). Der neoadjuvante Einsatz der Immuncheckpointinhibition kann durch das Eingreifen in die Tumortoleranz eine antitumor-Antwort triggern, die auch über die Resektion hinaus besteht und so auch Metastasen bekämpfen könnte. Darüber hinaus spricht für eine neoadjuvante Therapie, dass neben einer möglichen Reduktion der Tumorlast auch eine Behandlung von Mikrometastasen zu früheren Zeitpunkten stattfindet (Paulson et al., 2013).

Die Untersuchungen zur neoadjuvanten Therapie im Mausmodell zeigten, dass die Monotherapien mit der PD1 Blockade oder mit Gemcitabine nur einen geringen Einfluss auf das Überleben haben (Abschnitt 3.5.2., Abbildung 22). Zudem konnte bei der Gemcitabinetherapie eine erhöhte Lokalrezidivrate festgestellt werden. Im Gegensatz dazu hatte die Kombination der Checkpointblockade mit der Chemotherapie einen deutlich verbesserten therapeutischen Effekt. Mit beiden blockierenden Antikörpern konnte eine Verlängerung des Überlebens beobachtet werden. Vor allem die PD1 Blockade hatte in Kombination mit Gemcitabine eine starke therapeutische Wirkung und führte zu einer deutlichen Reduktion der Lokalrezidivrate. Entgegen der ursprünglichen Hypothese hatte keine der Therapien einen Einfluss auf die Fernmetastasen und es schien eine lediglich lokal begrenzte Wirkung zu geben. Die unterschiedliche Wirkung der CTLA4 und PD1 Blockade bei der Kombination mit der Chemotherapie könnte durch die unterschiedliche Regulation dieser beiden Rezeptoren bei der T Zellaktivierung bedingt sein. Während CTLA4 relativ früh, während des Primings der T Zellen im Lymphknoten hochreguliert wird, wird PD1 erst später zur Regulation der Aktivierung der T Zellantwort im peripheren Gewebe hochreguliert (Agata et al., 1996; Ishida et al., 1992; Walunas et al., 1994). Daher geht man davon aus, dass mit der CTLA4 Blockade die Priming Phase beeinflusst und hierdurch die Aktivierung und Proliferation der T Zellen unterstützt wird. Im Gegensatz dazu wirkt α PD1 in der Effektorphase der T Zellen in der Peripherie und stellt die Funktionalität der T Zellen wieder her. Der im Elektroporationsmodell beobachtete bessere therapeutische Effekt einer neoadjuvanten Checkpointinhibition ist konform mit den von Liu et al. gezeigten Ergebnissen bei spontan metastasierenden Brustkrebsmodellen (Liu et al., 2016). Allerdings wurde in dieser Studie beschrieben, dass in Folge der Checkpointblockade die Metastasenlast reduziert wurde. Im Elektroporations-PDAC Modell konnten hierbei hauptsächlich lokale Effekte gezeigt werden und die Blockade hatte erst in Kombination mit der Chemotherapie deutliche therapeutische Effekte. Dies verdeutlicht die Unterschiede zwischen dem autochtonen Elektroporationsmodell und dem von Liu et al. verwendeten Transplantationsmodell, die sich auch hinsichtlich des Tumormikromilieus unterscheiden und bestätigt, dass die Therapie des Pankreaskarzinoms aufgrund

seines immunsuppressiven und nicht-immunogenen Charakters eine besondere Herausforderung darstellt.

4.2.2. Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf Immunzellpopulationen im

Tumormikromilieu

Da das Tumormikromilieu und die darin befindlichen Effektorlymphozyten entscheidend für die Induktion einer effektiven antitumoralen Antwort ist, wurden die Effekte der neoadjuvanten Therapien auf die im Tumor befindlichen Immunzellen und Immunzellen im Blut untersucht. Die Analyse der T Zellen zeigt, dass die lokale, im Tumor befindliche Frequenz der CD4 und CD8 T Zellen durch die neoadjuvanten Therapien nicht beeinflusst wurde (Abschnitt 3.5.3., Abbildung 23). Im Blut führte sowohl die Monotherapie mit Gemcitabine als auch die Kombinationstherapie α PD1/G zu einem Anstieg der CD8 T Zellfrequenz. Dies lässt vermuten, dass dieser Effekt auf die CD8 T Zellen durch das Chemotherapeutikum bedingt wird. Bei der Kombination α PD1/G konnte zudem ein deutlicher Anstieg der CD4 T Zellen im Blut beobachtet werden. Dies führt dazu, dass das CD8/CD4 Verhältnis, welches in der Klinik als positiver prognostischer Marker für das Überleben dient (Diederichsen et al., 2003; Huang et al., 2015), trotz eines Anstiegs der CD8 Frequenz im Blut durch die Kombinationstherapie nicht verändert wurde. Die Analyse der regulatorischen T Zellen verdeutlicht, dass nur ein geringer Anteil dieser induzierten CD4 T Zellen von regulatorischen T Zellen ausgemacht wird (Abbildung 24) und die Therapien insgesamt keinen Einfluss auf die tumorinfiltrierenden regulatorischen T Zellen ausüben. Die Analyse der gewebspezifischen und antigenerfahrenen CD8 T Zellen im Tumorgewebe, die anhand des Markers CD103 bestimmt wurden, zeigt, dass diese maßgeblich durch die neoadjuvante PD1 Blockade sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie beeinflusst werden (Abbildung 25). Eine hohe Infiltrationsdichte von CD103⁺CD8⁺ T Zellen gilt bei vielen Tumorentitäten wie Lungen-, Kolon- und Brustkarzinom als positiver prognostischer Faktor für das Überleben (Djenidi et al., 2015; Ling et al., 2007; Wang et al., 2016). CD103 wird auf aktivierten T Zellen exprimiert und über die Bindung von CD103 an E-Cadherin wird die zytolytische Funktion der CD8 T Zellen reguliert (French et al., 2002). Diese Interaktion ist zudem entscheidend für die Ausbildung der immunologischen Synapse und der Polarisation der zytolytischen Granula und damit für eine effektive Lyse der Zielzellen (Le Floch et al., 2007; Franciszkiewicz et al., 2013). Zur Überprüfung, ob die T Zellen über diese Interaktion eine Wirkung entfalten können, wurden die im Elektroporationsmodell induzierten Tumorzellen auf eine Expression von E-Cadherin untersucht. Die Expression von E-Cadherin auf den Tumorzellen bestätigte, dass die CD103⁺ CD8 T Zellen über diese Achse eine zytotoxische Funktion gegenüber den Tumorzellen ausüben können (Abschnitt 3.5.9., Abbildung 40).

Die neoadjuvante Gabe von α PD1 allein führte ebenfalls zu einer Induktion der CD103⁺ CD8 T Zellen, hatte allerdings als Monotherapie keinen therapeutischen Effekt auf das Überleben und die Rezidivierung. Dies spricht dafür, dass neben der Induktion der gewebspezifischen CD8 T Zellen zusätzliche Faktoren für den therapeutischen Erfolg der Kombinationstherapie verantwortlich sind.

Die Analyse der NK Zellen zeigt, dass die α PD1 Monotherapie im Tumor zu einem Anstieg in der Frequenz der gesamten NK Zellpopulation führte (Abbildung 26). Dieser Effekt konnte wiederum nicht bei der Kombination (α PD1/G) beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu führte die α PD1/G Therapie im Blut zu einem deutlichen Anstieg der Frequenz der konventionellen NK Zellen und auch bei der Gemcitabinemonotherapie konnte hier ein geringer Anstieg beobachtet werden. Es ist möglich, dass die Therapie mit Gemcitabine zu einer Induktion der konventionellen NK Zellen im Blut führt und die α PD1 Blockade diesen Effekt verstärkt, da PD1 auch auf NK Zellen exprimiert wird (Benson et al., 2010). Bei der Analyse der MDSC konnte der bereits bekannte reduktive Effekt von Gemcitabine bestätigt werden (Suzuki et al., 2005). Dieser trat sowohl bei der Mono- als auch bei der Kombinationstherapie α PD1/G im Blut und im Tumorgewebe auf (Abbildung 27). Bei genauerer Analyse der MDSC Subpopulationen zeigt sich (Abbildung 28), dass vor allem die P2 Population ($CD11b^+Gr1^{int}F4/80^{int}$) im Tumor und im Blut durch Gemcitabine reduziert wird. Diese Population besteht hauptsächlich aus myeloiden Vorläuferzellen und weist ein starkes immunsuppressives Potential auf (Dolcetti et al., 2010). Zudem zeigt sich auch ein reduktiver Effekt auf die weniger immunsuppressive P1 ($CD11b^+Gr1^{hi}F4/80^-$) im Blut und im Tumorgewebe. Durch die Analyse der Immunzellen wird deutlich, dass Gemcitabine sowohl systemisch als auch lokal eine Reduktion der immunsuppressiven MDSC bewirkt. Es ist bekannt, dass MDSCs über die Sekretion von Stickstoffmonoxid sowohl die Antwort von CD4, CD8 T und NK Zellen auf Interferonstimuli inhibieren (Mundy-Bosse et al., 2011). Gleichzeitig führt die PD1 Blockade, wie oben beschrieben, zu einer Induktion von gewebsspezifischen $CD103^+CD8^+$ T Zellen, wodurch der lokale therapeutische Effekt der Kombinationstherapie erklärt werden könnte. Trotz der durch die Kombinationstherapie α PD1/G erhöhten Frequenz der CD8 T und der konventionellen NK Zellen im Blut konnten keine therapeutischen Effekte auf die Metastasen beobachtet werden, was vermuten lässt dass die Effektorzellen gegenüber den Metastasen ineffektiv sind. Es ist möglich, dass dies durch die anfänglich geringe Größe und dem vermutlich noch schwach ausgeprägten Tumormikromilieu der Metastasen bedingt ist. Auch der häufig mit der Metastasierung in Verbindung gebrachte Stammzellcharakter der Tumorzellen könnte eine Rolle spielen (Liu et al., 2010). In Verbindung mit der von Suzuki et al. beschriebenen Abhängigkeit vom umgebenden Milieu des befallenen Organs (Suzuki et al., 2006) könnte dies dazu beitragen, dass die Metastasen über ein Mikromilieu verfügen, das sich durch die Kombinationstherapie in seinen immunologischen Eigenschaften nicht notwendigerweise auf die gleiche Art beeinflussen lässt wie der Primärtumor. Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, warum die Metastasen nicht zu einem angreifbaren Ziel für die Immunantwort werden.

Die infiltrierenden CD8 T Zellen wurden auf eine Aktivierung und eine möglicherweise durch den Tumor-getriggerte Erschöpfung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die neoadjuvanten Therapien keinen Einfluss auf den Aktivitätsstatus der T Zellen hatten (Abschnitt 3.5.4., Abbildung 29). Das Expressionsniveau der Aktivierungsmarker CD69, CD11a und CD44 war nach den unterschiedlichen

Therapien in den verschiedenen Gruppen vergleichbar. Interessanterweise führten alle neoadjuvanten Therapien zu einer Reduktion der PD1 Expression. Dieser Rezeptor ist ein Marker für die häufig im Tumormilieu induzierte T Zellerschöpfung, bei der die Effektorfunktion der T Zellen beeinträchtigt ist. Ngiow et al. haben beschrieben, dass durch eine α PD1 Therapie die Expression von PD1 auf den CD8 T Zellen herunterreguliert wird und dass hierdurch eine Aussage über ein therapeutisches Ansprechen auf die PD1 Blockade gemacht werden kann (Ngiow et al., 2015). In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Gemcitabinetherapie bei einer lipoidimmunogen-basierten Immuntherapie zu einer Reduktion der PD1 Expression auf den antitumoralen T Zellen führt (Chang et al., 2016). Dies könnte auch die gezeigte Herunterregulation von PD1 in diesem Modell erklären, die sowohl bei der neoadjuvanten Chemotherapie als auch bei der PD1 Blockade und bei der Kombination von beidem auftrat. Durch die neoadjuvanten Therapien könnte demzufolge die Effektorwirkung der CD8 T Zellen positiv beeinflusst werden.

Die Tumorantigen-Spezifität der CD8 T Zellen wurde im Hinblick auf eine durch spezifische Antigenstimulation induzierbare IFN γ Produktion untersucht. Hierzu wurde ein Neoepitop-Tag in den Tumor eingebracht, um eine gezielte tumorspezifische Peptidstimulation zu gewährleisten. Die Analyse der Splenozyten zur Bestimmung der systemischen antitumoralen CD8 T Zellantwort verdeutlicht, dass die neoadjuvanten Therapien keine systemische Antwort induzierten (Abschnitt 3.5.5., Abbildung 30). Bei der Analyse der intratumoralen T Zellen zeigte sich, dass die neoadjuvanten Monotherapien keinen Einfluss auf die antitumorale T Zellantwort hatten. Im Gegensatz hierzu führte die neoadjuvante Kombination von Gemcitabine und α PD1 Blockade zu einer deutlichen lokalen Immunantwort gegen das gewählte Antigen. Dies verdeutlicht, dass nur durch die Kombination der Chemotherapie, die einen zytotoxischen Effekt auf den Tumor hat und das immunsuppressive Milieu reduziert, mit der PD1 Blockade, die zu einer Stimulation der lokalen CD8 T Zellen führt, eine effektive allerdings lokal begrenzte antitumorale Antwort induziert wird. Um die T Zell-vermittelte Tumorantwort zu bestätigen, wurde PD-L1 im Tumorgewebe angefärbt, da in Reaktion auf das durch die T Zellen ausgeschüttete Interferon γ die Expression von PD-L1 hochreguliert wird (Dong et al., 2002). Lediglich nach der neoadjuvanten Kombinationstherapie mit α PD1/G (Abbildung 31) konnte eine erhöhte Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen nachgewiesen werden.

4.2.3. Funktionelle Relevanz der T und NK Zellen in der neoadjuvanten

α PD1/Gemcitabine Therapie

Die Funktionelle Rolle der T und NK Zellen wurde während der unterschiedlichen therapeutischen Phasen der α PD1/G Therapie untersucht. Durch die Depletion in der neoadjuvanten Phase werden diese Immunzellpopulationen dem Immunsystem während der Priming-Phase entzogen. Mithilfe der Depletion während der adjuvanten Therapiephase konnte die Bedeutung der Immunzellen bei der nachfolgenden Aufrechterhaltung der antitumoralen Antwort untersucht werden.

Die Depletionsversuche in der neoadjuvanten Therapiephase unterstreichen die zentrale Bedeutung der NK und der CD8 T Zellen für den therapeutischen Effekt der α PD1/G Therapie (Abschnitt 3.5.6.

Abbildung 32). Der Depletions-bedingte Entzug dieser Effektorzellen führte sowohl zu einem Verlust des reduktiven Effekts auf die Lokalrezidive als auch zu einem Verlust der lebensverlängernden Wirkung. Dies verdeutlicht, dass CD8 T und NK Zellen, die als zytotoxische Effektorzellen hauptverantwortlich für die Lyse der Tumorzellen sind, maßgeblich am Priming der antitumoralen Immunantwort beteiligt sind. Hierbei kann man von einer kooperativen Beteiligung der NK und CD8 T Zellen an den antitumoralen Effekten ausgehen. Xu et al. haben beschrieben, dass die NK Zellen über ihre zytolytische Aktivität das Immunsystem aktivieren und hierdurch das Priming der CD8 T Zellen initiieren können (Xu et al., 2004). Die folgende Aktivierung der CD8 T Zellen kann dabei über einen CD4 T Zell-unabhängigen Weg verlaufen (Adam et al., 2005) und es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der CD8 T Zellen im Elektroporationsmodell ebenfalls unabhängig von CD4 T Zellen verläuft, da deren Depletion keinerlei Auswirkung hat.

Während der adjuvanten Therapiephase wurden die therapeutischen Effekte nur durch die Depletion der NK Zellen beeinflusst (Abschnitt 3.5.7., Abbildung 33). Dies lässt vermuten, dass nach der Tumoresektion vor allem die NK Zellen an der lokal gerichteten zytotoxischen Aktivität gegen die Tumorzellen beteiligt sind. Allerdings konnte trotz der häufig in der Literatur beschriebenen Bedeutung der NK Zellen für die Eliminierung von Metastasen (Brodbeck et al., 2014; Ksienzyk et al., 2011) in dem PDAC Modell kein Effekt auf die Metastasierung beobachtet werden. Dies bekräftigt erneut die These, dass die systemische Immunantwort gegenüber den Metastasen ineffektiv ist.

Interessanterweise hatte die Depletion der CD8 T Zellen nach der Resektion keinerlei Auswirkung auf die Effekte der α PD1/G Therapie. Dies lässt die Vermutung zu, dass CD8 T Zellen in der adjuvanten Phase nicht an der antitumoralen Antwort beteiligt sind. Hierbei ist allerdings fraglich, ob die Depletion auch die gewebsspezifischen CD8 T Zellen, die vermutlich an der lokalen Immunantwort gegen den Tumor beteiligt sind, vollständig umfasst oder ob diese aufgrund einer möglichen begrenzten Bioverfügbarkeit der Antikörper im Resektionsrand weniger stark beeinträchtigt werden. Daher kann die Rolle der CD8 T Zellen in der adjuvanten Phase durch die gezeigte Depletion nicht vollständig aufgeklärt werden.

Die Depletionsversuche unterstreichen die Beteiligung der NK und CD8 T Zellen an der Induktion einer lokalen antitumoralen Antwort während der neoadjuvanten Therapiephase, in der das Tumorgewebe als Antigenquelle zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu scheinen nach der Tumoresektion hauptsächlich die NK Zellen für die lokale Tumorkontrolle von Bedeutung zu sein.

4.2.4. Analyse der Immunzellpopulationen nach der Resektion

Die Ergebnisse der Depletionsversuche veranschaulichen die Relevanz der NK und CD8 T Zellen für das Priming der Immunantwort in der neoadjuvanten Therapiephase und für die Aufrechterhaltung der lokalen Antitumorantwort nach der Tumoresektion. Um mögliche Auswirkungen der Tumoresektion auf die Immunzellzusammensetzung im Blut und im umliegenden Pankreasgewebe und den Einfluss der neoadjuvanten Therapie hierauf zu untersuchen, wurden die Immunzellen im Resektionsrand und im Blut analysiert. Es ist davon auszugehen, dass in Folge des chirurgischen Eingriffs eine lokale

Entzündungsantwort an der Resektionsstelle induziert wird. Es ist beschrieben, dass durch eine chirurgische Verletzung zum einen das angeborene Immunsystem aktiviert wird und zum anderen durch die ausgeschütteten proinflammatorischen Mediatoren eine systemische inflammatorische Immunantwort hervorgerufen wird (Dąbrowska and Słotwiński 2014). Gleichzeitig findet eine kompensatorische Gegenregulation statt, bei der antiinflammatorische Moleküle zur Aufrechterhaltung der Homöostase freigesetzt werden (Mokart et al., 2002). Hierdurch wird nach der Tumorsektion die Immunzellzusammensetzung an der Resektionsstelle und im Blut maßgeblich verändert.

