Einfluss der Cyclin-abhängigen Kinase 5 auf die Expression des Programmed Cell Death Ligand 1 in murinen Pankreaskarzinomen im Vergleich verschiedener Analysemethoden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Marcel Mann

aus Köln

2023

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

- 1. Gutachter: PD Dr. med. Georg Feldmann
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ralph Alexander Bundschuh

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.02.2023

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III für Onkologie, Hämatologie, Immunonkologie und Rheumatologie Direktor: Prof. Dr. med. Peter Brossart

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	. 14
1.1	Duktales Adenokarzinom des Pankreas	. 14
1.2	Das duktale Adenokarzinom des Pankreas im Kontext der	
Immun	checkpointinhibition	. 17
1.3	Ziele der Studie	. 24
2. Ma	terial und Methoden	. 26
2.1	Zellkultur	. 26
2.1.1	Verwendete Zelllinien	. 26
2.1.2	Material und Reagenzien für die Zellkultur	. 28
2.1.3	Zellkultur mittels kryokonservierter Zelllinienaliquoten	. 30
2.1.4	Passagieren der Zelllinien	. 30
2.1.5	Zellpelletextraktation für Proteinanalysen	. 31
2.1.6	Kryokonservierung der Zelllinien	. 31
2.1.7	Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	. 32
2.1.8	Material und Reagenzien für den Bicinchoninsäure-Assay	. 32
2.1.9	Quantifizierung des Proteingehalts mittels BCA-Assay	. 34
2.2	Western Blot	. 36
2.2.1	Material und Reagenzien für den Western Blot	. 36
2.2.2	Gelpräparation	. 41
2.2.3	Vorbereitung der Proteinproben	. 42
2.2.4	Expressionsdetektion von PD-L1	. 42
2.2.5	Expressionsdetektion von CDK5	. 45
2.3	Mausmodelle duktaler Adenokarzinome des Pankreas	. 46
2.3.1	KPC-Mausmodell – LSL-Kras ^{G12D} ; LSL-Trp53 ^{R172H} ; PDX1-Cre	. 46

2.3.2	KPCC-Mausmodell – LSL-Kras ^{G12D} ; LSL-Trp53 ^{R172H} ; PDX1-Cre; CDK5 fl/fl 47
2.3.3	Feststellung über die Zuchtgenehmigung genmodifizierter Mauslinien
2.4	Immunhistochemie
2.4.1	Gewinn der duktalen Adenokarzinome des Pankreas49
2.4.2	Einbettung in Paraffin
2.4.3	Erzeugung von Paraffinserienschnitten mittels Mikrotom51
2.4.4	Immunhistochemische Färbung der Präparate52
2.5	Histologische Auswertung56
2.5.1	Feldauswahl und Fotodokumentation56
2.5.2	Vierstufige manuelle Klassifikation59
2.5.3	Zweistufige manuelle Klassifikation61
2.5.4	Zweistufige maschinelle Klassifikation62
3. Erg	gebnisse
3.1	Ergebnisgrafiken des Western Blots73
3.1.1	PD-L1-Expressionsprofil in PDAC-Zelllinien im Western Blot73
3.1.2	CDK5-Expressionsprofil in PDAC-Zelllinien im Western Blot
3.1.3	Relative Expression von PD-L1 und CKD5 im Western Blot im Vergleich75
3.2	Ergebnisgrafiken der histologischen Analysemethoden77
3.2.1	Ergebnisgrafiken der vierstufigen manuellen Klassifikation77
3.2.2	Ergebnisgrafiken der zweistufigen manuellen Klassifikation
3.2.3	Ergebnisgrafiken der zweistufigen maschinellen Klassifikation
3.2.4	Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen
3.2.5	Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen 106
3.2.6	Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen
3.2.7	Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen112
3.2.8	Vergleich von zweistufiger manueller Klassifikation und zweistufiger
masch	ineller Klassifikation (IHC Profiler)115

4.	Diskussion	119
4.1	Vergleich von CDK5- und PD-L1-Expression im Kontext verschiedener	
Ana	lysemethoden	119
4.2	Ausblick	133
5.	Zusammenfassung	134
6.	Abbildungsverzeichnis	136
7.	Tabellenverzeichnis	139
8.	Literaturverzeichnis	141
9.	Danksagung	156