Anhand der Analyse der T Zellen nach der Resektion des Tumors konnte eine deutliche Reduktion der CD8 T Zellfrequenz im Blut (Abschnitt 3.5.8. Abbildung 35), im Vergleich zur Analyse während der neoadjuvanten Therapie (Abschnitt 3.5.3.), nachvollzogen werden. Es ist bekannt, dass in Folge eines Traumas eine Reduktion der CD4 und CD8 T Zellfrequenz im Blut auftritt (Delogu et al., 2000). Sowohl in der unbehandelten Gruppe als auch bei den monotherapierten Gruppen konnte eine reduzierte T Zellfrequenz nach der Resektion festgestellt werden. Diese Reduktion wurde bei der Gruppe mit neoadjuvanter α PD1/G Therapie nicht beobachtet. Hier konnte eine deutlich erhöhte Frequenz an CD8 T Zellen im Blut nachgewiesen werden. Die Kombinationstherapie (α PD1/G) führte zudem zu einer leicht erhöhten Frequenz der CD8 T Zellen im Resektionsrand und gleichzeitig zu einer reduzierten CD4 T Zellfrequenz und in der Konsequenz zu einem deutlich besseren CD8/CD4 Verhältnis. Demzufolge wird durch die Kombinationstherapie der suppressive Einfluss des operativen Eingriffs auf die CD8 T Zellen minimiert und das als positiver prognostischer Marker dienende CD8/CD4 Verhältnis im Resektionsrand verbessert. Die nähere Analyse der CD8 T Zellen im Resektionsrand verdeutlicht, dass die Frequenz der gewebspezifischen CD103⁺CD8⁺ T Zellen, die bereits während der neoadjuvanten α PD1 und α PD1/G Therapie im Tumorgewebe erhöht sind, auch nach der Resektion in diesen beiden Gruppen in einer höheren Frequenz vorliegen (Abbildung 36). Die operative Tumorentfernung führt im Blut zu einer deutlich reduzierten NK Zellfrequenz bei der unbehandelten Gruppe (Abbildung 37). Bei den monotherapierten Gruppen konnte, vermutlich in Folge der adjuvanten Gemcitabinegabe, eine leicht erhöhte NK Zellfrequenz festgestellt werden. Ein deutlicher Effekt auf die NK Zellen konnte bei der neoadjuvanten α PD1/G Therapie beobachtet werden. Diese führte zu einer deutlich erhöhten Frequenz der gesamten NK Zellpopulation sowie der konventionellen NK Zellen im Blut. Es ist gut bekannt, dass in Folge der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch das operative Trauma Leukozyten wie Neutrophile, Makrophagen und unreife Vorläuferzellen angezogen werden (Gaudillière et al., 2014; Wang et al., 2017). Dies führt im Elektroporationsmodell dazu, dass die bereits gezeigten und beschriebenen reduktiven Effekte der Gemcitabinetherapie auf die myeloiden Zellen nach der Resektion nur begrenzt bemerkt werden können (Abbildung 38). Im Blut hatte Gemcitabine einen geringen Einfluss auf die MDSCs (CD11b⁺Gr1⁺) und in den zwei Gruppen, die neoadjuvant und adjuvant Gemcitabine (G + adj.G; α PD1/G + adj.G) erhielten, konnte eine vergleichsweise reduzierte Frequenz dieser Zellen detektiert werden. Im Resektionsrand wurde in allen Gruppen eine hohe Frequenz an MDSCs ermittelt. Diese

war auch im Vergleich zur Frequenz im Tumorgewebe erhöht (Abschnitt 3.5.3.), und wurde nicht durch die Gemcitabinegabe beeinflusst. Diese stark erhöhte Frequenz ist sehr wahrscheinlich durch den operativen Eingriff bedingt, der einen Heilungsprozess im Pankreasgewebe induziert und so zur Rekrutierung von MDSCs führt. Diese setzen sich aus einer Vielzahl von myeloiden Vorläuferzellen zusammen und sind an dem Wundheilungsprozess beteiligt (Ou et al., 2015). Die Analyse der Subpopulationen verdeutlicht, dass Gemcitabine zwar keinen Einfluss auf die Gesamtpopulation der MDSCs hat, aber im Resektionsrand zu einer deutlichen Reduktion der immunsuppressiven CD11b⁺Gr1^{int}F4/80^{int} (P2) führt (Abbildung 39). Im Blut führte die neoadjuvante Therapie mit α PD1 und die Kombination aus α PD1/G zu einer erhöhten Frequenz der CD11b⁺Gr1^{low}F4/80⁺ (P3) Zellen, die sich z.T. aus Makrophagenvorläufern zusammensetzen. Es ist beschrieben, dass tumorassoziierte Makrophagen an der Resistenzentwicklung gegenüber α PD1 beteiligt sind, da sie die Antikörper binden und vermutlich deren Abbau triggern (Arlaukas et al., 2017). Die erhöhte Population im Blut könnte ein Indiz für eine Rolle dieser Zellen im Zusammenhang mit dem Antikörper liefern.

Die durchflusszytometrische Analyse nach der Resektion verdeutlicht, dass der operative Eingriff der Tumorsektion die Immunzellpopulationen im Blut und im Resektionsrand maßgeblich beeinflusst. Neben einer Reduktion der CD8 T und NK Zellfrequenz im Blut wird eine deutlich erhöhte Frequenz der immunsuppressiven MDSCs induziert. Diese operationsbedingten immunsuppressiven Effekte werden durch die Kombinationstherapie minimiert. Trotz der systemischen Wirkung der α PD1/G Therapie auf die CD8 T und NK Zellen konnten bei den Überlebensanalysen keine systemischen antitumoralen Immunantworten gegenüber den Metastasen beobachtet werden. Bei der operativen Behandlung von regionalem Brustkrebs bei Patienten ist gezeigt worden, dass die NK Zellen im Blut verringerte lytische Aktivität und die Lymphozyten verringerte Antworten aufweisen (Andersen et al., 1998). Zudem wurde in einem murinen Brustkrebs Modell bestätigt, dass durch einen operativen Eingriff eine Dysfunktion der NK Zellen hervorgerufen und hierdurch die Entwicklung von Metastasen drastisch gesteigert wird (Tai et al., 2013). Diese operationsbedingte Dysfunktion könnte auch eine Erklärung für die ineffektive Bekämpfung der Metastasen durch die Effektorzellen bei der Kombinationstherapie (α PD1/G) nach der Resektion liefern.

4.2.5. Identifikation eines immuntherapeutischen Targets zur NK Zellstimulation

Die Kombinationstherapie führte zwar zu deutlich erhöhten CD8 T und NK Zellfrequenzen im Blut dennoch konnte keine Eliminierung der Metastasen beobachtet werden, was möglicherweise auf eine operationsbedingte Dysfunktion der Effektorzellen hindeutet. Aufgrund der bekannten Rolle der NK Zellen bei der Bekämpfung von Metastasen (Kim et al., 2000; Sodeur et al., 2009) wurden die Tumorzellen der induzierten Tumore auf die Expression von NK Zellliganden untersucht. Hierdurch sollte ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt für eine NK Zellstimulation gefunden werden, um die durch den chirurgischen Eingriff hervorgerufene Dysfunktion zu umgehen. Hierbei zeigt sich, dass die Tumorzellen keine Expression der NKG2D-Liganden Rae1 γ oder Mult1 aufwiesen (Abschnitt 3.5.9., Abbildung 40), für die eine Beteiligung an der antitumoralen NK Zellaktivität beschrieben

wurde (Deng et al., 2015; Lam et al., 2014). Im Gegensatz dazu konnte eine starke Expression von CD155 auf den Tumorzellen der Primärtumore sowie auf den Tumorzellen von Rezidiven und Lebermetastasen des Elektroporationsmodells nachgewiesen werden. Die Expression von CD155 auf Tumorzellen wurde mit einer erhöhten Tumorpheriferation und Migration in Verbindung gebracht (Kono et al., 2008; Sloan et al., 2004), zudem ist CD155 in der Interaktion mit NK Zellen involviert. CD155 bindet sowohl an den aktivierenden NK Zell-Rezeptor CD226 als auch an die inhibierenden Rezeptoren CD96 und TIGIT. Sowohl CD96 als auch TIGIT binden mit höherer Affinität an CD155 und kompetieren hierbei mit CD226 um die Bindung. Für CD96 wurde beschrieben, dass es *in vivo* die NK Zell Funktion über direkte Inhibierung limitiert, während dies für TIGIT nicht gezeigt werden konnte (Chan et al., 2014). Die Blockade der Interaktion von CD96 mit CD155 stellt daher eine vielversprechende Achse zur Stimulation der NK Zellaktivität dar.

Für den Einsatz der NK Zellstimulation zur Bekämpfung der disseminierten Tumore sollte verifiziert werden, ob die NK Zellen in der Lage sind, die Tumorzellen zu eradizieren. Die zytotoxische Aktivität der NK Zellen gegenüber den Tumorzellen wurde *in vitro* über eine Koinkubation bestätigt (Abbildung 41). Hierbei konnte eine vom Effektor:Zielzell-Verhältnis abhängige Lyse nachgewiesen werden.

4.2.6. Immuncheckpointblockade mit CD96 und sequenzielle Kombination mit neoadjuvanter α PD1/G Therapie

Um die vermutete operationsbedingte Dysfunktion, die zu einer ineffektiven Antwort der α PD1/G-induzierten NK Zellen gegenüber Fernmetastasen führt, zu umgehen, wurde eine Antikörpervermittelte Stimulation der NK Zellen eingesetzt. Die Blockade der inhibitorischen CD96/CD155-Achse erfolgte mit gegen CD96 gerichteten Antikörpern, um hierüber NK Zellen zu aktivieren. Es wurden zwei Antikörperklone mit unterschiedlicher Effizienz in der Blockierung der Rezeptor-Liganden Interaktion eingesetzt. Im Gegensatz zu 8B10 wird durch den 6A6 Antikörper die Interaktion vollständig blockiert (Seth et al., 2007). Die Antikörper wurden zuerst in einer adjuvanten Therapie eingesetzt, um die Wirkung der CD96 Blockade nach der Resektion zu evaluieren. Hierbei zeigt sich, dass der reduktive lokale Effekt von Gemcitabine um einen systemischen Effekt durch den zusätzlichen Einsatz von 6A6 ergänzt werden konnte (Abschnitt 3.5.10., Abbildung 42). Der blockierende Antikörper führte zu einer deutlichen Reduktion der Metastasierungsrate und damit einhergehend zu einem verlängerten Überleben bei einigen Mäusen der therapierten Gruppe. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz des zweiten Antikörperklons 8B10 nicht erzielt werden. Hierdurch wird die potente antimetastatische Wirkung des 6A6 Antikörpers deutlich, die auch von Blake et al. in verschiedenen murinen Metastasentumormodellen beschrieben wurde (Blake et al., 2016). Der adjuvante Einsatz der CD96 Blockade verdeutlicht, dass infolge der NK Zellstimulation eine verbesserte Eliminierung systemischer Metastasen möglich ist.

Durch den sequenziellen Einsatz der CD96 Blockade nach neoadjuvanter α PD1/G Therapie sollte neben der Reduktion der Rezidive auch eine verbesserte Eliminierung der Metastasen erfolgen, um

einen synergistischen therapeutischen Effekt zu erzielen. Eine Blutanalyse während der sequenziellen Therapie zeigt, dass die Mäuse, die adjuvant zusätzlich mit der CD96 Blockade therapiert wurden, eine deutlich erhöhte Frequenz von NK Zellen aufwiesen. Dies unterstützt die These, dass in Folge der Blockade der CD96/CD155 Interaktion eine Stimulation der NK Zellen erfolgt, und verdeutlicht die beschriebene Beteiligung der NK Zellen an der Eliminierung von Metastasen. Der sequenzielle Einsatz der neoadjuvanten α PD1/G Therapie mit der adjuvanten CD96 Blockade mittels 6A6 führte zu einem deutlichen therapeutischen Effekt auf das Überleben (Abschnitt 3.5.11., Abbildung 43). Neben einem erhöhten mittleren Überleben konnte durch die Therapie bei 35% der Mäuse ein progressionsfreies Langzeitüberleben erzielt werden. Die histologische Analyse der Organe zeigt, dass die therapierte Gruppe ein insgesamt ausgeglicheneres Auftreten von Lokalrezidiven und Metastasen aufweist. Dieses wurde vermutlich durch den reduktiven Effekt der neoadjuvanten Therapie auf die Lokalrezidive und durch die α CD96-vermittelte Antwort gegen die Metastasen bedingt. Im Gegensatz hierzu konnte bei der Blockade mit dem Antikörper 8B10 nur ein geringer therapeutischer Effekt beobachtet werden. Durch die geringere Blockierungseffizienz dieses Antikörpers ist von einer residualen Interaktion von CD96 mit CD155 auszugehen, die die geringfügige Beeinflussung auf die Metastasierung erklären könnte. Anhand einer Depletion der NK Zellen wurde bei der perioperativen Therapie mit α PD1/G und CD96 Blockade mit 6A6 die Relevanz der NK Zellen für den therapeutischen Effekt bestätigt. Die Depletion resultierte in einem kompletten Verlust des therapeutischen Effekts. Neben einer drastischen Reduktion des Überlebens der Mäuse, trat in allen Mäusen eine ausgeprägte Lokalrezidivierung und Metastasierung auf. Durch die optimale Adaption der Immuntherapien an die spezifischen Anforderungen in der neoadjuvanten und adjuvanten Situation konnte nach der operativen Entfernung des Tumors in diesem aggressiven und metastatischen PDAC Modell ein Wiederauftreten von Tumoren verhindert und hierdurch ein tumorfreies Langzeitüberleben ermöglicht werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit klinischer Studien zum Einsatz von koordinierten T und NK Zell-gerichteten Immuntherapien zur unterstützenden Behandlung bei der Resektionstherapie von Pankreaskarzinompatienten.

4.3. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte koordinierte CD8 T und NK Zellstimulation zur Unterstützung der Tumorresektion führte zu hocheffektiven therapeutischen Effekten im etablierten metastasierenden PDAC Modell und stellt eine vielversprechende Strategie für der Behandlung des resektablen PDAC in der Klinik dar. Die neoadjuvante Stimulation der T Zellen mit α PD1/G führte zu einer erhöhten Frequenz der gewebspezifischen CD103⁺ CD8 T Zellen im Tumorgewebe und diese konnten auch nach der Resektion im verbliebenen Pankreasgewebe in erhöhter Frequenz nachgewiesen werden. Diese sind vermutlich am Therapie-bedingten lokalen antitumoralen Effekt beteiligt und es wäre zunächst interessant die Kinetik der α PD1-vermittelten Induktion gewebspezifischer T Zellen genauer zu untersuchen. Hierdurch könnte der optimale Zeitpunkt für die Tumorresektion ermittelt und der zeitliche Verlauf der Therapie gegebenenfalls weiter optimiert werden. Dies könnte eventuell eine frühere Resektion ermöglichen und den therapeutischen Erfolg positiv beeinflussen. Zudem wäre auch für zukünftige Therapien von Relevanz, zu klären ob die adjuvante PD1 Blockade in stärker immunogenen Tumoren eine Wirksamkeit zeigt.

Zudem könnte eine genauere Analyse der bisher nur wenig verstandenen gewebsständigen Immunität einen tieferen Einblick in die lokalen Effekte der neoadjuvanten Therapie geben. Hierbei wäre vor allem eine Analyse der intratumoralen dendritischen Zellen, die über eine CD103 Expression bestimmt werden, interessant. Diese CD103⁺DC sind notwendig um antitumorale Effekte zu generieren und es wurde gezeigt, dass diese APCs eine kritische Rolle beim Transport des Tumorantigens zum Lymphknoten und bei der Induktion einer tumorspezifischen CD8 T Zellantwort haben.

Bei der koordinierten Immuntherapie kommt den NK Zellen eine entscheidende Bedeutung zu. Über eine detaillierte Charakterisierung der stimulierten NK Zellen anhand der Expression von Aktivierungsmarkern könnten weitere Moleküle für eine NK Zellstimulation identifiziert werden. Diese könnten auf einen möglichen therapeutischen Effekt untersucht und zur Komplementierung der CD96 Therapie eingesetzt werden. Als weiteres immuntherapeutisches Target könnte z.B. eine Blockade der ebenfalls hochaffinen und inhibitorisch-wirkenden Bindung von TIGIT an CD155 oder eine direkte Aktivierung der NK Zellen durch die Adressierung von CD226 genutzt werden.

Zudem könnten alternative Therapien im neoadjuvanten Setting zur Stimulation der Immunantwort genutzt und mit den in der Arbeit etablierten kombiniert werden. Der Einsatz onkolytischer Viren könnte durch die Zerstörung des Tumors zum einen eine Verringerung der Tumorlast bewirken und zum anderen durch eine erhöhte Antigenverfügbarkeit und gleichzeitiger Kreuzpräsentation dieser eine antitumorale Antwort generieren. Auch der Einsatz von Toll-like Rezeptor Agonisten die Th1 und Dendritische Zellen stimulieren ist als neoadjuvante Therapie zur Immunstimulation denkbar und könnten die etablierte Therapie sinnvoll ergänzen.

5. Material und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1. Chemikalien und Enzyme

Produkt	Hersteller
1 kb ⁺ DNA ladder	New England BioLabs
Agar Select	Invitrogen™
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi
<i>Antartic Phosphatase</i>	New England BioLabs
<i>Antartic Phosphatase</i> Puffer	New England BioLabs
Antibody diluent, background reducing	Dako
Antigen retrieval pH6 (10x)	Dako
Antigen retrieval pH9 (10x)	Dako
ATP	New England BioLabs
Brefeldin A (1000x)	Biolegend
BSA	New England BioLabs
Collagenase Typ IA	Sigma-Aldrich
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich
Deoxyribonuclease 1(DNAse)	Sigma-Aldrich
D-Glucose	Merck
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	peqlab
Dispase	Sigma-Aldrich
D-Luciferin Natriumsalz	Sigma-Aldrich
DMEM + GlutaMAX™-I	GIBCO <i>life technologies</i>
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England BioLabs
dNTPs	Invitrogen™
DPBS (10x)	GIBCO <i>life technologies</i>
Eosin Y Solution Aqueous	Sigma-Aldrich
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FCS	GIBCO <i>life technologies</i>
Gemcitabine	Hexal
Glycylglycin	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂ (3%)	Bernd Kraft
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
Histostain Streptavidin-HRP	Invitrogen™
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
Ionomycin Calciumsalz	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck
Isotonische NaCl Lösung	Braun
Ketamin Gräub®	Albrecht
Kristallviolett	Merck
Lysozym	Sigma-Aldrich
Mayers Hämalaunlösung	Merck
MEM NEAA (100x)	GIBCO <i>life technologies</i>

Produkt	Hersteller
MgCl ₂	Merck Schuchardt
MgSO ₄	Merck
NaCl	J.T. Baker
Na-EDTA	Calbiochemie
NaN ₃	Merck
Natriumpyruvat (100x)	GIBCO <i>life technologies</i>
Paraffin	Medite GmbH
Paraformaldehyd	Merck
Penicilin/Streptomycin	Merck
Peptid LAMA4(G1254V) (VGFNFRTL)	ProImmune
Peptid Spectrin β (VAVVNQIAL)	ProImmune
Pepton	Carl Roth GmbH
peqGold PCR Hot Start Mix Y	Peqlab
Phorbol 12-myristate 13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin	Polyscience Inc
Propidiumiodid	PanReac Applichem
Puffer 2 /3 /4 (10x)	New England BioLabs
Puromycin	Merck Calbiochem
Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs
RBC lysis Buffer (10x)	Biolegend
Recombinant high grade Proteinase K	Roche
RNAse	Boehringer Ingelheim
Rompun®	Bayer AG
RPMI 1640	GIBCO <i>life technologies</i>
Sucrose	ICN Biomedicals
T4 Ligase	New England BioLabs
T4 Ligationspuffer	New England BioLabs
T4 Polynukleotid Kinase	New England BioLabs
T4 Polynukleotid Kinase Puffer	New England BioLabs
TE (Endotoxin-frei)	Qiagen
Trisbase	Applichem
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin	Merck
Trypton	FlukaBiochemica
Tween 20	Sigma-Aldrich
<i>UltraPure</i> Agarose	Gibco BBL
<i>Ultrapure</i> Sucrose	ICN-Biomedicals Inc.
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 4 – Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme und deren Hersteller

5.1.2. FACS Antikörper

Bezeichnung	Kopplung	Klon	Hersteller
Anti-Maus CD103	PE	2E7	Biolegend
Anti-Maus CD11a	APC	M17/4	Biolegend
Anti-Maus CD11b	FITC	M1/70	Biolegend
Anti-Maus CD155	PE	TX56	Biolegend
Anti-Maus CD4	APC/FITC	GK1.5	Biolegend
Anti-Maus CD25	PE	PC61.5	Biolegend
Anti-Maus CD44	FITC	IM7	Biolegend
Anti-Maus CD45.2	PerCP	104	Biolegend
Anti-Maus CD49b	FITC/APC	DX5	Biolegend
Anti-Maus CD69	PE	H1.2F3	Biolegend
Anti-Maus CD8	APC/FITC	53-67	Biolegend
Anti-Maus CD90.2	PerCP	30-H12	Biolegend
Anti-Maus F4/80	APC/FITC	BM8	Biolegend
Anti-Maus Gr1	PE	RB6-8C5	eBioscience
Anti-Maus IFN γ	APC	XMG1.2	Biolegend
Anti-Maus MHC I	FITC	28-8-6	Biolegend
Anti-Maus Mult1	PE	5D10	eBioscience
Anti-Maus NK1.1	FITC/PE	PK 136	Biolegend
Anti-Maus PD1	PE	29F.1A12	Biolegend
Anti-Maus PD-L1	PE	10F.9G2	Biolegend
Anti-Maus Rae1 γ	PE	CX1	Biolegend
Isotyp Kontrolle Rat IgG2b, κ	-	RTK4530	Biolegend
Isotyp Kontrolle Rat IgG2a, κ	-	RTK2758	Biolegend
Isotyp Kontrolle Armenian Hamster IgG	-	HTK888	Biolegend