Abkürzungsverzeichnis

4IPBA	4-lodophenylboronsäure
	(4-lodophenylboronic Acid)
Ab	Antikörper
	(Antibody)
Akt	Akt-Kinase, Proteinkinase B
APC	Antigenpräsentierende Zelle
	(Antigen Presenting Cell)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B7-H1	B7 Homolog 1, synonym mit "PD-L1"
BCA	Bicinchoninsäure
	(Bicinchoninic Acid)
BRCA1	Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Protein 1
BRCA2	Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Protein 2
BSA	Bovines Serumalbumin
СВ	Citratpuffer
	(Citrate Buffer)
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
	(Cyclin-Dependent Kinase)
CDK1	Cyclin-abhängige Kinase 1
	(Cyclin-Dependent Kinase 1)
CDK2	Cyclin-abhängige Kinase 2
	(Cyclin-Dependent Kinase 2)

CDK5	Cyclin-abhängige Kinase 5
	(Cyclin-Dependent Kinase 5)
CDK5 fl/fl	Homozygot vorliegendes gefloxtes Gen des CDK5-Gens
CDK5 WT	Wildtyp für CDK5
CDK9	Cyclin-abhängige Kinase 9
	(Cyclin-Dependent Kinase 9)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
	(Complementary Deoxyribonucleic Acid)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CRC	Kolorektales Karzinom
	(Colorectal Cancer)
Cre	Cre-Rekombinase, ein Enzym aus dem Bakteriophagen P1 (Causes Recombination)
CRISPR/Cas9	Gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen, CRISPR-assoziiertes Protein 9
	(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR-associated 9)
CTLA4	ZytotoxischesT-Lymphozyten-assoziiertesProtein4(Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4)
CXCL12	C-X-C-Motiv-Chemokin 12
	(C-X-C Motif Chemokine Ligand 12)
CXCR4	C-X-C-Chemokin-Rezeptor 4
Da	Dalton (Atomare Masseneinheit)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBPS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

dMMR	Mismatch-Reparatur-Defizienz
	(Deficient Mismatch Repair)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
	(Deoxyribonucleic Acid)
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz
	(Enhanced Chemiluminescence)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
	(Epidermal Growth Factor)
EGFR	EGF-Rezeptor, s. auch "EGF"
	(Epidermal Growth Factor Receptor)
FBS	Fetales Bovines Serum
fl	Kurzform, siehe "Floxed"
fl/fl	Homozygot vorliegendes Floxed-Gen, s. auch "Floxed"
Floxed	Flankiert von LoxP
	(Flanked by Lox P)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her2/neu	Humaner EGF-Rezeptor 2, s. auch "EGF" und "EGFR"
	(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales
	Karzinom, Lynch-Syndrom
	(Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer)
HPNE	Humane Pankreatische Nestin-Exprimierende Zellen, hier im Sinne von "hTERT-HPNE" verwendet

HRP	Meerrettichperoxidase
	(Horseradish Peroxidase)
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
hTERT-HPNE	Mittels hTERT immortalisierte HPNE-Zelllinie
ICT	Immuncheckpointtherapie
IFN-γ	Interferon-y
lg	Immunglobulin
lgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IPA	Isopropylalkohol, Isopropanol, 2-Propanol
IRF1	Interferon-Regulationsfaktor 1
IRF2	Interferon-Regulationsfaktor 2
IRF2BP	Interferon-Regulationsfaktor-2-bindendes Protein
ISO	Internationale Organisation für Normung
	(International Organization for Standardization)
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton, s. auch "Da"
KPC	Genotypkonstellation: LSL-Kras ^{G12D} ; LSL-Trp53 ^{R172H} ; PDX1- Cre
KPCC	Genotypkonstellation: LSL-Kras ^{G12D} ; LSL-Trp53 ^{R172H} ; PDX1- Cre; CDK5 fl/fl
Kras	Kirsten Ratten-Sarkom-Virus-Onkogen-Homolog
	(Kirsten RAt Sarcoma Viral Oncogene Homolog)
Kras ^{G12D}	Mutiertes Kras-Onkogen: Austausch der Aminosäure Glycin mit Aspartat in Codon 12
KZKM	Komplettes Zellkulturmedium, s. auch Tab. 4
LDH	Laktatdehydrogenase