Tabelle 5 – Liste der verwendeten FACS Antikörper

5.1.3. IHC Antikörper

Zielstruktur	Wirtsspezies	Reaktivität	Klon	Hersteller
a-SMA (ACTA2)	Kaninchen	Maus	ab124964	Abcam
E-Cadherin	Maus	Maus	ab76055	Abcam
CK19	Maus	Maus/Mensch	14-9898-82	eBioscience
p-ERK-1/2	Kaninchen	Maus	4376S	Cell signaling
p-Akt2 (pS474)	Kaninchen	Maus	ab97727	Abcam
PD-L1	Kaninchen	Maus	ab131073	Abcam

sekundär Antikörper

Biotin-goat α -mouse	Ziege	Maus	B2763	Invitrogen
Biotin-goat α -rabbit	Ziege	Kaninchen	B2770	Invitrogen

Tabelle 6 - Für die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten verwendete Antikörper

Bezeichnung	Wirtsspezies	Reaktivität	Code No.	Hersteller
AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Esel	Maus	715-007-003	Jackson ImmunoResearch
Antibody diluent, S3022	-	-	S302281	Dako
Rabbit IgG1 isotyp Kontrolle	-	-	ab125938	Abcam
Maus IgG1 isotyp Kontrolle	-	-	ab91353	Abcam

Tabelle 7 – Weitere für die IHC Färbung verwendete Materialien

5.1.4. Medien und Pufferlösungen

LB-Medium	Pepton	1 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	0,5 %
Selektionsmediumplatten	LB-Medium	500 ml
	Ampicillin	100 µg/ml
	Agar Select	7,5 g
SOC-Medium	Trypton	2 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	0,05 %
	MgSO ₄	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glucose	0,4 %
TAE pH 8,5	Tris/Acetat pH 8,5	40 mM
	EDTA	1 mM
STET Puffer pH 8,0	Trisbase	50 mM
	Na-EDTA	50 mM
	Sucrose	8 %
	Triton-X-100	0,5 %
Tumorverdaumedium	RPMI	
	Hyaluronidase	0,2 mg/ml
	DNase	0,2 mg/ml
	Collagenase Typ IV	0,2 mg/ml
	Collagenase Typ IA	0,2 mg/ml
	Dispase (nur bei Kultivierung der Tumorzellen)	0,3 mg/ml
2% DCCM-RPMI	RPMI 1640	
	Fötale Kälberserum	2%
	MEM NEAA	1x
	Natriumpyruvat	1x
	β-Mercaptoethanol	50 µM
	Penicillin/Streptomycin	0,01 mg/ml
Luciferase-Messpuffer	Glycylglycin	25 mM
	MgSO ₄	15 mM
	ATP	5 mM
Extraktionspuffer	Tris/Phosphat pH 7,8	25 mM
	EDTA	2 mM
	Glycerol	10 %
	Triton-X 100	1 %
FACS-Waschpuffer	NaCl	0,9%
	FCS	2 %
	NaN ₃	0,1%

Kernfärbelösung	Propidiumiodid	0,15 mg/ml
	Natriumacetat	4 mM
	BSA	1 %
	Triton-X 100	1 %
RNase-Lösung	Tris pH 7,5	10 mM
	Ribonuclease A	10 mg/ml
	NaCl	15 mM
PFA 4%	PBS	
	PFA	4 %
Dissoziationspuffer	PBS	
	EDTA	5 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	HEPES	10 mM
Kristallviolett-Lösung	Kristallviolett	0,1 %
	Ethanol	10 %
PBS-Tween	PBS	
	Tween 20	0,05 %
TE pH 8,0	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
Zellkulturmedium	DMEM + Glutamax TM	
	Fötale Kälberserum	10 %
	Penicillin/Streptomycin	0,01 mg/ml

Tabelle 8 – Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

5.1.5. Bakterienstämme

JM109 – Es wurden chemisch-kompetente Bakterien des modifizierten *E.coli* Stammes (Fa. Gibco), der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde, verwendet. Genotyp: F-*traD36 lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+/e14-(MrcA-) Δ(lac-proAB thi gyrA96 (Nalr) endA1 hsdR17(rK-,mK+) relA1 supE44 recA1*

5.1.6. Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
PGK-Cre	Expressionsplasmid mit einem PGK Promotor, codiert die Cre Rekombinase, die loxP Stellen erkennt und spaltet (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaus Rajewsky, Max-Delbrück-Centrum, Berlin; Addgene plasmid 11543)
PGK-SB13	Expressionplasmid mit PGK Promotor, codiert für die <i>Sleeping Beauty Transposase</i> 13, diese ermöglicht die stabile genomische Integration von Genen, die von <i>inverted terminal repeats</i> (ITR) flankiert sind (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von David A. Largaespada, University of Minnesota)
pT-Kras ^{G12V}	pT-ITR-EF1α-Kras^{G12V}-ITR Transposonplasmid codiert für onkogenes Kras ^{G12V} unter der Kontrolle des EF1 α Promotors und durch ITR Flankierung zugänglich für SB13 vermittelte genomische Integration (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Engin Gürlevik, beschrieben in Gürlevik et al., 2013)
pT-p53-129	pT-ITR-EF1α-p53-K129E-ITR Transposonplasmid zur Expression der p53-Mutante K129E unter der Kontrolle eines EF1 α Promotors; die ITR Flankierung ermöglicht eine genomische Intergration mittels SB13 Transposase (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Norman Woller)
pT-p53-172	pT-ITR-EF1α-p53-R172H-ITR Transposon-basiertes Expressionsplasmid codiert für die p53 Mutante R172H unter der Kontrolle des EF1 α Promotors; aufgrund der ITR flankierung ist eine SB13 vermittelte genomische Integration möglich (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Norman Woller)
pT-p53-246	pT-ITR-EF1α- p53-R246S-ITR Transposonplasmid, codiert für die p53 Mutante R246S unter der Kontrolle des EF1 α Promotors; die ITR Flankierung ermöglicht eine genomische Intergration mittels SB13 Transposase (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Norman Woller)
pT-myrAkt2	pT-ITR-PGK-myrAkt2-ITR Transposon-basiertes Plasmid mit PGK Promotor, codiert für Akt2 mit einer N-terminalen Myristoylierungssequenz für konstitutive Aktivierung; die ITR Flankierung ermöglicht eine SB13 vermittelte genomische Integration (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Engin Gürlevik, beschrieben in Gürlevik et al., 2016)
pT-shp16/p19	pT-ITR-EF1α-shp16[371]/p19[435]-shp19[114]-ITR Transposon-basiertes Plasmid codiert für shRNA gegen p16/p19, die zur mRNA komplementären 22mer Nukleotidsequenzen binden die mRNA ab Position 371 bzw. 435; eine zusätzliche shRNA gegen p19 bindet die mRNA ab Position 43;. eine Flankierung mit ITR ermöglicht eine SB13 vermittelte genomische Integration (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Engin Gürlevik)
pT-shp53	pT-ITR-EF1α-shp53-ITR Expressionsplasmid mit EF1 α Promotor für shRNA gegen p53, diese besteht aus einer 22mer langen Nukleotidesequenz komplementär zur p53 mRNA Sequenz von der Position 844 zu 866, wurde vom LMP-Konstrukt bezogen (Open Biosystems, Huntsville, AL); die flankierenden ITRs ermöglichen eine genomische Integration mittels SB13 (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Engin Gürlevik, beschrieben in Brinkhoff et al., 2014)

Bezeichnung	Beschreibung
pT-EF1 α	pT-ITR-EF1α-MCS-ITR pT3 (Xin Chen, Addgene plasmid 31789) basiertes Transposonplasmid bei dem der EF1 α Promotor und die <i>multiple cloning site</i> (MCS) von <i>inverted terminal repeats</i> (ITR) flankiert sind
pT-EGFP	pT-ITR-EF1α-EGFP-ITR Expressionsplasmid für EGFP (<i>enhanced green fluorescent protein</i>) unter der Kontrolle eines EF1 α Promotors; die flankierenden ITRs ermöglichen eine stabile genomische Integration mittels SB13 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Engin Gürlevik, beschrieben in Gürlevik et al., 2013)
pBS	pBlueScript KS+ (Stratagene) Klonierungsplasmid mit T3 und T7 Promotor der zum Auffüllen von Transfektionsansätzen (<i>nonsense</i> -DNA) verwendet wurde
pBS-fLuc-L272A	pBS basiertes Plasmid codiert für eine mutierte Form der Firefly Luciferase (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dmitrij Ostroumov)
pT-LAMA4-G1254V	pT-ITR-EF1α-LAMA4-G1254V-ITR Dieses pT3 basierte Plasmid codiert für den immunoeditierten neoepitop Tag von Laminin 4 (LAMA4-G1254V) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Norman Woller beschrieben in Knocke et al., 2016)
pT-MHCII ^{Tag1+2}	pT-ITR-EF1α-(MHCII^{OVA-Tag})₂-ITR Dieses pT3 basierte Plasmid codiert für zwei MHCII Ovalbumin Tags (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Norman Woller, beschrieben in Knocke et al., 2016)
MSV-shSMAD4[S91]	<i>Murine Stemcell</i> Virus basierter Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen SMAD4 codiert, diese besteht aus einer zur mRNA komplementären 22mer langen Nukleotidsequenz und bindet die mRNA ab Position 91 (Etabliert, getestet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Saborowski)
MSV-shSMAD4[S95]	<i>Murine Stemcell</i> Virus basierter Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen SMAD4 codiert, diese besteht aus einer zur mRNA komplementären 22mer langen Nukleotidsequenz und bindet die mRNA ab Position 95 (Etabliert, getestet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Saborowski)
MSV-shSMAD4[1599]	<i>Murine Stemcell</i> Virus basierter Expressionsvektor, der für eine shRNA gegen SMAD4 codiert, diese besteht aus einer zur mRNA komplementären 22mer langen Nukleotidsequenz und bindet die mRNA ab Position 1599 (Etabliert, getestet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Saborowski)

Tabelle 9 – Liste der verwendeten, von der Arbeitsgruppe und Kollaborateuren zur Verfügung gestellten, Plasmide

5.1.6.1. Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pT-shSMAD4[S91]	pT-ITR-EF1α-shSMAD4[S91]-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid zur Expression der shRNA gegen SMAD4[S91]; die flankierenden ITR ermöglichen eine SB13 vermittelte genomische Intergration
pT-shSMAD4[S95]	pT-ITR-EF1α-shSMAD4[S95]-ITR Dieses pT3 basierte Expressionsplasmid codiert für die shRNA gegen SMAD4[S95] und die ITR ermöglichen eine stabile genomische Integration mittels SB13
pT-shSMAD4[1599]	pT-ITR-EF1α-shSMAD4[1599]-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid für die Expression der shRNA gegen SMAD4[1599]; eine stabile genomische Integration wird durch die flankierenden ITR bei Verwendung von SB13 möglich
pT-shSMAD4[S91][S95]	pT-ITR-EF1α-shSMAD4[S91]-[S95]-ITR Dieses pT3 basierte Expressionsplasmid codiert für zwei shRNA gegen SMAD; die shRNA bestehen aus 22mer langen zur mRNA komplementären Nukleotidsequenzen die ab Position 91 und 95 binden
pT-shSMAD4	pT-ITR-EF1α-shSMAD4[S91]-[S95]-[1599]-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid für die Expression von drei shRNA gegen SMAD4; die shRNA bestehen aus 22mer langen zur mRNA komplementären Nukleotidsequenzen die ab Position 91, 95 und 1599 binden; die flankierenden ITRs ermöglichen eine stabile genomische Integration mittels SB13
pT-shBRCA1#1	pT-ITR-EF1α-shBRCA1#1-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid für die Expression einer 21mer langen shRNA komplementär zur mRNA von BRCA1; sie shRNA ist bereits beschrieben in Okamoto et al., 2013 und wurde über Oligonucleotide generiert; die ITR Flankierung ermöglicht eine SB13 vermittelte genomische Integration
pT-shBRCA1#2	pT-ITR-EF1α-shBRCA1#2-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid für die Expression einer 21mer langen shRNA gegen BRCA1; die shRNA ist bereits beschrieben in Okamoto et al., 2013 und wurde über Oligonucleotide generiert; die flankierenden ITR ermöglichen eine SB13 vermittelte genomische Integration
pT-shBRCA1	pT-ITR-EF1α-shBRCA1-#1-#2-ITR Dieses pT3 basierten Expressionsplasmid codiert beide zuvor beschriebenen Varianten der shRNA gegen BRCA1; die ITR Flankierung ermöglicht eine SB13 vermittelte genomische Integration
pT-LAMA4-G1254V	pT-ITR-EF1α-LAMA4-G1254V-(MHCII^{OVA-Tag})₂-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid für die Expression des neoepitop Tags LAMA4-G1254V mit zwei MHCII Ovalbumin Tags unter der Kontrolle eines EF1 α Promotors; die ITR machen die flankierte Sequenz zugänglich für eine stabile genomische Integration mittels SB13
pT-fLuc-L272A	pT-ITR-EF1α-fLuc-L272A-ITR pT3 basiertes Expressionsplasmid codiert für mutierte Form der Firefly Luciferase (L272A) unter der Kontrolle eines EF1 α Promotors; durch die ITR Flankierung ist eine SB13 vermittelte stabile genomische Integration möglich

Tabelle 10 – Liste der im Rahmen der Arbeit generierten Plasmide

5.1.7. Oligonukleotide

Primer	Sequenz
BRCA1#1 fw	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGGCAATTCAGAGCCAGATTA TGTATGTGAAGCCACAGATGGTA
BRCA1#1 rev	ACTAGTGAAGTCCGAGGCAGTAGGCAACAATTCAGAGCCAGATTAT GTACCATCTGTGGCTTCACATAC
BRCA1#2 fw	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGGCAAACATGTCAGGAGCAG CAATTGTGAAGCCACAGATGGAT
BRCA1#2 rev	ACTAGTGAAGTCCGAGGCAGTAGGCAACAAACATGTCAGGAGCAG CAATCCATCTGTGGCTTCACAATT
Nhe fw	GGGCTAGCAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGG
Xba/Spe rev	TTTCTAGACTAGTGAAGTCCGAGGCAGTAGGCAA
p53 int1 fw	CACAAAACAGGTTAAACCCAG
p53 int1 rev	AGCACATAGGAGGCAGAGAC
p53 int10 fw	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG
p53 int10 rev	AAGGGGTATGAGGGACAAGG
p53 ex11 fw	CTACCTGAAGACCAAGAAGG
p53 ex11 rev	TGGAGGATATGGACCCTATG
p53-mut rev	TTGAGGGGAGGAGAGTACGTGC
Kras ^{G12V} rev	CCCAGTTCTCATGTACTGGT
myrAkt2 rev	CTCTCCCTCTCATCTGGAGA
PGK fw	GCACGCTTCAAAGCGCACGTCGT
EF1 α fw	CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGG
pT rev	CTAGAATGCAGCGGCCACAC

Tabelle 11 – Liste der verwendeten Oligonukleotide. Alle Primer wurden von der Firma eurofins MWG Operon mit der Aufreinigungsort 0,01 HPFS bezogen. *rev=reverse, fw=forward*.

5.1.8. Kits

Bezeichnung	Hersteller
BD Cytotfix/Cytoperm	BD Bioscience
DAB Substrat Kit	Zytomed
NK Cell Isolation Kit II, mouse	Miltenyi Biotek
Q5 [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase Kit	New England Biolabs
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
ZymoPure [™] Plasmid MaxiPrep Kit	Zymo

Tabelle 12 – Liste der verwendeten Kits

5.1.9. Geräte und sonstige Materialien

Bezeichnung	Gerätetyp
Einbettter	Leica TP1020
Elektrokauter	Erbe ICC 50 COAG
Elektroporator	Square Wave Elektroporator CUY21SC NEPAGENE
FACS	BD FACS Canto™ II
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM4000B
Inkubator	SANYO CO ₂ Inkubator Typ MCO-18AIC
Kühlzentrifugen	Beckmann Coulter Avanti™ J-25
	Eppendorf Zentrifuge 5417 R
	Heraeus Multifuge X1R
Luminator	Lumat Berthold LB9507
Mikrotom	Microm HM335-E, GMI Inc
PCR Maschine	T3 Thermocycler Biometra
Photometer	BioTEK Instruments
Schüttelinkubator	Edmund Bühler SM 40 Control
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort
Tischzentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415 C
UV Transilluminator	GelDoc 2000 BioRAD

Tabelle 13 – Liste der verwendeten Geräte

Produkt	Hersteller
15 mL Röhrchen	Sarstedt
24-well Platte, Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific
50 mL Röhrchen	Greiner bio-one
96-well Platte	Greiner bio-one
Cell Strainer 40 µm Nylon	BD Falcon™
EDTA KE/1.3 Probengefäß	Sarstedt
Einbettkassetten	Medite GmbH
Einmalkanüle 24G, Microlance™ 3	BD
Einmalkanüle 27G	Braun
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
FACS Röhrchen	Sarstedt
Liga CLIP® Extra small	Ethicon Endo-Surgery, LLC
Menzel Deckgläser	Thermo Scientific
Nahtmaterial Marlin violett DS 12 4/0 USP	Catgut GmbH
Nahtmaterial PCL violett DR12 6/0 USP	Catgut GmbH
Objekträger; Objekträger Super Frost	Thermo Scientific
Operationsbesteck	Fine Science Tools
Pipettenspitzen; Filtertips	Sarstedt
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Spritze 1 ml, Omnifix®-F	Braun
Wattestäbchen	Heinz Herenz Hamburg
Zellkulturflasche T75 für adhärenente Zellen	Sarstedt
Zellkulturschale 6cm	Sarstedt
LIGACLIP Einzelclipapplikatoren LC107	Ethicon Endo-Surgery, LLC

Tabelle 14 – Liste der verwendeten Materialien

5.2. Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Zellkulturgefäßen im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂. Alle arbeiten erfolgten an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen.

5.2.1. Kultivierung von primären Tumorzellen

Die Zellen wurden aus den per Elektroporation induzierten Primärtumoren isoliert und kultiviert. Hierfür wurde das Tumorgewebe mit einem Skalpell zerkleinert und in Tumorverdaumedium für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Filtration der Lösung durch ein 40 µm Nygonsieb und Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. Die Zellen wurden passagiert bis ausschließlich Tumorzellen in der Flasche erkennbar waren, dies war ungefähr nach sechs bis acht passagen.

Bezeichnung der kultivierten Tumorzellen	genetischer Hintergrund
p53-/-	p53-/-, Kras ^{G12V}
p53-129	p53-/-, Kras ^{G12V} , p53-129
p53-172	p53-/-, Kras ^{G12V} , p53-172
p53-246	p53-/-, Kras ^{G12V} , p53-246
p53-Akt2	p53-/-, Kras ^{G12V} , myrAkt2

Tabelle 15 – Liste der im Rahmen der Arbeit kultivierten Tumorzellen. In der rechten Spalte ist der genetische Hintergrund, der zur Tumorinduktion genutzt und nach der Kultivierung der Tumorzellen per PCR bestätigt wurde, dargestellt.

Der genetische Hintergrund der Tumorzellen wurde anschließend per PCR überprüft. Um die genomische DNA zu isolieren, wurde ein Aliquot der Zellen beim Passagieren abgenommen und nach Zentrifugation in DirectPCR® Lysis Reagent Tail mit 1/10 Proteinase K aufgenommen. Die Zelllyse erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach anschließender Inaktivierung bei 85°C für 45 Minuten wurde die Lösung für 90 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert und 1 µl des Überstand für die PCR verwendet. Für die PCR wurden zu dem Überstand 10 µl des Mastermix peqGold PCR Hot Start Mix Y und 1 µl des jeweiligen *forward* und *reverse* Primers (10 pM) (siehe Tabelle 11) mit 7 µl H₂O gegeben. Die PCR erfolgte im T3 Thermocycler, wie in Tabelle 22 schematisch dargestellt.

5.2.2. Zellpassagierung

Das Medium einer subkonfluent-bewachsenen T-75 Zellkulturflasche wurde aspiriert und der Zelllayer anschließend mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin (0,5 %) wurde die Zellkulturflasche im Inkubator bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen inkubiert. Zum Abstoppen des Proteaseverdaus wurde FCS-haltiges Medium hinzugefügt und die gewünschte Zellzahl in ein geeignetes Zellkulturgefäß ausgesät. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblaulösung verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Es wurden die vitalen Zellen gezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zellzahl pro ml berechnet.

5.2.3. Transfektion

Die Einbringung der Plasmid-DNA in die Zellen erfolgte mit Polyethylenimin (PEI) als Transfektionsreagenz. Das kationische Polymer verpackt DNA in Partikel mit positiver Nettoladung, die mit Molekülen auf der Zelloberfläche interagieren und über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden können.