LoxP	LoxP-DNA-Sequenz
	(Locus Of X-over P1)
LSL	LoxP-Stopcodon-LoxP-DNA-Sequenz
mAb	Monoklonaler Antikörper
	(Monoclonal AntiBody)
MEK	Methylethylketon, Butanon
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
	(Major Histocompatibility Complex)
MLH1	MutL Homolog 1
MLH3	MutL Homolog 3
MMR	Mismatch-Reparatur
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
	(Messenger RiboNucleic Acid)
MSH2	MutS Homolog 2
MSH3	MutS Homolog 3
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Hohe Mikrosatelliteninstabilität
	(MSI-High)
MSI-L	Niedrige Mikrosatelliteninstabilität
	(MSI-Low)
MSS	Mikrosatellitenstabil
NET	Neuroendokriner Tumor
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
	(Non-Small-Cell Lung Carcinoma)
p35	Co-Aktivator von CDK5, s. auch "CDK5"

p39	Co-Aktivator von CDK5, s. auch "CDK5"
p53	Tumorsuppressorprotein p53, synonym mit "Trp53",
	s. auch "Trp53"
PALB2	Partner und Lokalisierer von BRCA2, s. auch "BRCA2"
	(Partner And Localizer of BRCA2)
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	(Polymerase Chain Reaction)
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
	(Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma)
PD-L1, PDL1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1, synonym mit "B7-H1"
PD-L2, PDL2	Programmed Cell Death 1 Ligand 2
PDX1	Pankreatische und Duodenale Homöobox 1
	(Pancreatic and Duodenal homeoboX 1)
PDX1-Cre	PDX1-Cre-DNA-Sequenz
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
	(Pharmacopoea Europaea)
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinase
PMS1	Postmeiotische Segregation erhöht 1
	(PostMeiotic Segregation increased 1)
PMS2	Postmeiotische Segregation erhöht 2
	(PostMeiotic Segregation increased 2)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRSS1	Serinprotease 1
R	Korrelationskoeffizient

R (WT)	Korrelationskoeffizient der CDK5- und PD-L1-Expression der KPC-Mauspopulation, s. auch "KPC"
R (fl/fl)	Korrelationskoeffizient der CDK5- und PD-L1-Expression der KPCC-Mauspopulation, s. auch "KPCC"
Ras	GTPase Ras, s. auch "GTP"
RalA	Ras like Proto-Oncogene A
RalB	Ras like Proto-Oncogene B
RCF	Relative Zentrifugalkraft
	(Relative Centrifugal Force)
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
	(Radioimmunoprecipitation Assay)
RIPA Plus	Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung aus Zellpellets sowie zur Vorbereitung der Proben für den Western Blot, beinhaltet u.a. "RIPA", s. auch Tab. 6
RH	Relative Luftfeuchtigkeit
	(Relative Humidity)
RPM	Umdrehungen pro Minute
	(Revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
	(Standard Deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
	(Sodium Dodecyl Sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
	(Standard Error of the Mean)
shRNA	Short Hairpin RNA
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription

TBS	TBS-Puffer
	(TRIS-Buffered Saline)
TBST	TBS-Tween [®] -0,1-%-Puffer, s. auch "TBS"
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIL	Tumorinfiltrierender Lymphozyt
ТМЕ	Tumormikromilieu
	(Tumor MicroEnvironment)
T.Puffer	TRIS-Puffer, s. auch "TRIS"
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp53	Transformation Related Protein 53, synonym mit "p53", s. auch "p53"
Trp53 ^{R172H}	Mutiertes Tumorsuppressorprotein Trp53: Austausch der Aminosäure Arginin mit Histidin im Codon 172
USP	Arzneibuch der Vereinigten Staaten von Amerika (United States Pharmacopeia)
ZKM	Zellkulturmedium