Zur Transfektion wurden $7,5 \times 10^5$ Zellen (p53-Akt2) in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Die DNA-Mischung (siehe Tabelle 16) wurde mit der angegebenen Menge serumfreien DMEM Mediums (SF-Medium) versehen, anschließend mit der entsprechenden Menge Polyethylenimin (PEI) in SF-Medium vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde das Kulturmedium von den zu transfizierenden Zellen abgesaugt, mit 2 ml SF-Medium ersetzt und mit dem DNA/PEI-Mix versehen. Nach vierstündiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz gegen FCS-haltiges Zellkulturmedium ausgetauscht.

DNA Menge pro Ansatz	
1,15 µg	pT-fLuc-L272A
0,25 µg	pT-Puromycin Resistenz
0,1 µg	PGK-SB13
1 µg	pBS (Leervektor)
2,5 µg in 100µl SF-Medium	
+ 2 µl Polyethylenimin (1mg/ml) in 100µl SF-Medium	

Tabelle 16 – Ansatz zur Transfektion der p53-Akt2 Zellen mit Polyethylenimin.

Das Plasmid für Luciferase wurde mit einem Plasmid für Puromycin Resistenz kotransfiziert. Hierbei wurde nur 1/5 Plasmid für Resistenz eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass alle resistenten Zellen auch das Plasmid für Luciferase tragen. Zur Kontrolle wurde der gleiche Ansatz mit einem Plasmid für EGFP (pT-EGFP) durchgeführt. Nach Selektion mit Puromycin-haltigem ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) Zellkulturmedium wurde am Fluoreszenzmikroskop überprüft, dass alle resistenten Zellen auch EGFP exprimierten. Zudem wurde die Luciferase Expression per Luciferase Messung überprüft.

5.2.4. Kristallviolett Assay

Mithilfe des Kristallviolett Assays sollte der Einfluss von dem Chemotherapeutikum Gemcitabine auf die kultivierten Tumorzellen analysiert werden, hierbei wurden zum einen die Proliferation der Zellen und zum anderen der zytotoxische Effekt auf die Zellen untersucht. Für die Untersuchung des zytostatischen Effekts auf die Proliferation wurden 3×10^4 Tumorzellen (p53^{-/-}, p53-129, p53-172, p53-246) in eine 24-well Platte ausgesät und mit Gemcitabine in folgenden Endkonzentrationen $0 \mu\text{M}$, $0,01 \mu\text{M}$, $0,02 \mu\text{M}$, $0,03 \mu\text{M}$, $0,04 \mu\text{M}$ und $0,05 \mu\text{M}$ versetzt. Nach 72 h wurden der Überstand von den Zellen abgesaugt und die Zellen für 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Nach dem Entfernen des PFA wurden die Zellen für 30 Minuten mit Kristallviolett-Lösung gefärbt. Anschließend wurde der

überschüssige Farbstoff vorsichtig mit dest. Wasser von den Zellen gewaschen und die 24-*well* Platte im Trockenschrank bei 50°C für 1 h getrocknet.

Zur Analyse des zytotoxischen Effekts wurden 1×10^5 Tumorzellen (p53-/-, p53-129, p53-172, p53-246) in eine 24-*well* Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium mit Gemcitabine-haltigen Medium ersetzt (eingesetzte Konzentrationen 0 μ M, 0,025 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,25 μ M und 0,5 μ M). Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte, wie zuvor beschrieben, die Kristallviolett-färbung.

5.2.5. Bestimmung der NK Zell Zytotoxizität *in vitro*

Bei diesem Assay sollte ein möglicher zytotoxischer Effekt von NK Zellen auf die kultivierten Tumorzellen untersucht werden. Hierfür wurden die transfizierten, Luciferase exprimierenden Tumorzellen (p53-Akt2-Luc) genutzt. Bei einem zytotoxischen Effekt der NK Zellen kommt es zur Freisetzung der Luciferase in den Zellüberstand, so dass sowohl die Luciferase Aktivität im Überstand als auch im Zelllysat bestimmt werden kann.

5.2.5.1. NK Zell Assay

Für die NK Zellisolation wurde eine Milz aus einer mit Virus (hTert 1×10^8 i.v. in NaCl) vorimmunisierten Maus entnommen, durch ein 40 μ m Nylonsieb gedrückt und mit 10 ml RBC lysis buffer (1x) versetzt. Nachfolgend zur 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurde die Lösung erneut durch ein Nylonsieb gefiltert und bei 300 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die NK Zellen mit dem NK Cell Isolation Kit II mittels Negativselektion aufgereinigt, und am Durchflusszytometer wurde die Reinheit der isolierten Zellen untersucht. Es wurde, wie zuvor beschrieben, die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Gesamtzahl an NK Zellen berechnet. Die Tumorzellen wurden mit Dissoziations-Puffer aus der Zellkulturflasche abgelöst und nach Bestimmung der Zellzahl wurden 2×10^3 Zellen pro *well* in eine 96-*well* Platte ausgesät. Zu den Tumorzellen wurden 0, 1×10^4 , 4×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 NK Zellen entsprechend einem Verhältnis von 1:0, 1:5, 1:20, 1:50, 1:100 gegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde der Überstand abgenommen und die Zellen durch 10-minütige Inkubation in 1x Extraktionspuffer lysiert. Sowohl die Überstände als auch die Lysate wurden für die Luciferasemessung verwendet.

5.2.5.2. Luciferasemessung

Bei der Luciferase-katalysierten Oxidation des Substrats Luciferin wird Licht emittiert, dass bei der Luciferasemessung in Form von *relative light units* (RLU) quantifiziert wird. Für die Messung wurden 300 μ l Luciferase-Messpuffer mit 25 μ L zu messender Lösung (Überstand/ Lysat) versetzt und die Lumineszenz nach Zugabe von 100 μ l Luciferin-Injektionslösung bei einer Messzeit von 10 sec am Luminometer gemessen.

5.3. Mausmodell

Verwendet wurden sechs bis acht Wochen alte Mäuse der Inzuchtstämme p53fl/fl, LSL-Kras^{G12V} x p53fl/fl und C57BL/6, die im zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gezüchtet wurden. Die Mäuse wurden in Polycarbonat-Käfigen des Typs II in Gruppen von bis zu sechs Tieren auf staubfreien Holzgranulat unter folgenden Bedingungen gehalten: Tag/Nacht Verhältnis 14h/10h, Raumtemperatur 22°C (+/-2°C), Luftfeuchtigkeit 55% (+/-5%). Als Futtermittel diente eine pelletierte, sterilisierte Alleindiät der Firma Altromin (Zusammensetzung: Gesamtprotein 19%, Fett 4%, N-freie Extraktstoffe 50,5%), über eine Trinkflasche wurde den Mäusen steriles Wasser zugeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte hinter einer Infektionsbarriere und eine Untersuchung auf Erreger entsprechend der GV-Solas-Liste wurde monatlich durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte nach CO₂-Inhalation durch zervikale Dislokation. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß der Tierversuchsanträge 12/810 und 15/1949.

5.3.1. Mausstämme

p53fl/fl (B6.129P2-Trp53^{TM1Bm}/J): Bei diesem Stamm ist das p53 Gen gefloxt, dieses kann durch die Expression einer Cre Rekombinase deletiert werden.

LSL-Kras^{G12D} x p53fl/fl (B6.129S-Kras^{TM4Tyj} x B6.129P2-Trp53^{TM1Bm}/J): Bei diesem Stamm ist zum einen ein mutiertes Kras unter der Kontrolle einer LoxP-Stop-LoxP (LSL) Kasette eingebracht und zum anderen das p53 Gen gefloxt. Die Expression einer Cre Rekombinase induziert in den Mauszellen die Expression von Kras^{G12V}, dies erfolgt durch Entfernen des Stop-Codons, und gleichzeitig wird die Deletion von p53 induziert.

C57BL6/J: Ein Inzuchtstamm der vom zentralen Tierlabor der MHH bezogen wurde (C57BL/6JHanZtm) und der im Rahmen dieser Arbeit für die Elektroporation von shRNA codierenden Plasmiden verwendet wurde.

5.3.2. *in situ* Elektroporation

Die Maus wurde narkotisiert (Ketamin 100 µg pro kg KGW, Rompun 10 mg pro kg KGW, in isotonischer NaCl Lösung, i.p.) und die Bauchwand wurde entlang der *Linia alba* inzisiert. Nach der Vorlagerung von Pankreas und Milz wurde die DNA mit einer 27-gauge Kanüle in den Pankreasschwanz, unter Bildung einer Blase, injiziert. Anschließend erfolgte die Elektroporation des Injektionsbereichs. Hierfür wurde das Gewebe zwischen den Elektroden der Elektroporationspinzette platziert und mit vier elektrischen Pulsen mit 35 mV, einer Pulsdauer von 35 ms, einer Stromstärke von 100-150 mA und einer Pause von 500 ms zwischen den Pulsen für insgesamt zweimal elektroporiert. Das Gewebe wurde reponiert und der Bauchraum zweimal mit 40 °C warmem dest. Wasser gespült. Anschließend wurde die Wunde verschlossen, indem zuerst das Bauchfell (Nahtmaterial 6/0) und im Anschluss die äußere Haut (Nahtmaterial 4/0) vernäht wurde. Bis zum Aufwachen aus der Narkose verblieb die Maus unter einer Wärmelampe. Für das invasiv wachsende und metastasierende Modell wurde der DNA Ansatz in Tabelle 17 verwendet.

DNA Ansatz für p53fl/fl	
8 µg	pT-myrAkt2
8 µg	pT-Kras ^{G12V}
4 µg	PGK-Cre
4 µg	PGK-SB13
ad 50 µl	TE

Tabelle 17 - DNA Ansatz zur *in situ* Elektroporation für die Induktion eines invasiv wachsenden und metastasierenden PDAC in p53fl/fl Mäusen

Für die Analyse einer tumorspezifischen Immunantwort (3.5.5.) sollte ein Neoantigen-exprimierender Tumor untersucht werden. Hierzu wurde zusätzlich zu den Plasmiden für Kras^{G12V} und myrAkt2 ein Plasmid zur Expression des Epitop-Tags des Neoantigens LAMA4-G1254V verwendet (Tabelle 18).

DNA Ansatz für p53fl/fl	
8 µg	pT-myrAkt2
8 µg	pT-Kras ^{G12V}
8 µg	pT-LAMA4-G1254V
4 µg	PGK-Cre
4 µg	PGK-SB13
ad 50 µl	TE

Tabelle 18 - DNA Ansatz zur *in situ* Elektroporation für die Induktion eines Neoantigen-exprimierenden Pankreastumors in p53fl/fl Mäusen

Für die Elektroporation der Experimente zur Tumoringuktion (siehe 3.1) wurden die in Tabelle 19 A und B gezeigten DNA Ansätze verwendet. Für die Untersuchung des Einfluss der Tumorsuppressorgene mithilfe von shRNAs (3.2) wurde der DNA Mix in Tabelle 19 C verwendet, bei der Kombination von zwei bzw. drei Plasmiden für shRNAs wurden jeweils 8 µg bzw. 6 µg der pT-basierten Plasmide eingesetzt, hierbei wurde die SB13 Transposase mit einem Verhältnis von ¼ zur Gesamt pT-DNA Menge eingesetzt. Tabelle 19 D zeigt den verwendeten DNA Ansatz für die Untersuchungen zum Einfluss der p53-Mutationen auf das Tumorstadium (3.3). Alle DNA Ansätze wurden mit TE auf 50µl zur Injektion in den Pankreas aufgefüllt.

[A] DNA für p53fl/fl ohne Akt2		[B] DNA für LSL-Kras ^{G12V} x p53fl/fl	
8 µg	pT-Kras ^{G12V}	15 µg	PGK-Cre
3 µg	PGK-Cre		
3 µg	PGK-SB13		

[C] DNA für shRNA Versuche in C57BL/6		[D] DNA für Versuche mit mutiertem p53 in p53fl/fl	
8 µg	pT-Kras ^{G12V}	8 µg	pT-Kras ^{G12V}
8 µg	pT-shRNA	8 µg	pT-p53-129/172/246
4 µg	PGK-SB13	4 µg	PGK-Cre
		4 µg	PGK-SB13

Tabelle 19 – DNA Ansätze die zur *in situ* Elektroporation des Pankreas verwendet wurden. Die Ansätze **A** und **B** wurden für die ersten Untersuchungen zur Tumorerzeugung per Elektroporation verwendet (siehe 3.1). **C** wurde für die Experimente zum Einfluss der Tumorsuppressorgene mithilfe von shRNAs genutzt (3.2). Der Ansatz in **D** diente zur Analyse des Einflusses der p53-Mutationen auf das Tumorstadium (siehe 3.3). Alle DNA Ansätze wurden mit TE auf 50µl zur Injektion und anschließenden Elektroporation des Pankreas aufgefüllt.

5.3.2.1. RNAi mit shRNA

Neben der direkten Gendeletion wurden *short hairpin* RNAs (shRNAs) die dazu führen, dass das Gen Transkript, die mRNA, abgebaut wird, genutzt um indirekt in die Genfunktionen einzugreifen. Hierbei wird durch die RNA Interferenz (RNAi), die mRNA sequenz-spezifisch degradiert. (Fire et al., 1998). An dieser enzymatischen Degradation ist der RISC (*rna inducing silencing complex*) beteiligt. Der Komplex lokalisiert nach Bindung einer *short interfering* RNA (siRNA) den zu der siRNA komplementären mRNA Strang und induziert so den Abbau der mRNA (Elbashir et al., 2001). Die folgende Degradation erfolgt durch endogene Nukleasen. Es gibt verschiedene Methoden um mit der RNAi gezielt die mRNA zu degradieren. Eine beinhaltet die direkte Transfektion mit synthetisierten siRNA Oligonukleotiden ins Cytosol der Zellen. Dies ist allerdings nur möglich bei Zellen die zugänglich für eine Transfektion sind und ist nur transient. Außerdem können shRNAs unter Verwendung von Vektoren in den Zellen synthetisiert werden. Dies hat den Vorteil, dass eine stabile Integration der shRNA codierenden Elemente in das Zellgenom möglich ist und so im Gegensatz zu den siRNAs ein stabiler Gen *knockdown* induziert werden kann. shRNAs bestehen aus zwei komplementären, 19-22 Basenpaar langen, RNA Sequenzen, die über einen 4-11 Nukleotid langen *hairpin* verbunden sind. Nach der Transkription wird die shRNA in das Zytosol exportiert und dort enzymatisch durch den Dicer zu siRNA geschnitten. Diese endogen erzeugten siRNA binden komplementär die Ziel-mRNA und induzieren die RISC vermittelte Degradation (Kutter and Svoboda, 2008). Die stabile Expression von shRNAs kann in transgenen Mäusen einen effektiven Gen *knockdown* erzeugen (Carmell et al., 2003; Rubinson et al., 2003; Seibler et al., 2005) und stellt so ein effektives Mittel dar, um die Rolle bestimmter Gene z.B. bei der Tumorentstehung zu untersuchen. Die shRNAs wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet um die Tumorsuppressorgene SMAD4, BRCA1, p16/p19 und p53 in den Zellen des Pankreas herunter zu regulieren.

5.3.3. Resektion des Pankreastumors

Für die Tumorsektion wurde die Maus, wie in 5.3.2. beschrieben, narkotisiert und im Anschluss der Bauchraum linksseitig der Maus eröffnet. Der Pankreastumor wurde mitsamt der Milz vorgelagert und zuerst das versorgende Blutgefäß der Milz mit einem Ligatur-Clip abgeklemmt. Dieses wurde bei 12W mit einer bipolaren 0,4 mm Koagulationspinzette mithilfe von Elektrokauterisation koaguliert und mit einer Schere durchtrennt. Mit einem weiteren Ligatur-Clip wurde die Blutversorgung des Pankreas abgeklemmt, hierbei wurde auf ausreichend Abstand zum Tumor geachtet um eine komplette Tumorsektion (R0) zu gewährleisten. Anschließend wurde das Gewebe koaguliert und durchtrennt. Nach Isolation des Pankreastumors und der Milz wurde das restliche Pankreasgewebe auf Tumorfreiheit untersucht. Im Anschluss wurde der Bauchraum mit 40°C warmem dest. Wasser gespült und die Wunde verschlossen. Hierzu wurden zuerst das Bauchfell (Nahtmaterial 6/0) und anschließend die äußere Haut mit einer zweiten Naht (Nahtmaterial 4/0) geschlossen. Bis zum Aufwachen aus der Narkose wurde die Maus unter einer Wärmelampe warm gehalten.

5.3.4. Therapie

Gemcitabine wurde mit einer Konzentration von 100 µg pro g Maus in isotonischer NaCl Lösung appliziert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal (i.p.) zu den in den Versuchen angegebenen Zeitpunkten. Neoadjuvant wurde dreimal mit einem Abstand von drei Tagen und adjuvant einmal wöchentlich therapiert.

Die Konzentration des blockierenden αPD1 (Klon: RMP1-14, Bio X Cell) Antikörpers betrug 150 µg pro Maus in isotonischer NaCl Lösung und die i.p. Gabe erfolgte zu den, in den Versuchsschemata beschriebenen Zeitpunkten. Für die neoadjuvante Therapie wurde dreimal mit einem Abstand von drei Tagen und für die adjuvante Therapie zweimal wöchentlich der Antikörper verabreicht.

Der blockierende Antikörper gegen CTLA4 (Klon: 9H10, Biolegend) wurde mit 75 µg pro Maus in isotonischer NaCl Lösung i.p. neoadjuvant dreimal mit einem Abstand von drei Tagen appliziert.

Die zwei Varianten des Antikörpers gegen CD96 (Klon: 6A6 und 8B10; freundlicher Weise von Günter Bernhard zur Verfügung gestellt, Medizinische Hochschule Hannover) wurden mit 400 µg pro Maus eingesetzt und ebenfalls i.p. verabreicht. Die Applikation erfolgte zweimal wöchentlich mit einem Abstand von drei Tagen und wurde insgesamt sechsmal, wie in den schematischen Abbildungen der Behandlung (Abbildung 42 A, Abbildung 43 A) dargestellt, verabreicht.

5.3.5. Depletion

Die Depletion der CD8 T Zellen erfolgte durch die i.p. Applikation eines depletierenden Antikörpers (Klon: 53-6.7, Bio X Cell) mit einer Konzentration von 75 µg pro Maus. Die NK Zelldepletion wurde durch die Gabe von 25 µg pro Maus (Klon: PK136, Bio X Cell) erreicht, diese Dosis führt zur selektiven Depletion der NK Zellen ohne Beeinträchtigung der NKT Zellen. Für die Depletion der CD4 T Zellen wurde der depletierende Antikörper mit einer Konzentration von 75 µg pro Maus i.p. appliziert (Klon: GK1.5, Bio X Cell). Für die neoadjuvante Depletion wurde der Antikörper dreimal

mit einem Abstand von drei Tagen verabreicht (siehe Abbildung 32). Für die adjuvante Depletion wurde der Antikörper zweimal wöchentlich über drei Wochen appliziert (siehe Abbildung 33). Als Kontrolle wurde ein Antikörper des korrespondierenden Isotyps (Klon: MOPC-173, Biolegend) zu den gleichen Zeitpunkten verabreicht.

5.3.6. Blutentnahme aus der Vena facialis

Zur Analyse des Blutes während der Therapie (siehe 3.5.11.) wurden pro Maus vier Tropfen Blut entnommen. Hierzu wurde mit einer 24G Kanüle die Vena facialis punktiert, das Blut in einem EDTA KE/1.3 Probengefäß aufgefangen und die Einstichstelle komprimiert. Anschließend wurde das Blut wie in 5.4.1 beschrieben aufgearbeitet und wie in 5.4.2. dargestellt für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt.

5.3.7. Abbruchkriterien

Die Mäuse wurden während der Versuche regelmäßig auf ihr Allgemeinbefinden und per Palpation auf Tumorwachstum in Form von Primärtumor, Rezidiv und Metastasen untersucht. Das Überleben wurde anhand eines vorher festgelegten Scores definiert, dieser setzte sich aus der Tumorgroße und dem Allgemeinzustand der Mäuse zusammen. Bei einer Verschlechterung des Allgemeinzustands, festgemacht anhand eines Body-Condition-scores, verringerter Agilität, Veränderungen des Fellzustands und des Habitus oder insbesondere bei einem palpatorisch positiven Tumorbefund mit einem Tumordurchmesser > 1 cm wurden die Mäuse mittels Genickbruch getötet. Je nach Fragestellung des Versuchs wurden Tumor, Organe (Leber, Lunge, Pankreas, Milz) und/ oder Blut isoliert und histologisch oder durchflusszytometrisch analysiert.

5.3.8. Histologische Untersuchungen

Das entnommene Gewebe wurde nach der Isolation für 24 Stunden in 4% PFA bei 4°C inkubiert. Nach dem Einbetten der Gewebeproben in Paraffin, wurden aus den Paraffinblöcken mithilfe eines Mikrotoms 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einem Wasserbad gestreckt und auf einen Objektträger aufgezogen. Für die Färbung wurde der Schnitt entparaffiniert. Hierzu wurde der Objektträger in Xylol, in Ethanol und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 70%, 50%) für jeweils 5 Minuten inkubiert.

Für die Hämalaun-Eosin Färbung (H&E Färbung) wurde der Schnitt nach dem Entparaffinieren für ca. 25 s in Hämalaun gefärbt, anschließend 5 Minuten in lauwarmem Wasser gebläut und mit dest. Wasser gespült. Hämalaun bewirkt eine blau-violette Färbung der Zellkerne. Für die nachfolgende Färbung des Zytoplasmas mit Eosin wurde der Schnitt für 2 Minuten in essigsauerm Eosin inkubiert. Nach dem Spülen mit Wasser wurde der Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (40%, 70%, 90%, 100%) und in Xylol für jeweils 5 Minuten entwässert. Im Anschluss wurde der Schnitt mit Entellan® und einem Deckglas eingebettet.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und falls notwendig (Tabelle 20) in einer Pufferlösung (pH 6 oder pH 9) bei 96°C für 20 Minuten, zur Antigen Rückgewinnung, gekocht. Bei Bedarf wurden durch 10-minütige Inkubation in 3%iger H₂O₂ Lösung, die in dem Gewebe vorhandenen Peroxidasen geblockt. Zudem wurden, falls erforderlich, die endogenen IgGs blockiert, dies erfolgte durch Inkubation mit unkonjugiertem F(ab) Fragment α -Maus IgG (H+L) mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-Tween (PBST) wurde der Schnitt über Nacht bei 4°C mit dem primär-Antikörper inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte in Antibody diluent. Am folgenden Tag wurde zweimal mit PBST gewaschen und anschließend mit einem geeigneten Biotin-gekoppelten sekundär-Antikörper (1:500 in Antibody diluent) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut mit PBST gewaschen und die Schnitte 30 Minuten mit Streptavidin-HRP inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBST wurde mit dem Substrat DAB (3,3'-Diaminobenzidin) entwickelt und im Anschluss die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Faramount Mounting Medium und einem Deckglas eingebettet. Die gefärbten Gewebsschnitte wurden anschließend am Mikroskop betrachtet und ausgewertet.

Antikörper	Antigen Rückgewinnung	Verdünnung	Besonderheiten
Anti- α SMA	-	1/200	-
Anti-E-Cadherin	pH 6	1/200	F(ab) Block
Anti-CK19	pH 9	1/200	Peroxidase Block
Anti-p-ERK-1/2	-	1/200	-
Anti-p-Akt2	pH 9	1/100	Peroxidase Block
Anti-PD-L1	pH 6 oder pH 9	1/200	-

Tabelle 20 – Verdünnung, Antigen Rückgewinnung und Besonderheiten der zur immunhistochemischen Färbung verwendeten Antikörper.

5.4. Durchflusszytometrische Analysen

Durchflusszytometrie, allgemein unter dem Begriff FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) bekannt, dient sowohl der Analyse von Zelleigenschaften wie Größe und Granularität als auch der Analyse von Oberflächenmarkern, die mithilfe von Antikörpern detektiert werden können. Es sollten gezielt Immunzellpopulationen, wie T und NK Zellen, anhand ihrer Oberflächenmarker im Blut und im Gewebe bestimmt und untersucht werden.

5.4.1. Isolation von Zellen aus Gewebe und Blut

Für die Untersuchung der Immunzellpopulationen wurden, je nach Fragestellung, der Primärtumor oder der Resektionsrand und zum Teil die Milz oder das Blut der Mäuse isoliert und zu einer Einzelzellsuspension für die Analyse am Durchflusszytometer aufgearbeitet.

Hierzu wurde der Tumor bzw. der Resektionsrand für 30 Minuten bei 37°C in Tumorverdaumedium (ohne Dispase) inkubiert, anschließend durch ein 40 μ m Nylonsieb gefiltert und für 10 Minuten bei

300 x g (Heraeus Multifuge X1R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI aufgenommen. Die Lösung wurde erneut durch ein Nylonsieb filtriert und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI oder 2% DCCM-RPMI aufgenommen und in FACS-Röhrchen für eine Antikörperfärbung überführt bzw. für die *in vitro* Peptidstimulation verwendet.

Das gewonnene Blut wurde mit 10 ml RBC lysis buffer (1x) versetzt und nach 5-minütiger Inkubation auf Eis bei 300 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in RPMI aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

Für die Färbung der Milzzellen wurde die Milz isoliert, durch ein 40 µm Nylonsieb gedrückt und mit 10 ml RBC lysis buffer (1x) versetzt. Nachfolgend zur 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurde die Lösung erneut durch ein Nylonsieb gefiltert und bei 300 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI oder in 2% DCCM-RPMI aufgenommen, erneut durch ein Sieb gefiltert und in FACS-Röhrchen zur Antikörperfärbung überführt bzw. zur *in vitro* Peptidstimulation genutzt.

5.4.2. Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern

Für die Färbung von extrazellulären Oberflächenmolekülen wurden die Röhrchen bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 100 µl RPMI resuspendiert, mit 1 µl Fc-Block versetzt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml RPMI und Zentrifugation bei 300 x g für 10 Minuten wurden die Zellen mit 100 µl RPMI und den geeigneten fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (Verdünnung 1:100) versetzt und für 30 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Es wurde mit 1 ml RPMI gewaschen und die Zellen für die Analyse am Durchflusszytometer in 350 µl RPMI aufgenommen.

Für die Färbung von intrazellulärem IFN γ wurden zuerst, wie zuvor beschrieben, die extrazellulären Oberflächenmoleküle angefärbt, anschließend wurden die Zellen mit dem BD Cytotfix/Cytoperm Kit nach Herstellerprotokoll permeabilisiert und intrazellulär mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen IFN γ (Verdünnung 1:100) für eine Stunde bei 4°C lichtgeschützt gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit Perm/Wash Puffer wurden die Zellen in 350 µl Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

Für die Kompensation der Fluoreszenzfarbstoffe am Durchflusszytometer wurden selektiv gefärbte Milzzellen verwendet. Hierzu wurde, wie in 5.5.1. beschrieben, eine Einzelzellsuspension aus einer Milz gewonnen. Die Zellen wurden jeweils einzeln mit den Farbstoffen APC, PerCP, PE und FITC an CD4 oder CD8 Antikörper gekoppelt wie zuvor beschrieben gefärbt, während eine Probe ungefärbt blieb. Mithilfe der einzeln gefärbten Proben wurde am BD FACS CantoTM II eine Kompensation durchgeführt.

5.4.3. Gating Strategie

Bei der Analyse der Zellen wurde, wie beispielhaft in Abbildung 44 dargestellt, zuerst in der Auftragung von FSC (*forward scatter*) gegen SSC (*side scatter*) auf die lebenden Zellen und im SSC-W (*width*) gegen SSC-A (*area*) auf die Einzelzellen gated. Anschließend wurden durch Antikörperfärbung von CD45.2 bzw. CD90.2 auf die gesamte Leukozyten- bzw. die Lymphozytenpopulation gated. Im Anschluss wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern untersucht.

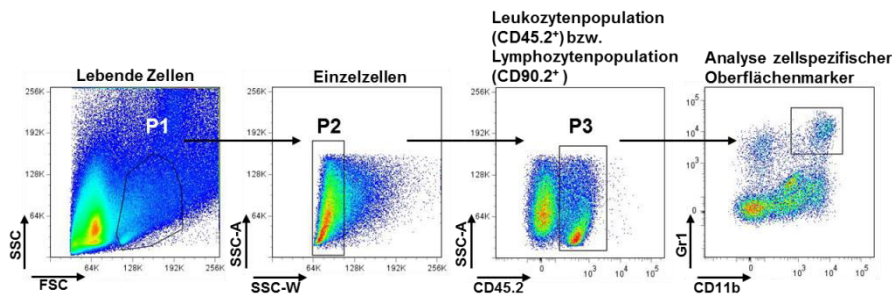


Abbildung 44 – Beispielhafte Darstellung der angewandten Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Analyse der Immunzellpopulationen. Im *forward vs. sideward scatter* (FSC vs. SSC) wurde auf die lebenden Zellen gated (P1), anschließend wurden in der Auftragung von SSC-W (*width*) gegen SSC-A (*area*) die Einzelzellen ausgewählt (P2). Durch Färbung mit Antikörpern gegen CD45.2 bzw. CD90.2 konnte die Leukozyten bzw. die Lymphozytenpopulation bestimmt werden (P3). Anschließend wurden die Immunzellen auf die Expression von zellspezifischen Oberflächenmarkern untersucht.

5.4.4. *in vitro* Stimulation mit Peptid

Für die *in vitro* Stimulation wurde das Tumorgewebe und die Milz, wie in 5.4.2 beschrieben, isoliert und unter sterilen Bedingungen zur Einzelzellsuspension aufbereitet. Die Suspension der Milzzellen wurde mit 2% DCCM-RPMI Medium auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt und es wurden 3×10^6 Zellen pro *well* in eine 24-*well* Platte ausgesät. Die Tumorzellsuspension wurde in 6 ml 2% DCCM-RPMI Medium aufgenommen und je 2 ml pro *well* in eine 24-*well* Platte überführt. Pro Probe wurden drei *wells* jeweils ein *well* für die Positivkontrolle (unspezifische Stimulation mit PMA/Ionomycin), die Negativkontrolle (irrelevantes Peptid - Spectrin β) und für das spezifische Peptid (LAMA4(G1254V)) ausgesät. Zu den *wells* wurde zum einen Brefeldin A (Endkonzentration 1x) gegeben, dieses verhindert eine Ausschüttung der durch die Stimulation induzierten Zytokine. Zum anderen wurden die Peptide mit einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ bzw. das PMA/Ionomycin als positiv Kontrolle mit einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ PMA und 2 $\mu\text{g/ml}$ Ionomycin zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Pipettieren aus den *wells* abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden, wie in 5.5.2 beschrieben, zuerst extrazellulär mit Antikörpern gegen CD90.2 und CD8 und anschließend intrazellulär für IFN γ gefärbt.

5.4.5. Propidiumiodid Zellzyklusfacs

Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und in ein 50 ml Röhrchen auf Eis überführt. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Ethanol fixiert, hierzu wurde eiskalter 96% Ethanol zu der Zellsuspension hinzugegeben, so dass eine 75% Ethanol-haltige Lösung entstand. Nach Zentrifugation bei 300 x g für

8 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in FACS-Waschpuffer gewaschen. 1×10^6 Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und nach erneuter Zentrifugation in 200 μ l Propidiumiodid-haltiger Kernfärbelösung resuspendiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l RNase-Lösung zugesetzt und erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 400 μ l 10 mM Tris (pH 7,5) mit 10 mM NaCl versetzt und am Durchflusszytometer analysiert. Diese Färbung ermöglicht die Analyse des Zellzyklus, da der DNA Interkalator Propidiumiodid proportional zur DNA Menge in der Zelle bindet. Dabei ist der DNA-Gehalt in den Zellen abhängig von der Zellzyklusphase in der sich die Zelle befindet.

5.5. Molekularbiologische Methoden

5.5.1. Rekombinante DNA Techniken

5.5.1.1. Polymerasekettenreaktion

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das Q5[®] *Hot Start High-Fidelity* DNA Polymerase Kit genutzt und folgender Ansatz verwendet:

Volumen pro Reaktion

1 μ l	Template (1 ng)
10 μ l	5x PCR-Puffer
1 μ l	Forward Primer (10 pM)
1 μ l	Reverse Primer (10 pM)
3 μ l	dNTP (50 μ M)
1 μ l	Q5 Taq (2 U/ μ l)
33 μ l	H ₂ O
50 μ l	

Tabelle 21 – Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion mit der Q5[®] *Hot Start High-Fidelity* DNA Polymerase

Im T3 Thermocycler erfolgte im ersten Schritt eine Denaturierung bei 98°C. Die darauffolgenden 30 Zyklen beinhalteten eine Denaturierung, das *Annealing* der Primer und die Elongation (Tabelle 22). Die *Annealing*-Temperatur wurde so gewählt, dass sie 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer lag.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)
1	98	90
2	98	20
3	Schmelztemperatur-2°C	30
4	72	Amplicon Kb/50
5	72	180
6	10	Pause

Tabelle 22 – Exemplarische Darstellung der Schritte der Polymerasekettenreaktion

5.5.1.2. Restriktionsverdau

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA erfolgte mit den Restriktionsenzymen und Puffern der Firma NEB nach Herstellerangaben. Hierbei wurde unter Berücksichtigung der Regel, dass 1 U (*Unit*) des Enzyms 1 µg DNA in 1 h schneidet, ein 3- bis 4-facher Überschuss des Enzyms eingesetzt und bei 37°C inkubiert.

5.5.1.3. Gelextraktion

Im Anschluss an den Restriktionsverdau bzw. der PCR wurde ein 1%-iges Agarosegel zur Aufreinigung des linearisierten Plasmids bzw. des PCR-Produkts vorbereitet. Hierzu wurden 1% Agarose in TAE durch Aufkochen gelöst und Ethidiumbromid (1:20000) zugefügt. Das Gel wurde in eine vorbereitete Gelkammer gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Der Ansatz der geschnittenen Plasmid-DNA wurde mit einem Ladepuffer versetzt und zusammen mit einer geeigneten DNA Leiter (1kb⁺ *Gene Ruler*) auf das Gel aufgetragen und bei 10 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurde das Gelstück mit dem gewünschten DNA Fragment ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

5.5.1.4. Dephosphorylierung

Die linearisierten DNA-Vektoren wurden nach der Gelextraktion dephosphoryliert, um eine mögliche Religation zu verhindern. Hierzu wurde nach Herstellerangaben pro 1 µg linearisierten Vektors 1 U *Antartic phosphatase* eingesetzt und im mitgelieferten Puffer für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 2 Minuten bei 80°C zur Deaktivierung.

5.5.1.5. Klenow-*fill-in*

Ein Teil der DNA Fragmente wurde nach der Gelextraktion mit dem Klenow Fragment der DNA Polymerase behandelt, um 5'-Überhänge aufzufüllen bzw. 3'-Überhänge abzdauen und somit *blunt ends* zu erzeugen. Pro µg linearisierter DNA wurde 1U DNA Polymerase I, *Large (Klenow) Fragment* eingesetzt und im mitgelieferten Reaktionspuffer mit 50 µM dNTPs wurde für 20 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 75°C deaktiviert.

5.5.1.6. Aufreinigung der DNA

Nach der Dephosphorylierung bzw. dem Klenow-*fill-in* erfolgte eine Aufreinigung mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. Anschließend wurde 1 µl der aufgereinigten DNA in einem 1 %-igen Agarosegel auf Qualität und Quantität überprüft.

5.5.1.7. Ligation

Nach der Isolation und Aufreinigung von Insert und Vektor erfolgte die Ligation. In folgender Tabelle sind die einzelnen Ligationen dargestellt.

Vektor	Insert
pT-EF1 α (<i>NheI</i>)	shSMAD4[S91] über PCR (<i>Nhe fw+Xba/Spe rev</i>) generiert danach Restriktionsverdau (<i>NheI/XbaI</i>)
pT-EF1 α (<i>NheI</i>)	shSMAD4[S95] über PCR (<i>Nhe fw+Xba/Spe rev</i>) generiert danach Restriktionsverdau (<i>NheI/XbaI</i>)
pT-EF1 α (<i>NheI</i>)	shSMAD4[1599] über PCR (<i>Nhe fw+Xba/Spe rev</i>) generiert danach Restriktionsverdau (<i>NheI/XbaI</i>)
pT-EF1 α -sh-SMAD4[S91] (<i>SpeI</i>)	shSMAD4[S95] (<i>NheI/ SpeI</i>) aus pT-shSMAD4[S95]
pT-EF1 α -sh-SMAD4[S91]-[S95] (<i>SpeI</i>)	shSMAD4[1599] (<i>NheI/ SpeI</i>) aus pT-shSMAD4[1599]
pT-EF1 α (<i>NheI</i>)	shBRCA1#1 über PCR (BRCA1#1[fw/rev]+ <i>Nhe fw+Xba/Spe rev</i>) generiert danach Restriktionsverdau (<i>NheI/XbaI</i>)
pT-EF1 α (<i>NheI</i>)	shBRCA1#2 über PCR (BRCA1#2[fw/rev]+ <i>Nhe fw+Xba/Spe rev</i>) generiert danach Restriktionsverdau (<i>NheI/XbaI</i>)
pT-EF1 α -shBRCA1-#1 (<i>SpeI</i>)	shBRCA1#2 (<i>NheI/ SpeI</i>) aus pT-shBRCA1#2
pT-EF1 α -(MHCII ^{OVA-Tag}) ₂ (<i>NheI</i>)	LAMA4-G1254V (<i>NheI/ SpeI</i>) aus pT-LAMA4-G1254V
pT-EF1 α (<i>SpeI/XhoI</i>)	fLuc-L272A (<i>SpeI/XhoI</i>) aus pBS-fLuc-L272A

Tabelle 23 – Darstellung der Vektor/Insert Paare die nach Isolation und Aufreinigung ligiert wurden. Kursiv in den Klammern sind die verwendeten Restriktionsendonukleasen zur Linearisierung der Vektoren bzw. zum Verdau der Inserts gezeigt.

Für die Ligation wurde die T4 DNA Ligase in T4 DNA Ligase Puffer mit 50 μ M ATP verwendet. Der Reaktionsansatz von 20 μ l wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Hierbei wurde die eingesetzte DNA Menge mithilfe des 1%-igen Agarosegels (siehe 5.5.1.7.) abgeschätzt und das Insert in einem Überschuss von 1:20 im Verhältnis zum Vektor eingesetzt.

5.5.2. chemische Transformation

Für die chemische Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes *JM 109* genutzt. 100 μ l der Bakteriensuspension wurden mit 10 μ l des Ligationsansatzes vermischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt, hierzu wurde die Suspension 30 Sekunden lang bei einer Temperatur von 42°C inkubiert und im Anschluss kurz auf Eis gelagert. Der Transformationsansatz wurde mit 900 μ l SOC-Medium versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde der Ansatz 90 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 μ l SOC-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer Selektionsmedienplatte (Ampicillin) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

5.5.3. analytische Plasmidpräparation

Am Tag nach der Transformation wurden 2 ml LB-Medium + Ampicillin (100 μ g/ml) mit den Klonen, die auf den Selektionsmedienplatten gewachsen waren, angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurden 1,5 ml der

Bakterienlösung für 90 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl Stet-Puffer mit 10 µl Lysozym zur Bakteriensuspension. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender 90 Sekunden Inkubation bei 95°C wurde für 10 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet entfernt. Zu der Lösung wurden 400 µl Isopropanol gegeben und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 70 %igen Ethanol gewaschen. Der Ethanol wurde abgesaugt und das DNA Pellet wurde in 30 µl TE gelöst. Im Anschluss an die Isolation wurden die Plasmide auf eine positive Insertion und eine richtige Orientierung des Inserts untersucht. Dafür wurde das Plasmid mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Fragmentgrößen in einem 1 %igen Agarosegel analysiert.

5.5.4. präparative Plasmidpräparation

Zur Amplifikation großer DNA Mengen wurden nach dem Kontrollverdau 250 ml LB-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) mit 100-200 µl der Bakterienkultur eines positiven Klons angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Isolation der Plasmid DNA erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit oder mit dem Zymo PureTM Plasmid Maxi Prep Kit nach dem Herstellerprotokoll.

5.5.5. DNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA Konzentration wurde nach der Isolation mit dem *BioTek* Photometer bestimmt. Für die Absorptionsmessung wurde die Probe 1:200 mit Endotoxin-freiem TE verdünnt eingesetzt. Zusätzlich zu der Konzentration wurde der A_{260}/A_{280} -Quotient berechnet, der einen Anhaltspunkt für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen liefert. Der Quotient beträgt bei reinen DNA-Proben 2,0. Die DNA-Konzentration wurde mit TE auf 1 µg/µl eingestellt.

5.5.6. Sequenzierung

Die isolierte DNA wurde mit geeigneten Primern (Tabelle 11) zur Sequenzierung eingesendet (Fa. *GATC Biotech*).

5.6. Software für Datenverarbeitung

Es wurde folgende Analyse-Software genutzt: *Leica QWin*, *Graphpad Prism 5*, *Gen 5TM BioTek*, *FlowJo* und *BD FACSDivaTM*

5.7. Statistische Auswertung

Die Balkendiagramme der analysierten Gruppen zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde für Überlebenskurven der log rank (Mantel-Cox) Test

verwendet. Die Analyse der statistischen Signifikanz bei der Metastasierungs- und Rezidivierungsfrequenz erfolgte mit dem *Fisher's exact test, two tailed*. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der *unpaired student's t-test, two tailed*, zur Bestimmung von Signifikanzen verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

6. Literaturverzeichnis

Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumüller, H., Lüking, C., Mysliwicz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D.H., Röcken, M., and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood* *106*, 338–344.