1. Einleitung

1.1 Duktales Adenokarzinom des Pankreas

Duktale Adenokarzinome des Pankreas (PDAC) bilden den Hauptteil der bösartigen Tumoren des Pankreas. Für das Jahr 2019 wurden etwa 57.000 neue bösartige Pankreastumoren in den USA erwartet, wovon ca. 93 % dem exokrinen Pankreas und ca. 7 % den neuroendokrinen Tumoren (NET) des Pankreas zugehörig sein sollten. Erwartet wurden zeitgleich etwa 46.000 Pankreastumor-assoziierte Todesfälle in den USA (American Cancer Society, 2019 a). Unter den bösartigen Tumoren bilden Pankreastumoren weltweit mit jährlich ca. 338.000 neuaufgetretenen Erkrankungen geschlechtsübergreifend die vierthäufigste Tumorengruppe des Gastrointestinaltraktes nach Kolorektal-, Magen- und Lebertumoren (Abb. 1). Es besteht eine identische relative jährliche Inzidenz von ca. 2,4 % für Pankreastumoren unter allen bösartigen Tumoren für beide Geschlechter. Die numerische Inzidenz für Männer ist mit 178.000 Neuerkrankungen gegenüber Frauen mit 160.000 Neuerkrankungen pro Jahr leicht erhöht. Unter 27 getesteten Hauptentitäten bösartiger Tumoren besaßen Pankreastumoren das weltweit geschlechtsübergreifend gemittelt höchste Mortalität/Inzidenz-Verhältnis aller Tumoren (Ferlay et al., 2015). 60-70 % der Tumoren sind im Bereich des Pankreaskopfes lokalisiert, 20-25 % im Bereich von Corpus und Cauda, die restlichen 10-20 % involvieren bereits das gesamte Organ bei Diagnosestellung (Modolell et al., 1999). Sogenannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) bezeichnen Übergangsstufen der sich dedifferenzierenden exokrinen Pankreasanteile bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms. Frühzeitig sind PanIN aktivierende Punktmutationen des Kras-Protoonkogens sowie eine Überexpression von Her2/neu-Genprodukten nachweisbar. Her2/neu zählt zur Familie der EGF-Rezeptoren. Genetische Veränderungen des Kras-Signalweges konnten bei mehr als 90 % der Pankreaskarzinome nachgewiesen werden (Hruban et al., 2000; Jones et al., 2008). Zigarettenkonsum bildet einen starken epidemiologischen Risikofaktor und verdoppelt die Auftretenswahrscheinlichkeit etwa von Pankreaskarzinomen im Vergleich zu stetigen Nichtrauchern. Daneben bilden auch der nichtinhalative Tabakkonsum, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und eine familiäre

Vorbelastung weitere Risikofaktoren. Chronische Pankreatitiden fördern ebenfalls das vermehrte Auftreten von Pankreaskarzinomen. Auch übermäßiger Alkoholkonsum scheint zu einer Risikovermehrung beizutragen. Desweiteren erhöhen genetische Syndrome wie Lynch-Syndrom (HNPCC), Peutz-Jeghers-Syndrom, Genmutationen von BRCA1, BRCA2 und PALB2 (Hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinome) sowie PRSS1 (Hereditäre Pankreatitis) die Lebenszeitprävalenz für Pankreaskarzinome. Nur selten treten Frühsymptome im Rahmen eines Pankreaskarzinoms auf. Mögliche Symptome in fortgeschrittenen Stadien sind Gewichtsverlust, abdominale Beschwerden, starke Bauchschmerzen, Ikterus, das Neuauftreten eines Diabetes mellitus, Übelkeit und Erbrechen. Die Bauchschmerzen strahlen ggf. gürtelförmig in den Rücken aus. Eine rasche lymphogene sowie hämatogene Metastasierung gepaart mit oft fehlenden Frühsymptomen führen häufig zu einer späten Diagnosestellung bei bereits über die Bauchspeicheldrüse hinweg ausgebreiteter Erkrankung. Eine möglicherweise kurative Therapie in Form operativer Resektion kommt daher für weniger als 20 % aller Patienten in Betracht (American Cancer Society, 2019 a; American Cancer Society, 2019 b). Selbst innerhalb dieser selektiven Patientengruppe kommt es aufgrund bereits häufig vorhandener unerkannter Mikrometastasen im weiteren Verlauf nahezu immer zu einem Lokalrezidiv oder zu Fernmetastasenbildung, weshalb die Patienten letztlich den Folgen des malignen Wachstums erliegen (Carpelan-Holmström et al., 2005). Chemotherapie (z.B. mit Gemcitabin) und Bestrahlungstherapie können alternativ das Überleben verlängern oder auch postoperativ das Remissionsrisiko verringern. Zuletzt erwies sich eine Chemotherapie mittels eines modifizierten FOLFIRINOX-Regimes (5-Fluoruracil, Leucovorin, Irinotecan, Oxaliplatin) gegenüber alleiniger Gemcitabintherapie im Bezug auf Gesamtüberleben bei metastasierter Erkrankung, Krankheitsprogression, objektives Therapieansprechen sowie postoperative remissionsfreie Zeit als überlegen. Zugleich zeigten Patienten unter FOLFIRINOX-Therapie häufiger schwere Nebenwirkungen und geminderte Lebensqualität. Auch gezielte Krebstherapien oder Immuntherapien sind bereits Gegenstand klinischer Studien (American Cancer Society, 2019 a; American Cancer Society, 2019 b; American Cancer Society, 2019 c; Conroy et al., 2011; Conroy et al., 2018). Die Schwere der Erkrankung führt bei annähernd identischen Inzidenz- und Mortalitätsraten (Abb. 1; Ferlay et al., 2015) zu 5-Jahresüberlebensraten von 5 bis 15 % unter Zusammenfassung aller Erkrankungsstufen (Allemani et al., 2018). In den USA betrug die 5-Jahresüberlebensrate von 2007 bis 2013 gemittelt über alle Erkrankungsstufen ca. 9 %, für lokal fortgeschrittene Tumoren ca. 34 %, für regional fortgeschrittene Tumoren ca. 12 % und für fernmetastasierte Tumoren ca. 3 % (American Cancer Society, 2019 a).