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* *8*, 765–772.

Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and Depinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *17*, 3112–3126.

Aguirre, A.J., Brennan, C., Bailey, G., Sinha, R., Feng, B., Leo, C., Zhang, Y., Zhang, J., Gans, J.D., Bardeesy, N., et al. (2004). High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 9067–9072.

Alegre, M.L., Noel, P.J., Eisfelder, B.J., Chuang, E., Clark, M.R., Reiner, S.L., and Thompson, C.B. (1996). Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J. Immunol.* *157*.

Ali, H.R., Provenzano, E., Dawson, S.-J., Blows, F.M., Liu, B., Shah, M., Earl, H.M., Poole, C.J., Hiller, L., Dunn, J.A., et al. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann. Oncol.* *25*, 1536–1543.

Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* *53*, 549–554.

Andersen, B.L., Farrar, W.B., Golden-Kreutz, D., Kutz, L.A., MacCallum, R., Courtney, M.E., and Glaser, R. (1998). Stress and immune responses after surgical treatment for regional breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 30–36.

Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarli, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.-C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., et al. (2005). CD8+ T Cell Immunity Against a Tumor/Self-Antigen Is Augmented by CD4+ T Helper Cells and Hindered by Naturally Occurring T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *174*, 2591–2601.

Aparicio-Pagés, M.N., Verspaget, H.W., Peña, A.S., and Lamers, C.B. (1991). Natural killer cell activity in patients with adenocarcinoma in the upper gastrointestinal tract. *J. Clin. Lab. Immunol.* *35*, 27–32.

Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbınar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. (2003). Overexpression of AKT2/Protein Kinase B β Leads to Up-Regulation of β 1 Integrins, Increased Invasion, and Metastasis of Human Breast and Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* *63*.

Arlaukas, S.P., Garris, C.S., Kohler, R.H., Kitaoka, M., Cuccarese, M.F., Yang, K.S., Miller, M.A., Carlson, J.C., Freeman, G.J., Anthony, R.M., et al. (2017). In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci. Transl. Med.* *9*.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* *439*, 682–687.

Bardeesy, N., Aguirre, A.J., Chu, G.C., Cheng, K.H., Lopez, L. V., Hezel, A.F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., et al. (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5947–5952.

Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L.D., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L.A.A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R.H., et al. (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 1730–1741.

- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.
- Beatty, G.L., Chiorean, E.G., Fishman, M.P., Saboury, B., Teitelbaum, U.R., Sun, W., Huhn, R.D., Song, W., Li, D., Sharp, L.L., et al. (2011). CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans. *Science* (80-.). 331, 1612–1616.
- Bellacosa, A., Kumar, C.C., Cristofano, A. Di, and Testa, J.R. (2005). Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting. In *Advances in Cancer Research*, pp. 29–86.
- Bellone, G., Turletti, A., Artusio, E., Mareschi, K., Carbone, A., Tibaudi, D., Robecchi, A., Emanuelli, G., and Rodeck, U. (1999). Tumor-Associated Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Contribute to a Systemic Th2 Immune Phenotype in Pancreatic Carcinoma Patients. *Am. J. Pathol.* 155, 537–547.
- Benson, D.M., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., et al. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286–2294.
- von Bernstorff, W., Voss, M., Freichel, S., Schmid, A., Vogel, I., Jöhnk, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B., and Kalthoff, H. (2001). Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 7, 925s–932s.
- Bertholet, S., Iggo, R., and Corradin, G. (1997). Cytotoxic T lymphocyte responses to wild-type and mutant mouse p53 peptides. *Eur. J. Immunol.* 27, 798–801.
- Biron, C.A. (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 24–34.
- Biron, C. a, Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189–220.
- Blackford, A., Parmigiani, G., Kensler, T.W., Wolfgang, C., Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Eshleman, J.R., et al. (2009). Genetic Mutations Associated with Cigarette Smoking in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 69, 3681–3688.
- Blake, S.J., Stannard, K., Liu, J., Allen, S., Yong, M.C.R., Mittal, D., Aguilera, A.R., Miles, J.J., Lutzky, V.P., de Andrade, L.F., et al. (2016). Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov.* 6, 446–459.
- Blandino, G., Levine, A.J., and Oren, M. (1999). Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 18, 477–485.
- Blasco, R.B., Francoz, S., Santamaría, D., Cañamero, M., Dubus, P., Charron, J., Baccarini, M., and Barbacid, M. (2011). C-Raf, but Not B-Raf, Is Essential for Development of K-Ras Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer Cell* 19, 652–663.
- Boise, L.H., Yinn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson '-, C.B. (1995). CD28 Costimulation Can Promote T Cell Survival by Enhancing the Expression of Bcl-xL. *Immunity* 3, 87–98.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 373, 1627–1639.
- Boutros, C., Tarhini, A., Routier, E., Lambotte, O., Ladurie, F.L., Carbonnel, F., Izzeddine, H., Marabelle, A., Champiat, S., Berdelou, A., et al. (2016). Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 473–486.
- Branda, C.S., and Dymecki, S.M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev. Cell* 6, 7–28.

Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., et al. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* *494*, 361–365.

Breast Cancer Linkage Consortium (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* *91*, 1310–1316.

Brinkhoff, B., Ostroumov, D., Heemcke, J., Woller, N., Gürlevik, E., Manns, M.P., Longerich, T., Zender, L., Harty, J.T., Kubicka, S., et al. (2014). Microsphere priming facilitates induction of potent therapeutic T-cell immune responses against autochthonous liver cancers. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1213–1224.

Brodbeck, T., Nehmann, N., Bethge, A., Wedemann, G., and Schumacher, U. (2014). Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model. *Mol. Cancer* *13*, 244.

Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D.M., and Zanovello, P. (2003). L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.* *24*, 301–305.

Brooks, J., Fleischmann-Mundt, B., Woller, N., Niemann, J., Ribback, S., Peters, K., Demir, I.E., Armbrecht, N., Ceyhan, G.O., Manns, M.P., et al. (2018). Perioperative, Spatiotemporally Coordinated Activation of T and NK Cells Prevents Recurrence of Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* *78*, 475–488.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Barber, D.F., Ljunggren, H.-G., and Long, E.O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* *202*, 1001–1012.

Buchbinder, E.I., and Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am. J. Clin. Oncol.* *39*, 98–106.

Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., et al. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* *15*, 2403–2413.

Carlson, C.M., Frandsen, J.L., Kirchhof, N., McIvor, R.S., and Largaespada, D.A. (2005). Somatic integration of an oncogene-harboring Sleeping Beauty transposon models liver tumor development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 17059–17064.

Carmell, M. a, Zhang, L., Conklin, D.S., Hannon, G.J., and Rosenquist, T. a (2003). Germline transmission of RNAi in mice. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 91–92.

Carreno, B.M., Bennett, F., Chau, T.A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., Baroja, M.L., and Madrenas, J. (2000). CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* *165*, 1352–1356.

Castellano, E., and Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* *2*, 261–274.

Chambers, C.A., Kuhns, M.S., Egen, J.G., and Allison, J.P. (2001). CTLA-4-MEDIATED INHIBITION IN REGULATION OF T CELL RESPONSES: Mechanisms and Manipulation in Tumor Immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol* *19*, 565–594.

Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., and Smyth, M.J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.* *15*, 431–438.

Chang, F.L., and Lai, M.D. (2001). Various forms of mutant p53 confer sensitivity to cisplatin and doxorubicin in bladder cancer cells. *J. Urol.* *166*, 304–310.

Chang, C.-H., Qiu, J., O’Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J.W., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver

of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241.

Chang, L.-S., Yan, W.-L., Chang, Y.-W., Yeh, Y.-C., Chen, H.-W., Leng, C.-H., and Liu, S.-J. (2016). Gemcitabine enhances antitumor efficacy of recombinant lipopeptide-based immunotherapy. *Oncoimmunology* 5, e1095433.

Ciernik, I.F., Berzofsky, J.A., and Carbone, D.P. (1996). Human lung cancer cells endogenously expressing mutant p53 process and present the mutant epitope and are lysed by mutant-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2, 877–882.

Clark, C.E., Hingorani, S.R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D.A., and Vonderheide, R.H. (2007). Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer Res.* 67, 9518–9527.

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

Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., et al. (2000). The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95–105.

Cui, Z., Geurts, A.M., Liu, G., Kaufman, C.D., and Hackett, P.B. (2002). Structure-function analysis of the inverted terminal repeats of the Sleeping Beauty transposon. *J. Mol. Biol.* 318, 1221–1235.

Dąbrowska, A.M., and Słotwiński, R. (2014). The immune response to surgery and infection. *Cent. Eur. J. Immunol.* 39, 532–537.

Delogu, G., Moretti, S., Antonucci, A., Marcellini, S., Masciangelo, R., Famularo, G., Signore, L., and De Simone, C. (2000). Apoptosis and surgical trauma: dysregulated expression of death and survival factors on peripheral lymphocytes. *Arch. Surg.* 135, 1141–1147.

Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., and Raulet, D.H. (2015). A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* (80-.). 348, 136–139.

Diederichsen, A.C.P., Hjelmberg, J.V.B., Christensen, P.B., Zeuthen, J., and Fenge, C. (2003). Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 423–428.

Djenidi, F., Adam, J., Goubar, A., Durgeau, A., Meurice, G., de Montpreville, V., Validire, P., Besse, B., and Mami-Chouaib, F. (2015). CD8+CD103+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Tumor-Specific Tissue-Resident Memory T Cells and a Prognostic Factor for Survival in Lung Cancer Patients. *J Immunol* 194, 3475–3486.

Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Gomez, A.F., Mesa, C., Geilich, M., Winkels, G., Traggiai, E., Casati, A., et al. (2010). Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *Eur. J. Immunol.* 40, 22–35.

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5, 1365–1369.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8.

Duan, X., Deng, L., Chen, X., Lu, Y., Zhang, Q., Zhang, K., Hu, Y., Zeng, J., and Sun, W. (2011). Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med. Oncol.* 28, 466–474.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137–148.

El-Sherbiny, Y.M., Meade, J.L., Holmes, T.D., McGonagle, D., Mackie, S.L., Morgan, A.W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S.J., Davies, F.E., et al. (2007). The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and Nkp46 in the Natural Killer Cell-Mediated Killing of Myeloma Cells. *Cancer Res.* *67*, 8444–8449.

Elbashir, S.M., Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Lendeckel, W., Tuschl, T., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated 1- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* *15*, 188–200.

Erick, T.K., and Brossay, L. (2016). Phenotype and functions of conventional and non-conventional NK cells. *Curr. Opin. Immunol.* *38*, 67–74.

Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., and Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* *111*, 817–822.

Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor ζ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *J. Immunol.* *176*.

Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D.S., Cook, N., and Tuveson, D.A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clin. Cancer Res.* *18*, 4266–4276.

Ferguson, L.R., Chen, H., Collins, A.R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., Malhotra, M., Meeker, A.K., Amedei, A., Amin, A., et al. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin. Cancer Biol.* *35*, S5–S24.

Fiorini, C., Cordani, M., Padroni, C., Blandino, G., Di Agostino, S., and Donadelli, M. (2015). Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1853*, 89–100.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.

Le Floch, A., Jalil, A., Vergnon, I., Le Maux Chansac, B., Lazar, V., Bismuth, G., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2007). Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J. Exp. Med.* *204*, 559–570.

Fourcade, J., Kudela, P., Sun, Z., Shen, H., Land, S.R., Lenzner, D., Guillaume, P., Luescher, I.F., Sander, C., Ferrone, S., et al. (2009). PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients. *J. Immunol.* *182*, 5240–5249.

Franciszkiewicz, K., Le Floch, A., Boutet, M., Vergnon, I., Schmitt, A., and Mami-Chouaib, F. (2013). CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer Res.* *73*, 617–628.

Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., et al. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Exp. Med.* *192*, 1027–1034.

French, J.J., Cresswell, J., Wong, W.K., Seymour, K., Charnley, R.M., and Kirby, J.A. (2002). T cell adhesion and cytotoxicity of pancreatic cancer cells: a role for E-cadherin in immunotherapy? *Br. J. Cancer* *87*, 1034–1041.

Fukunaga, A., Miyamoto, M., Cho, Y., Murakami, S., Kawarada, Y., Oshikiri, T., Kato, K., Kurokawa, T., Suzuoki, M., Nakakubo, Y., et al. (2004). CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* *28*, e26-31.

Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., and Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother.* *60*, 1419–1430.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162–174.

Gaudillière, B., Fragiadakis, G.K., Bruggner, R. V, Nicolau, M., Finck, R., Tingle, M., Silva, J., Ganio, E.A., Yeh, C.G., Maloney, W.J., et al. (2014). Clinical recovery from surgery correlates with single-cell immune signatures. *Sci. Transl. Med.* *6*, 255ra131.

Genkinger, J.M., Spiegelman, D., Anderson, K.E., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P.A., English, D.R., Freudenheim, J.L., Fuchs, C.S., Giles, G.G., et al. (2009). Alcohol Intake and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis of Fourteen Cohort Studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *18*, 765–776.

Giovannetti, E., Del Tacca, M., Mey, V., Funel, N., Nannizzi, S., Ricci, S., Orlandini, C., Boggi, U., Campani, D., Del Chiaro, M., et al. (2006). Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res.* *66*, 3928–3935.

Graca, L., Chen, T.C., Moine, A. Le, Cobbold, S.P., Howie, D., and Waldmann, H. (2005). Dominant tolerance: Activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells. *Trends Immunol.* *26*, 130–135.

Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 Family Revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 515–548.

Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.-J., et al. (2014). Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* *515*, 577–581.

Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdager, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* *11*, 291–302.

Gürlevik, E., Fleischmann-Mundt, B., Armbrecht, N., Longerich, T., Woller, N., Kloos, A., Hoffmann, D., Schambach, A., Wirth, T.C., Manns, M.P., et al. (2013). Adjuvant gemcitabine therapy improves survival in a locally induced, R0-resectable model of metastatic intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* *58*, 1031–1041.

Gürlevik, E., Fleischmann-Mundt, B., Brooks, J., Demir, I.E., Steiger, K., Ribback, S., Yevsa, T., Woller, N., Kloos, A., Ostroumov, D., et al. (2016). Administration of Gemcitabine After Pancreatic Tumor Resection in Mice Induces an Antitumor Immune Response Mediated by Natural Killer Cells. *Gastroenterology* *151*, 338–350.e7.

Habbe, N., Shi, G., Meguid, R.A., Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., Feldmann, G., Stoffers, D.A., Konieczny, S.F., Leach, S.D., et al. (2008). Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 18913–18918.

Haeno, H., Gonen, M., Davis, M.B., Herman, J.M., Iacobuzio-Donahue, C.A., and Michor, F. (2012). Computational Modeling of Pancreatic Cancer Reveals Kinetics of Metastasis Suggesting Optimum Treatment Strategies. *Cell* *148*, 362–375.

Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* *271*, 350–353.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hanke, T., Takizawa, H., McMahon, C.W., Busch, D.H., Pamer, E.G., Miller, J.D., Altman, J.D., Liu, Y., Cado, D., Lemonnier, F.A., et al. (1999). Direct Assessment of MHC Class I Binding by Seven Ly49 Inhibitory NK Cell Receptors. *Immunity* *11*, 67–77.

Hannani, D., Sistigu, A., Kepp, O., Galluzzi, L., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2011). Prerequisites for the Antitumor Vaccine-Like Effect of Chemotherapy and Radiotherapy. *Cancer J.* *17*, 351–358.

He, C., Li, L., Guan, X., Xiong, L., and Miao, X. (2017). Anticancer Section / Review Mutant p53 Gain of Function and Chemoresistance: The Role of Mutant p53 in Response to Clinical Chemotherapy. *Chemotherapy*

62, 43–53.

Heggestad, A.D., Notterpek, L., and Fletcher, B.S. (2004). Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 643–650.

Vander Heiden, M., Cantley, L., and Thompson, C. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science* (80-.). 324, 1029–1033.

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977–987.

Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450.

Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469–483.

Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin. Cancer Res.* 12, 5423–5434.

Hishinuma, S., Ogata, Y., Tomikawa, M., Ozawa, I., Hirabayashi, K., and Igarashi, S. (2006). Patterns of Recurrence After Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings. *J. Gastrointest. Surg.* 10, 511–518.

Hodi, F.S., Sznol, M., Kluger, H.M., McDermott, D.F., Carvajal, R.D., Lawrence, D.P., Topalian, S.L., Atkins, M.B., Powderly, J.D., Sharfman, W.H., et al. (2014). Long-term survival of ipilimumab-naïve patients (pts) with advanced melanoma (MEL) treated with nivolumab (anti-PD-1, BMS-936558, ONO-4538) in a phase I trial. *J. Clin. Oncol.* 32, 9002.

Hruban, R.H., Maitra, A., Kern, S.E., and Goggins, M. (2007). Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 36, 831–49, vi.

Huang, Y., Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Hunborg, P., Varvares, M.A., Hoft, D.F., Hsueh, E.C., et al. (2015). CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget* 6, 17462–17478.

Hustinx, S.R., Leoni, L.M., Yeo, C.J., Brown, P.N., Goggins, M., Kern, S.E., Hruban, R.H., and Maitra, A. (2005). Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod. Pathol.* 18, 959–963.

Hutchinson, J.N., Jin, J., Cardiff, R.D., Woodgett, J.R., and Muller, W.J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB- α) Can Accelerate ErbB-2-Mediated Mammary Tumorigenesis but Suppresses Tumor Invasion. *Cancer Res.* 64.

Iacobuzio-Donahue, C.A., Fu, B., Yachida, S., Luo, M., Abe, H., Henderson, C.M., Vilardell, F., Wang, Z., Keller, J.W., Banerjee, P., et al. (2009). DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 1806–1813.

Ikemoto, T., Yamaguchi, T., Morine, Y., Imura, S., Soejima, Y., Fujii, M., Maekawa, Y., Yasutomo, K., and Shimada, M. (2006). Clinical Roles of Increased Populations of Foxp3+CD4+ T Cells in Peripheral Blood from Advanced Pancreatic Cancer Patients. *Pancreas* 33, 386–390.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887–3895.

Ivics, Z., Kaufman, C.D., Zayed, H., Miskey, C., Walisko, O., and Izsvák, Z. (2004). The Sleeping Beauty Transposable Element: Evolution, Regulation and Genetic Applications The Evolutionary Life-Cycle of DNA Transposons. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 43–56.

- Jiang, Y., Li, Y., and Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 6, e1792.
- Johansson, H., Andersson, R., Bauden, M., Hammes, S., Holdenrieder, S., and Ansari, D. (2016). Immune checkpoint therapy for pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 9457–9476.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, W.D., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* (80-.). 321, 1801–1806.
- Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis in Vivo. *Annu. Rev. Immunol* 14, 207–232.
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., et al. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730–733.e9.
- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., and Yokoyama, W.M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2731–2736.
- Knocke, S., Fleischmann-Mundt, B., Saborowski, M., Manns, M.P., Kühnel, F., Wirth, T.C., and Woller, N. (2016). Tailored Tumor Immunogenicity Reveals Regulation of CD4 and CD8 T Cell Responses against Cancer. *Cell Rep.* 17, 2234–2246.
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907.
- Kono, T., Imai, Y., Yasuda, S., Ohmori, K., Fukui, H., Ichikawa, K., Tomita, S., Imura, J., Kuroda, Y., Ueda, Y., et al. (2008). The CD155/poliiovirus receptor enhances the proliferation of *ras* -mutated cells. *Int. J. Cancer* 122, 317–324.
- Ksienzyk, A., Neumann, B., Nandakumar, R., Finsterbusch, K., Grashoff, M., Zawatzky, R., Bernhardt, G., Hauser, H., and Kroger, A. (2011). IRF-1 Expression Is Essential for Natural Killer Cells to Suppress Metastasis. *Cancer Res.* 71, 6410–6418.
- Kulu, Y., Schmied, B.M., Werner, J., Muselli, P., Büchler, M.W., and Schmidt, J. (2009). Total pancreatectomy for pancreatic cancer: indications and operative technique. *HPB (Oxford).* 11, 469–475.
- Kutter, C., and Svoboda, P. (2008). miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol* 5, 181–188.
- Lam, A.R., Bert, N. Le, Ho, S.S.W., Shen, Y.J., Tang, M.L.F., Xiong, G.M., Croxford, J.L., Koo, C.X., Ishii, K.J., Akira, S., et al. (2014). RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res.* 74, 2193–2203.
- Lanier, L.L. (2005). Nk Cell Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–274.
- Lanzavecchia, A., Iezzi, G., and Viola, A. (1999). From TCR engagement to T cell activation: A kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96, 1–4.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., et al. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.

- Le, D.T., Wang-Gillam, A., Picozzi, V., Greten, T.F., Crocenzi, T., Springett, G., Morse, M., Zeh, H., Cohen, D., Fine, R.L., et al. (2015). Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes*-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* *33*, 1325–1333.
- Leach, D.R., Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* (80-.). *271*, 1734–1736.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 233–258.
- Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor β (TGF- β) Target Genes and Distinguishes TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 8108–8125.
- Liao, N.S., Bix, M., Zijlstra, M., and Jaenisch, R. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* (80-.). *253*, 199–202.
- Ling, K.L., Dulphy, N., Bahl, P., Salio, M., Maskell, K., Piris, J., Warren, B.F., George, B.D., Mortensen, N.J., and Cerundolo, V. (2007). Modulation of CD103 expression on human colon carcinoma-specific CTL. *J. Immunol* *178*, 2908–2915.
- Liu, H., Patel, M.R., Prescher, J.A., Patsialou, A., Qian, D., Lin, J., Wen, S., Chang, Y.-F., Bachmann, M.H., Shimono, Y., et al. (2010). Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18115–18120.
- Liu, J., Blake, S.J., Yong, M.C.R., Harjunpaa, H., Ngiow, S.F., Takeda, K., Young, A., O'Donnell, J.S., Allen, S., Smyth, M.J., et al. (2016). Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease. *Cancer Discov.*
- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., and Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* *9*, 669–676.
- Loke, P., and Allison, J.P. (2003). PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5336–5341.
- Long, E.O., Burshtyn, D.N., Clark, W.F., Peruzzi, M., Rajagopalan, S., Rojo, S., Wagtmann, N., and Winter, C.C. (1997). Killer cell inhibitory receptors: Diversity, specificity, and function. *Immunol. Rev.* *155*, 135–144.
- Lopez, N.E., Prendergast, C., and Lowy, A.M. (2014). Borderline resectable pancreatic cancer: definitions and management. *World J. Gastroenterol.* *20*, 10740–10751.
- Lucas, A.L., Frado, L.E., Hwang, C., Kumar, S., Khanna, L.G., Levinson, E.J., Chabot, J.A., Chung, W.K., and Frucht, H. (2014). BRCA1 and BRCA2 germline mutations are frequently demonstrated in both high-risk pancreatic cancer screening and pancreatic cancer cohorts. *Cancer* *120*, 1960–1967.
- Lutz, E.R., Wu, A.A., Bigelow, E., Sharma, R., Mo, G., Soares, K., Solt, S., Dorman, A., Wamwea, A., Yager, A., et al. (2014). Immunotherapy Converts Nonimmunogenic Pancreatic Tumors into Immunogenic Foci of Immune Regulation. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 616–631.
- Mahoney, K.M., Freeman, G.J., and McDermott, D.F. (2015a). The next immune-checkpoint inhibitors: Pd-1/pd-l1 blockade in melanoma. *Clin. Ther.* *37*, 764–782.
- Mahoney, K.M., Rennert, P.D., and Freeman, G.J. (2015b). Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 561–584.
- Maitra, A., Adsay, N.V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J.L., Yeo, C.J., and Hruban, R.H. (2003). Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray. *Mod. Pathol.* *16*, 902–912.

- Malka, D., Hammel, P., Maire, F., Rufat, P., Madeira, I., Pessione, F., Lévy, P., and Ruzniewski, P. (2002). Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* *51*, 849–852.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436–444.
- Masciarelli, S., Fontemaggi, G., Di Agostino, S., Donzelli, S., Carcarino, E., Strano, S., and Blandino, G. (2014). Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene* *33*, 1601–1608.
- Massagué, J., Blain, S.W., Lo, R.S., Blain, S., Lo, R., Massague, J., Chen, Y., Schmierer, B., Hill, C., Wrighton, K., et al. (2000). TGF β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell* *103*, 295–309.
- Mátés, L., Chuah, M.K.L., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., Grzela, D.P., Schmitt, A., Becker, K., Matrai, J., et al. (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genet.* *41*, 753–761.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.
- McGranahan, N., Furness, A.J.S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., et al. (2016). Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* (80-.). *351*, 1463–1469.
- Mehta, V.K., Fisher, G., Ford, J.A., Poen, J.C., Vierra, M.A., Oberhelman, H., Niederhuber, J., and Augusto Bastidas, J. (2001). Preoperative Chemoradiation for Marginally Resectable Adenocarcinoma of the Pancreas. *J. Gastrointest. Surg.* *5*, 27–35.
- Meyer, D., Seth, S., Albrecht, J., Maier, M.K., du Pasquier, L., Ravens, I., Dreyer, L., Burger, R., Gramatzki, M., Schwinzer, R., et al. (2009). CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains. *J. Biol. Chem.* *284*, 2235–2244.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin. Immunol.* *27*, 16–25.
- Mokart, D., Capo, C., Blache, J.L., Delpero, J.R., Houvenaeghel, G., Martin, C., and Mege, J.L. (2002). Early postoperative compensatory anti-inflammatory response syndrome is associated with septic complications after major surgical trauma in patients with cancer. *Br. J. Surg.* *89*, 1450–1456.
- Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., Brunton, V.G., et al. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 246–251.
- Muller, P.A.J., and Vousden, K.H. (2014). Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* *25*, 304–317.
- Muller, P.A.J., Vousden, K.H., and Norman, J.C. (2011). P53 and Its Mutants in Tumor Cell Migration and Invasion. *J. Cell Biol.* *192*, 209–218.
- Mundy-Bosse, B.L., Lesinski, G.B., Jaime-Ramirez, A.C., Benninger, K., Khan, M., Kuppusamy, P., Guenterberg, K., Kondadasula, S.V., Chaudhury, A.R., La Perle, K.M., et al. (2011). Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice. *Cancer Res.* *71*, 5101–5110.
- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* *189*, 1363–1372.

Murphy, S.J., Hart, S.N., Lima, J.F., Kipp, B.R., Klebig, M., Winters, J.L., Szabo, C., Zhang, L., Eckloff, B.W., Petersen, G.M., et al. (2013). Genetic Alterations Associated With Progression From Pancreatic Intraepithelial Neoplasia to Invasive Pancreatic Tumor. *Gastroenterology* *145*, 1098–1109.e1.

Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res.* *58*.

Neesse, A., Michl, P., Frese, K.K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M.A., Lolkema, M.P., Buchholz, M., Olive, K.P., Gress, T.M., et al. (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* *60*, 861–868.

Neesse, A., Algül, H., Tuveson, D.A., and Gress, T.M. (2015). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* *64*, 1476–1484.

Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J.A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., et al. (2004). A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* *350*12350, 1200–1210.

Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M.J., Gallinger, S., Mariette, C., et al. (2010). Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. *JAMA* *304*, 1073.

Netti, P.A., Berk, D.A., Swartz, M.A., Grodzinsky, A.J., and Jain, R.K. (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.* *60*, 2497–2503.

Ngiow, S.F., Young, A., Jacquelot, N., Yamazaki, T., Enot, D., Zitvogel, L., and Smyth, M.J. (2015). A threshold level of intratumor CD8+ T-cell PD1 expression dictates therapeutic response to anti-PD1. *Cancer Res.* *75*, 3800–3811.

Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., et al. (2007). Clinical Significance and Therapeutic Potential of the Programmed Death-1 Ligand/Programmed Death-1 Pathway in Human Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2151–2157.

Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., et al. (2007). Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. *JAMA* *297*, 267.

Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* *277*, 21843–21850.

Okamoto, K., Bartocci, C., Ouzounov, I., Diedrich, J.K., Yates III, J.R., and Denchi, E.L. (2013). A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection. *Nature* *494*, 502–505.

Oldenhove, G., de Heusch, M., Urbain-Vansanten, G., Urbain, J., Maliszewski, C., Leo, O., and Moser, M. (2003). CD4 + CD25 + Regulatory T Cells Control T Helper Cell Type 1 Responses to Foreign Antigens Induced by Mature Dendritic Cells In Vivo. *J. Exp. Med.* *198*, 259–266.

Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* (80-.). *324*, 1457–1461.

Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001107.

Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells: More mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* *59*, 1593–1600.

Ott, P.A., Hodi, F.S., and Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1 / PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Modalities with Durable Clinical Benefit in Melanoma Patients. *Clin. Cancer Res.* *19*, 5300–5309.

Ou, L., Shi, Y., Dong, W., Liu, C., Schmidt, T.J., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., Fan, D., and Ai, W. (2015).

Kruppel-Like Factor KLF4 Facilitates Cutaneous Wound Healing by Promoting Fibrocyte Generation from Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 1425–1434.

Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., et al. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* *198*, 569–580.

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molitor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., et al. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2654–2666.

Pandha, H., Rigg, A., John, J., and Lemoine, N. (2007). Loss of expression of antigen-presenting molecules in human pancreatic cancer and pancreatic cancer cell lines. *Clin. Exp. Immunol.* *148*, 127–135.

Parry, R. V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9543–9553.

Patel, M., Hoffe, S., Malafa, M., Hodul, P., Klapman, J., Centeno, B., Kim, J., Helm, J., Valone, T., and Springett, G. (2011). Neoadjuvant GTX Chemotherapy and IMRT-based chemoradiation for borderline resectable pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* *104*, 155–161.

Patnaik, A., Kang, S.P., Rasco, D., Papadopoulos, K.P., Elassaiss-Schaap, J., Beeram, M., Drenkler, R., Chen, C., Smith, L., Espino, G., et al. (2015). Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* *21*, 4286–4293.

Paulson, A.S., Tran Cao, H.S., Tempero, M.A., and Lowy, A.M. (2013). Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology* *144*, 1316–1326.

Peggs, K.S., Quezada, S.A., Chambers, C.A., Korman, A.J., and Allison, J.P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J. Exp. Med.* *206*, 1717–1725.

Pellegata, N.S., Antoniono, R.J., Redpath, J.L., and Stanbridge, E.J. (1996). DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 15209–15214.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* *180*, 1955–1960.

Philip, B., Roland, C.L., Daniluk, J., Liu, Y., Chatterjee, D., Gomez, S.B., Ji, B., Huang, H., Wang, H., Fleming, J.B., et al. (2013). A High-Fat Diet Activates Oncogenic Kras and COX2 to Induce Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Gastroenterology* *145*, 1449–1458.

Pohl, J., Goldfinger, N., Radler-Pohl, A., Rotter, V., and Schirmacher, V. (1988). p53 increases experimental metastatic capacity of murine carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2078–2081.

Poi, M.J., Yen, T., Li, J., Song, H., Lang, J.C., Schuller, D.E., Pearl, D.K., Casto, B.C., Tsai, M.D., and Weghorst, C.M. (2001). Somatic INK4a-ARF locus mutations: A significant mechanism of gene inactivation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol. Carcinog.* *30*, 26–36.

Qin, F.X.-F. (2009). Dynamic behavior and function of Foxp3+ regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell. Mol. Immunol.* *6*, 3–13.

Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 267–296.

Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., and Matrisian, L.M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.* *74*.

Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Morselli-Labate, A.M., Maisonneuve, P., and Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 24, 349–358.

Redston, M.S., Caldas, C., Seymour, A.B., Hruban, R.H., da Costa, L., Yeo, C.J., and Kern, S.E. (1994). p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res.* 54, 3025–3033.

Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* 148, 349–361.

Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W., et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25, 735–747.

Ribas, A., Hodi, F.S., Kefford, R., Hamid, O., Daud, A., Wolchok, J.D., Hwu, W.-J., Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Joshua, A.M., et al. (2014). Efficacy and safety of the anti-PD-1 monoclonal antibody MK-3475 in 411 patients (pts) with melanoma (MEL). *J. Clin. Oncol.* 32, LBA9000-LBA9000.

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348, 124–128.

Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 2521–2532.

Roy, R., Chun, J., and Powell, S.N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* 12, 68–78.

Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. a, Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T. a, Hruban, R.H., Yeo, C.J., et al. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57, 1731–1734.

Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Zhang, M., McManus, M.T., Gertler, F.B., Scott, M.L., et al. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.* 33, 401–406.

Ruggeri, B.A., Huang, L., Wood, M., Cheng, J.Q., and Testa, J.R. (1998). Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol. Carcinog.* 21, 81–86.

Rychahou, P.G., Kang, J., Gulhati, P., Doan, H.Q., Chen, L.A., Xiao, S.-Y., Chung, D.H., and Evers, B.M. (2008). Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20315–20320.

Scarpa, a, Capelli, P., Mukai, K., Zamboni, G., Oda, T., Iacono, C., and Hirohashi, S. (1993). Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am. J. Pathol.* 142, 1534–1543.

Schachter, J., Ribas, A., Long, G. V, Arance, A., Grob, J.-J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., et al. (2017). Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet.*

Schlieman, M.G., Fahy, B.N., Ramsamooj, R., Beckett, L., and Bold, R.J. (2003). Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br. J. Cancer* 89, 2110–2115.

Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 269–279.

Schober, M., Jesenofsky, R., Faissner, R., Weidenauer, C., Haggmann, W., Michl, P., Heuchel, R.L., Haas, S.L., and Löhr, J.M. (2014). Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers (Basel).* 6, 2137–

2154.

Schönleben, F., Qiu, W., Ciau, N.T., Ho, D.J., Li, X., Allendorf, J.D., Remotti, H.E., and Su, G.H. (2006). PIK3CA mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma of the pancreas. *Clin. Cancer Res.* *12*, 3851–3855.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* (80-.). *331*, 1565–1570.

Seery, L.T., Knowlden, J.M., Gee, J.M., Robertson, J.F., Kenny, F.S., Ellis, I.O., and Nicholson, R.I. (1999). BRCA1 expression levels predict distant metastasis of sporadic breast cancers. *Int. J. Cancer* *84*, 258–262.

Seibler, J., Küter-Luks, B., Kern, H., Streu, S., Plum, L., Mauer, J., Kühn, R., Brüning, J.C., and Schwenk, F. (2005). Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1–10.

Seliger, B., Ritz, U., Bock, M., Huber, C., Abele, R., Tampé, R., Sutter, G., Sutter, G., Drexler, I., and Ferrone, S. (2001). Immune escape of melanoma: First evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* *61*, 8647–8650.

Seth, S., Maier, M.K., Qiu, Q., Ravens, I., Kremmer, E., Förster, R., and Bernhardt, G. (2007). The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *364*, 959–965.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107–1111.

Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* (80-.). *348*, 56–61.

Sideras, K., Braat, H., Kwekkeboom, J., van Eijck, C.H., Peppelenbosch, M.P., Sleijfer, S., and Bruno, M. (2014). Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies. *Cancer Treat. Rev.* *40*, 513–522.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* *67*, 7–30.

da Silva, G.N., de Castro Marcondes, J.P., de Camargo, E.A., da Silva Passos Júnior, G.A., Sakamoto-Hojo, E.T., and Salvadori, D.M.F. (2010). Cell cycle arrest and apoptosis in *TP53* subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. *Exp. Biol. Med.* *235*, 814–824.

Sloan, J.M., Kershaw, M.H., Touloukian, C.E., Lapointe, R., Robbins, P.F., Restifo, N.P., and Hwu, P. (2002). MHC class I and class II presentation of tumor antigen in retrovirally and adenovirally transduced dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* *9*, 946–950.

Sloan, K.E., Eustace, B.K., Stewart, J.K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J.E., Unger, C., Louis, D.N., Ilag, L.L., et al. (2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer* *4*, 73.

Small, W., Berlin, J., Freedman, G.M., Lawrence, T., Talamonti, M.S., Mulcahy, M.F., Chakravarthy, A.B., Konski, A.A., Zalupski, M.M., Philip, P.A., et al. (2008). Full-dose gemcitabine with concurrent radiation therapy in patients with nonmetastatic pancreatic cancer: a multicenter phase II trial. *J. Clin. Oncol.* *26*, 942–947.

Smith, K.A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* *240*, 1169–1176.

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 850–861.

Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J.M., Desrichard, A., Walsh, L.A., Postow, M.A., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *371*, 2189–2199.

Sodeur, S., Ullrich, S., Gustke, H., Zangemeister-Wittke, U., and Schumacher, U. (2009). Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice. *Cancer Lett.* 282, 146–151.

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

Stanger, B.Z., Stiles, B., Lauwers, G.Y., Bardeesy, N., Mendoza, M., Wang, Y., Greenwood, A., Cheng, K.H., McLaughlin, M., Brown, D., et al. (2005). Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* 8, 185–195.

Stromnes, I.M., Brockenbrough, J.S., Izeradjene, K., Carlson, M.A., Cuevas, C., Simmons, R.M., Greenberg, P.D., and Hingorani, S.R. (2014). Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut* 63, 1769–1781.

Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J. Immunol.* 168, 671–679.

Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b + myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* 11, 6713–6721.

Suzuki, M., Mose, E.S., Montel, V., and Tarin, D. (2006). Dormant Cancer Cells Retrieved from Metastasis-Free Organs Regain Tumorigenic and Metastatic Potency. *Am. J. Pathol.* 169, 673–681.

Tacke, M., Hanke, G., Hanke, T., and Hünig, T. (1997). CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: Evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol.* 27, 239–247.

Tai, L.-H., Zhang, J., Scott, K.J., de Souza, C.T., Alkayyal, A.A., Ananth, A.A., Sahi, S., Adair, R.A., Mahmoud, A.B., Sad, S., et al. (2013). Perioperative Influenza Vaccination Reduces Postoperative Metastatic Disease by Reversing Surgery-Induced Dysfunction in Natural Killer Cells. *Clin. Cancer Res.* 19, 5104–5115.

Tanaka, T., Watanabe, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Kanazawa, T., Kazama, S., and Nagawa, H. (2006). Chromosome 18q deletion and Smad4 protein inactivation correlate with liver metastasis: A study matched for T- and N- classification. *Br. J. Cancer* 95, 1562–1567.

Tang, Y., Xu, X., Guo, S., Zhang, C., Tang, Y., Tian, Y., Ni, B., Lu, B., and Wang, H. (2014). An increased abundance of tumor-infiltrating regulatory t cells is correlated with the progression and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One* 9, e91551.

Tanno, S., Tanno, S., Mitsuuchi, Y., Altomare, D.A., Xiao, G.H., and Testa, J.R. (2001). AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 61, 589–593.

Tempero, M.A., Malafa, M.P., Behrman, S.W., Benson, A.B., Casper, E.S., Chiorean, E.G., Chung, V., Cohen, S.J., Czito, B., Engebretson, A., et al. (2014). Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 12, 1083–1093.

Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., et al. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* 71, 5393–5399.

Thompson, D., Easton, D.F., and Breast Cancer Linkage Consortium (2002). Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1358–1365.

Thomson, J.G., Rucker, E.B., and Piedrahita, J.A. (2003). Mutational analysis of LoxP sites for efficient cre-mediated insertion into genomic DNA. *Genesis* 36, 162–167.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2015). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27, 451–461.

Tran Janco, J.M., Lamichhane, P., Karyampudi, L., and Knutson, K.L. (2015). Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J. Immunol.* 194, 2985–2991.

Ueno, H., Kosuge, T., Matsuyama, Y., Yamamoto, J., Nakao, A., Egawa, S., Doi, R., Monden, M., Hatori, T., Tanaka, M., et al. (2009). A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br. J. Cancer* 101, 908–915.

Vogiatzi, F., Brandt, D.T., Schneikert, J., Fuchs, J., Grikscheit, K., Wanzel, M., Pavlakis, E., Charles, J.P., Timofeev, O., Nist, A., et al. (2016). Mutant p53 promotes tumor progression and metastasis by the endoplasmic reticulum UDPase ENTPD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1–10.

Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., et al. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518, 495–501.

Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C.A., Friess, H., and Büchler, M.W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br. J. Surg.* 91, 586–594.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405–413.

Wang, J., Yang, L., Yu, L., Wang, Y.-Y., Chen, R., Qian, J., Hong, Z.-P., and Su, X.-S. (2017). Surgery-induced monocytic myeloid-derived suppressor cells expand regulatory T cells in lung cancer. *Oncotarget* 8, 17050–17058.

Wang, Z.-Q., Milne, K., Derocher, H., Webb, J.R., Nelson, B.H., and Watson, P.H. (2016). CD103 and Intratumoral Immune Response in Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.*

Warshaw, A.L., and Castillo, C.F. (1992). Pancreatic Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 326, 455–465.

Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., et al. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4, 670–679.

Wilentz, R.E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G.J., Kang, M., Goggins, M., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (1998). Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 58, 4740–4744.

Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (2000). Loss of Expression of Dpc4 in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Evidence That DPC4 Inactivation Occurs Late in Neoplastic Progression. *Cancer Res.* 60.