Abb. 1: Inzidenz, Mortalität und Mortalität/Inzidenz-Verhältnis bösartiger gastrointestinaler Tumoren weltweit nach Ferlay et al. (2015): A) Inzidenz und Mortalität bösartiger gastrointestinaler Tumoren: Im Jahr 2012 bestand weltweit die höchste Inzidenz bösartiger gastrointestinaler Tumoren für kolorektale Tumoren, absteigend gefolgt von Magen-, Leber-, Pankreas- und Gallenblasentumoren. Im gleichen Jahr führten Lebertumoren die weltweite Mortalität der bösartigen gastrointestinalen Tumoren an, absteigend gefolgt von Magen-, Kolorektal-, Pankreas- und Gallenblasentumoren. B) Mortalität/Inzidenz-Verhältnis bösartiger gastrointestinaler Tumoren: Im Jahr 2012 bestand weltweit das höchste Mortalität/Inzidenz-Verhältnis (M:I-Verhältnis) bösartiger gastrointestinaler Tumoren für Pankreastumoren, absteigend gefolgt von Leber-, Gallenblasen-, Magen- und Kolorektaltumoren.

1.2 Das duktale Adenokarzinom des Pankreas im Kontext der Immuncheckpointinhibition

Wie eingangs erläutert (vgl. 1.1) sind die Langzeitüberlebensraten duktaler Adenokarzinome des Pankreas bei begrenzten Therapieoptionen limitiert. Effektivere bzw. ausgedehntere Therapieregime gehen mit vermehrten Nebenwirkungen und geminderter Lebensqualität einher (Conroy et al., 2011; Conroy et al., 2018). Auch einer potentiell kurativen Operation mit R0-Resektion folgt letztlich zumeist doch ein Rezidiv (Carpelan-Holmström al., 2005). et Entsprechend dienen gegenwärtige Forschungsbemühungen einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie und der Etablierung neuer Therapieoptionen.