Winograd, R., Byrne, K.T., Evans, R.A., Odorizzi, P.M., Meyer, A.R.L., Bajor, D.L., Clendenin, C., Stanger, B.Z., Furth, E.E., Wherry, E.J., et al. (2015). Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* 3, 399–411.

Witkiewicz, A., Williams, T.K., Cozzitorto, J., Durkan, B., Showalter, S.L., Yeo, C.J., and Brody, J.R. (2008). Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Recruits Regulatory T Cells to Avoid Immune Detection. *J. Am. Coll. Surg.* 206, 849–854.

Wong, C.-H., Li, Y.-J., and Chen, Y.-C. (2016). Therapeutic potential of targeting acinar cell reprogramming in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 7046–7057.

Wörmann, S.M., Song, L., Ai, J., Diakopoulos, K.N., Kurkowski, M.U., Görgülü, K., Ruess, D., Campbell, A., Doglioni, C., Jodrell, D., et al. (2016). Loss of P53 Function Activates JAK2–STAT3 Signaling to Promote Pancreatic Tumor Growth, Stroma Modification, and Gemcitabine Resistance in Mice and Is Associated With Patient Survival. *Gastroenterology* *151*, 180–193.e12.

Xu, D., Gu, P., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., and Chen, S.H. (2004). NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *Int. J. Cancer* *109*, 499–506.

Yant, S.R., Park, J., Huang, Y., Giehm, J., Kay, M.A., and Mikkelsen, J.G. (2004). Mutational Analysis of the N-Terminal DNA-Binding Domain of Sleeping Beauty Transposase : Critical Residues for DNA Binding and Hyperactivity in Mammalian Cells Mutational Analysis of the N-Terminal DNA-Binding Domain of Sleeping Beauty Transposase : *Crit. Rev. Eukaryot. Cell* *24*, 9239–9247.

Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P.D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16168–16173.

Ying, H., Kimmelman, A.C.C., Lyssiotis, C.A.A., Hua, S., Chu, G.C.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L.L., et al. (2012). Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism Haoqiang. *Cell* *149*, 656–670.

Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Schmidt, K., Wilson, J.K. V, Markowitz, S., Zhou, S., Jr, L. a D., et al. (2009). Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science* (80-.). *325*, 1555–1559.

Zaheed Husain, S., Huang, Y., Seth, P., Husain, Z., and Sukhatme, V.P. (2013). Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *Netherlands Cancer Inst. / Antoni van Leeuwenhoek January J. Immunol.* *191*, 1486–1495.

Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* *188*, 2375–2380.

Zambirinis, C.P., Pushalkar, S., Saxena, D., and Miller, G. (2014). Pancreatic cancer, inflammation, and microbiome. *Cancer J.* *20*, 195–202.

Zhang, F., Wang, H., Wang, X., Jiang, G., Liu, H., Zhang, G., Wang, H., Fang, R., Bu, X., Cai, S., et al. (2016). TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget* *7*, 52294–52306.

Zhang, L., Duan, C.J., Binkley, C., Li, G., Uhler, M.D., Logsdon, C.D., and Simeone, D.M. (2004). A Transforming Growth Factor -Induced Smad3/Smad4 Complex Directly Activates Protein Kinase A. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2169–2180.

Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* *92*, 725–734.

Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a001883.

Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* *1*, 1223–1225.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
ADM	Azinar-Duktale-Metaplasie
APC	<i>antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer related protein</i>
BSA	Bovines serum albumin
CAAC	Centroazinar-Azinus-Kompartimente
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK	<i>cytokeratin</i> , Zytokeratin
Cre	<i>Causes recombination</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
d	<i>days</i> , Tage
DC	<i>dendritic cells</i> , Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EF1 α	<i>Elongation factor-1 alpha</i> Promotor
EP	Elektroporation
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fl/fl	flox/flox, das hiervoor genannte Gen ist zwischen zwei loxP Stellen
FP	<i>Forward primer</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
fw	<i>forward</i>
G	Gemcitabine
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEMMs	<i>Genetic engineered mouse models</i>
Gr1	<i>Granulocyte differentiation antigen 1</i>
H&E	Hämalaun-Eosin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenös
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPMN	<i>Intraductal papillary mucinous neoplasm</i> , intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien
ITR	<i>Inverted terminal repeats</i>
KC Maus	Kras-Cre Maus
KGW	Körpergewicht
KPC Maus	Kras-p53-Cre Maus
Kras	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
kV	Kilovolt
Lama 4	Laminin 4-G1254V
LB	<i>Lysogeny broth</i>
loxP	<i>Locus of crossover(x)</i> in P1
LSL	loxP-Stopp-loxP, eine Stoppkassette zwischen zwei loxP Stellen
Luc	Luciferase
mA	Milliampere
MCN	<i>Mucinous cystic neoplasm</i> , muzinöse zystische Neoplasien
MDSCs	<i>Myeloid derived suppressor cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
ms	<i>median survival</i> , Mittleres Überleben
myr	myristoyliert
n	Gruppengröße
Neutrophile	Neutrophile Granulozyten
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
p	Statistische Signifikanz
p53	Protein 53
pAkt2	Phosphoryliertes Akt2
PanIN	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasm</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PD1	<i>programmed cell death 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> , duktales Adenokarzinom des Pankreas

PDL-1	<i>programmed cell death 1 ligand</i>
Pdx-1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PEI	Polyethylenimin
pERK	Phosphorylierte <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase Promotor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pM	Pikomol pro Liter
pT	SB Transposon pT3
R0	Vollständige Resektion
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RR	Resektionsrand
SB	<i>Sleeping Beauty</i> Transposase
SF	Serum frei
shRNA	<i>shorthairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SSC	<i>side scatter</i>
TAMs	Tumor assoziierte Makrophagen
TCR	<i>T cell receptor</i> , T Zellrezeptor
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TNF	Tumornekrose Faktor
Tregs	Regulatorische T Zellen
U	Units
α CTLA4	<i>anti cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> , Antikörper gegen CTLA4
α PD1	<i>anti programmed cell death 1</i> , Antikörper gegen PD1
α SMA	<i>α smooth muscle actin</i>

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Darstellung des <i>in situ</i> Elektroporationsvorgangs zur Tumorinduktion.....	19
Abbildung 2 – Das Wachstum eines singulären Tumorknotens ermöglicht eine R0-Resektion.....	19
Abbildung 3 – Schematische Darstellung der therapeutischen Strategien im Kontext einer chirurgischen Resektion.....	20
Abbildung 4 – Expression von mutiertem Kras führt in Kombination mit einer p53-Deletion zur Tumorgenese.....	21
Abbildung 5 – Histologische und immunhistochemische Untersuchung der mittels Expression von mutiertem Kras und Deletion von p53 im p53fl/fl und LSL-Kras ^{G12D} x p53fl/fl Mausstamm induzierten Tumore.....	22
Abbildung 6 – H&E gefärbte Gewebsschnitte der Tumore zeigen Azinar-Duktale-Metaplasie (ADM) und prämaligne Läsionen.....	23
Abbildung 7 – Mittels <i>in-situ</i> Elektroporation der dargestellten Plasmide wurde im Pankreas von C57BL/6 Mäusen neben einer Kras ^{G12V} Expression ein shRNA vermittelter Gen <i>knockdown</i> von SMAD4, BRCA1, p16/p19 oder p53 induziert.....	24
Abbildung 8 – Herunterregulation von SMAD4, BRCA1 oder p16/p19 führt bei gleichzeitiger Expression von onkogenem Kras (Kras ^{G12V}) und p53 <i>knockdown</i> zu einer zuverlässigen Tumorprogression.....	26
Abbildung 9 – H&E Färbung der mit Kras ^{G12V} sh-p53 und sh-SMAD4, sh-BRCA1 oder sh-p16/19 induzierten Tumore.....	26
Abbildung 10 – Verstärkte und isochrome Tumorprogression durch additiven Tumorsuppressorgen- <i>knockdown</i> mit shRNA gegen p53, SMAD4, BRCA1 und p16/p19 bei gleichzeitiger Kras ^{G12V} Überexpression.....	27
Abbildung 11 – Die erhöhte Lokalrezidivrate nach der Tumorresektion bei einem <i>knockdown</i> von BRCA1 oder p16/p19 korreliert mit einem kürzeren Überleben dieser Gruppen.....	28
Abbildung 12 – Die p53-Mutationen K129E, R172H und R246S haben keinen Einfluss auf die Tumorprogression.....	30
Abbildung 13 – Mutation von p53 führt zu besserem therapeutischen Effekt der palliativen Gemcitabinetherapie.....	32
Abbildung 14 – Die p53-Mutation 246 verringert den therapeutischen Erfolg der R0-Resektion.....	33
Abbildung 15 – Die Mutation von p53 an Position 246 reduziert den therapeutischen Effekt einer adjuvanten Gemcitabinetherapie.....	35
Abbildung 16 – Untersuchung zytostatischer und zytotoxischer Effekte von Gemcitabine auf Pankreaskarzinomzellen mit unterschiedlichem p53 Status.....	36
Abbildung 17 – Die Expression von Akt2 induziert eine starke Metastasierung.....	38
Abbildung 18 – Histologische Untersuchungen des Primärtumors und der Metastasen.....	39
Abbildung 19 – Adjuvante Gemcitabinetherapie reduziert die Frequenz der Lokalrezidivierung.....	40
Abbildung 20 – Adjuvante Gemcitabinetherapie erhöht die NK Zellpopulation und reduziert immunsuppressive Zellen im Resektionsrand.....	42
Abbildung 21 – Adjuvante Kombination mit Immuncheckpointblockade hat keinen zusätzlichen therapeutischen Nutzen.....	44
Abbildung 22 – Neoadjuvante Therapie mit α PD1/G hat einen signifikanten Einfluss auf das Überleben und die Lokalrezidivrate.....	45
Abbildung 23 – Analyse der T Zellen in Blut und Tumor nach neoadjuvanter Therapie.....	47
Abbildung 24 – Einfluss der neoadjuvanten Therapie auf regulatorische T Zellen in Blut und Tumor.....	48
Abbildung 25 - Die neoadjuvante PD1 Blockade erhöht die Frequenz der CD8 ⁺ CD103 ⁺ T Zellen im Tumorgewebe.....	49
Abbildung 26 – Analyse der NK Zellen in Blut und Tumor nach neoadjuvanter Therapie.....	49
Abbildung 27 – Die neoadjuvante Gemcitabinegabe reduziert die MDSCs im Blut und Tumor.....	50
Abbildung 28 – Analyse der myeloiden Subpopulationen in Blut und Tumor nach neoadjuvanter Therapie.....	51
Abbildung 29 – Analyse der Expression von PD1, CD69, CD11a und CD44 auf den CD8 T Zellen nach neoadjuvanter Therapie.....	54
Abbildung 30 – Die neoadjuvante α PD1/G Therapie induziert eine lokale Neoantigen-spezifische CD8 T Zellantwort.....	56
Abbildung 31 – In Reaktion auf die durch α PD1/G-vermittelte antitumorale T Zellantwort wird eine PD-L1 Expression auf den CK19 positiven Tumorzellen induziert.....	57
Abbildung 32 – Sowohl CD8 T- als auch NK Zellen sind in der neoadjuvanten Therapiephase entscheidend für die therapeutische Reduktion der Lokalrezidivierung.....	58

Abbildung 33 – Die Reduktion der Lokalrezidivierung ist in der adjuvanten Phase deutlich abhängig von NK Zellen.	59
Abbildung 34 – Schematischer Ablauf der Immunzellanalyse in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie.	60
Abbildung 35 – Analyse der T Zellen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion.	61
Abbildung 36 –Die neoadjuvante Therapie mit α PD1 und α PD1/G erhöht die CD8 ⁺ CD103 ⁺ Frequenz im Resektionsrand.	62
Abbildung 37 – Untersuchung der NK Zellen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion.	63
Abbildung 38 - Analyse der Gr1 ⁺ CD11b ⁺ MDSCs in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion.	63
Abbildung 39 - Analyse der myeloiden Zellen in Blut und Resektionsrand nach neoadjuvanter Therapie und Resektion.	64
Abbildung 40 – CD155 ist auf Tumorzellen aus Primärtumor, Lokalrezidiven und auf Lebermetastasen hoch exprimiert.	66
Abbildung 41 – Untersuchung der NK Zell-vermittelten Zytotoxizität <i>in vitro</i>	67
Abbildung 42 – Adjuvante Therapie mit dem CD96 Antikörper 6A6 reduziert die Frequenz an Fernmetastasen.	68
Abbildung 43 – Die gezielte Kombination von neoadjuvanter α PD1/G mit adjuvanter CD96 Blockade ermöglicht progressionsfreies Langzeitüberleben.	70
Abbildung 44 – Beispielhafte Darstellung der angewandten Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Analyse der Immunzellpopulationen.	111

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Analyse der Tumorinzidenz und des mittleren Überlebens der elektroporierten Gruppen.	21
Tabelle 2 – Tumorinzidenz, Metastasierung und Mittleres Überleben bei Kombination von Kras ^{G12V} Expression und Herunterregulation von SMAD4, BRCA1, p16/p19 oder p53.	25
Tabelle 3 – Überleben, Inzidenz und Metastasierung bei zusätzlicher Verwendung von myrAkt2.....	38
Tabelle 4 – Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme und deren Hersteller	92
Tabelle 5 – Liste der verwendeten FACS Antikörper	93
Tabelle 6 - Für die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten verwendete Antikörper	93
Tabelle 7 – Weitere für die IHC Färbung verwendete Materialien	93
Tabelle 8 – Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	95
Tabelle 9 – Liste der verwendeten, von der Arbeitsgruppe und Kollaborateuren zur Verfügung gestellten, Plasmide.....	97
Tabelle 10 – Liste der im Rahmen der Arbeit generierten Plasmide.....	98
Tabelle 11 – Liste der verwendeten Oligonukleotide. Alle Primer wurden von der Firma eurofins MWG Operon mit der Aufreinigungsart 0,01 HPFS bezogen.	99
Tabelle 12 – Liste der verwendeten Kits.....	99
Tabelle 13 – Liste der verwendeten Geräte.....	100
Tabelle 14 – Liste der verwendeten Materialien	100
Tabelle 15 – Liste der im Rahmen der Arbeit kultivierten Tumorzellen. In der rechten Spalte ist der genetische Hintergrund, der zur Tumorinduktion genutzt und nach der Kultivierung der Tumorzellen per PCR bestätigt wurde, dargestellt.	101
Tabelle 16 – Ansatz zur Transfektion der p53-Akt2 Zellen mit Polyethylenimin.	102
Tabelle 17 - DNA Ansatz zur <i>in situ</i> Elektroporation für die Induktion eines invasiv wachsenden und metastasierenden PDAC in p53fl/fl Mäusen	105
Tabelle 18 - DNA Ansatz zur <i>in situ</i> Elektroporation für die Induktion eines Neoantigen-exprimierenden Pankreastumors in p53fl/fl Mäusen.....	105
Tabelle 19 – DNA Ansätze die zur <i>in situ</i> Elektroporation des Pankreas verwendet wurden.....	106
Tabelle 20 – Verdünnung, Antigen Rückgewinnung und Besonderheiten der zur immunhistochemischen Färbung verwendeten Antikörper.....	109
Tabelle 21 – Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion mit der Q5 [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	112
Tabelle 22 – Exemplarische Darstellung der Schritte der Polymerasekettenreaktion	112
Tabelle 23 – Darstellung der Vektor/Insert Paare die nach Isolation und Aufreinigung ligiert wurden.	114

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotion niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn PD Dr. Florian Kühnel, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und der mannigfachen Unterstützung. Der bereichernde und konstruktive Austausch war immer sehr hilfreich und kam mir in zahlreichen Angelegenheiten zugute.

Außerdem gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Christine Falk für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Anaclét Ngezahayo für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Engin Gürlevik für die Betreuung des Projekts. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Dr. Bettina Fleischmann-Mundt danke ich herzlich für die umfassende und hilfreiche Betreuung der Experimente, vor allem bei den Tierexperimenten. Außerdem möchte ich mich bei ihr für die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit, die kritischen Betrachtungen sowie für die hervorragenden Kommasetzungsfähigkeiten bedanken. Julia Niemann danke ich für die Hilfe während der Promotion in physischer und geistiger Form, für die unvergessliche Zeit unserer Zusammenarbeit und für ihre Freundschaft. Dr. Norman Woller danke ich für die vielen konstruktiven immunologischen Ratschläge und für die Durchsicht dieser Arbeit. Zudem danke ich Sarah Knocke und Amanda Ernst für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Insgesamt möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe sowie bei dem gesamten Labor für die herzliche Aufnahme, die Unterstützung während der Arbeit und die schöne Zeit bedanken. Und nicht zu vergessen für die konstruktiven Diskussionen bei den Kaffeepausen: *“Science may never come up with a better office communication system than the coffee break.” Earl Wilson.*

Meinem Verlobten Pascal Meier danke ich von ganzem Herzen für seine unglaublich hilfreiche Unterstützung und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freuden für die Unterstützung während der Promotion.

9. Publikationen und Konferenzbeiträge

Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, **Brooks J**, Demir IE, Steiger K, Ribback S, Yevsa T, Woller N, Kloos A, Ostroumov D, Armbrrecht N, Manns MP, Dombrowski F, Saborowski M, Kleine M, Wirth TC, Oettle H, Ceyhan GO, Esposito I, Calvisi DF, Kubicka S, Kühnel F. Administration of Gemcitabine After Pancreatic Tumor Resection in Mice Induces an Antitumor Immune Response Mediated by Natural Killer Cells. . *Gastroenterology*. 2016; 151(2):338-350.e7.

Ann.: Teile dieser Publikation sind mit Erlaubnis des Verlages Elsevier in dieser Arbeit dargestellt und an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet.

Brooks J, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Niemann J, Ribback S, Peters K, Demir IE, Armbrrecht N, Ceyhan GO, Manns MP, Wirth TC, Kubicka S, Bernhardt G, Smyth MJ, Calvisi DF, Gürlevik E, Kühnel F. Perioperative, spatiotemporally coordinated activation of T and NK cells prevents recurrence of pancreatic cancer. *Cancer Research*. 2018; Jan 15; 78(2) 475-488. Epub 2017 Nov 27.

Ann.: Teile dieser Publikation sind in dieser Arbeit dargestellt und an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet. (Disclaimer: Translation accuracy is neither guaranteed nor implied. If any questions arise related to the accuracy of the information contained in the translation, see the English version of the AACR journal that is the Version of Record)

Vorträge

Combined blockade of PD1 and CD96 checkpoints leads to improved long-term survival after surgical resection of pancreatic adenocarcinoma in mice. (2017) Mildred Scheel cancer conference in Bonn, 14.-16. Juni 2017

Neoadjuvante Immuncheckpoint-Blockade verhindert effektiv Lokalrezidivierung durch gewebsspezifische antitumorale CD8⁺ CD103⁺ T Zellen. (2015) 35. DPC Kongress in Rostock, 22.–24. Januar 2015

Posterbeiträge

Brooks J., Fleischmann-Mundt B., Woller N., Demir I. E., Manns M.P., Ceyhan G.O., Kubicka S., Calvisi D.F., Gürlevik E., Kühnel F. (2017) Combination of PD1 and CD96 blockade improves survival in a resectable murine model of pancreatic cancer. pancreas spring meeting in Göttingen, 11-12 Mai 2017

Brooks J, Fleischmann-Mundt B, Woller N, Manns MP, Kubicka S, Gürlevik E, Kühnel F. (2016) Combined inhibition of PD1 and CD96 checkpoints improves survival in a resectable murine model of pancreatic cancer. 24th Biennial Congress of the EACR in Manchester, 9 - 12 July 2016, *European Journal of Cancer*, Vol.61,Supplement 1,(2016) S189, No. 825

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Jennifer Brooks

Staatsangehörigkeit deutsch

Geburtsdatum und -ort 22.12.1988 in Neustadt am Rbg.

Berufserfahrungen

seit 01/01/2014 Naturwissenschaftliche Doktorandin
an der Medizinischen Hochschule Hannover,
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und
Endokrinologie

01/10/2012-31/12/2012 wissenschaftliche Hilfskraft
an der Medizinischen Hochschule Hannover

01/10/2011-31/10/2011 wissenschaftliche Hilfskraft
an der Medizinischen Hochschule Hannover

01/01/2011-28/02/2011 studentische Hilfskraft
an der Medizinischen Hochschule Hannover

Studium

10/2011-10/2013 Studium der Biochemie
an der Medizinischen Hochschule Hannover
Abschluss: Master of Science

10/2008-09/2011 Studium der Biochemie
an der Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Bachelor of Science

Schulische Ausbildung

2001-2008 Marion-Dönhoff-Gymnasium in Nienburg
Abschluss: Abitur

1999-2001 Orientierungsstufe Nienburg

1995-1999 Grundschule Langendamm