Dem im Allgemeinen schlechten Ansprechen des Pankreaskarzinoms auf Chemotherapeutika liegt häufig ein verändertes Tumormikromilieu (TME) zugrunde (Liu et al., 2017; Zheng et al., 2013). Für diverse Tumorentitäten wurde bereits die Oberflächenexpression immuninhibitorischer Moleküle wie PD-L1 (Programmed Cell Death Ligand 1) nachgewiesen, welches über Interaktion mit dem zugehörigen Rezeptor PD1 (Programmed Cell Death Protein 1) die Funktionsfähigkeit lokaler Immunzellen beeinträchtigt oder bestimmte Immunzellpopulationen in die Apoptose drängt (Pardoll, 2012; Birnbaum et al., 2016). Regulär ist PD-L1 als Oberflächenmolekül vornehmlich auf diversen Immunzellen, u.a. auf B- und T-Lymphozyten sowie auf dendritischen Zellen, exprimiert. Durch die abschwächende Wirkung auf das Immunsystem verhindert die PD1-PD-L1-Interaktion eine Überstimulation des Immunsystems und trägt so zur peripheren Immuntoleranz bei (Keir et al., 2006; Latchman et al., 2004). Eine Beeinträchtigung dieses Signalweges durch genetische Modifikation führte zuvor bereits zu autoimmunähnlichen Erkrankungen ähnlich Lupus und autoimmuner dilatativer Kardiomyopathie (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001). Einige Immuncheckpointinhibitoren (z.B. PD1- oder PD-L1-Inhibitoren) greifen an der PD1-PD-L1-Schnittstelle an. Das Ziel hierbei besteht darin, die immuninhibitorische Wirkung von PD-L1 auf der Tumoroberfläche zu unterbinden und lokal reaktiv eine verstärkte antitumorale Immunreaktion hervorzurufen. Immuncheckpointinhibitoren zeigten u.a. ein objektives Ansprechen und Verbesserungen des klinischen Verlaufs bei Patienten mit malignem Melanom, nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), Nierenzellkarzinom,

und Ovarialkarzinom (Brahmer et al., 2010; Brahmer et al., 2012; Larkin et al., 2015; Ohaegbulam et al., 2015; Topalian et al., 2012). Bereits seit einiger Zeit sind sie daher als Therapieoptionen für das metastasierte maligne Melanom sowie für das fortgeschrittene nichtkleinzellige Lungenkarzinom etabliert und für diverse weitere Krebsentitäten (u.a. Kopf-Hals-Tumoren, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, hämatoonkologische Tumoren, Kolorektalkarzinom) Gegenstand klinischer Forschung (Lipson et al., 2015).

Auch für das Pankreaskarzinom kommen Immuntherapien mittels PD1- oder PD-L1-Inhibitoren grundsätzlich in Betracht. So wurde in einer Studie retrospektiv die mRNA-Expression für PD-L1 anhand von 453 Pankreaskarzinomproben untersucht. In 19 % der Fälle war PD-L1 hochreguliert. Das vermehrte Vorkommen von PD-L1 war assoziiert mit verkürztem krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben sowie einem tumorbegünstigenden TME. Es zeigten sich unter vermehrter PD-L1-Expression Molekülanreicherungen als Ausdruck lymphozytärer Erschöpfung und Immuninhibition tumorbegünstigende Immunzellpopulationen sowie (u.a. PD1), eine MHC-I-Herabregulation. Letztere führe laut den Autoren womöglich zu Problemen bei Antigenprozessierung und -präsentation. Eine Inhibition des PD1-PD-L1-Signalweges führe konsekutiv vermutlich zu einer verstärkten antitumoralen Immunantwort in PD-L1überexprimierenden Tumoren (Birnbaum et al., 2016). Macherla et al. (2018) verglichen die Studie Birnbaums et al. (2016) mit fünf weiteren Studien, bei denen die PD-L1-Positivraten in Pankreastumoren (ermittelt mittels IHC und/oder mRNA-Analysen) zwischen 39 % und 55 % lagen. Eine gesteigerte PD-L1-Expression wirkte sich stets negativ auf die Prognose des humanen Pankreaskarzinoms aus und zeigte negative Auswirkungen auf die antitumorale Immunabwehr (Birnbaum et al., 2016; Chen et al., 2009; Geng et al., 2008; Loos et al., 2008; Nomi et al., 2007; Wang et al., 2010).

Eine gesteigerte PD-L1-Expression trägt damit beim Pankreaskarzinom zu einem tumorfördernden TME bei. Dennoch ist sie derzeit Gegenstand einer kontroversen Diskussion. So wird eine gesteigerte PD-L1-Expression von einigen Autoren als verstärkte Abwehrreaktion der Tumorzellen auf eine bereits stattfindende Immunantwort erachtet (Topalian et al., 2016). Und tatsächlich ist eine gesteigerte PD-L1-Expression bei einigen Krebsentitäten (NSCLC, Melanom, Lungenkarzinom, Merkelzellkarzinom) mit einer verstärkten Invasion tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) sowie mit einem

verbesserten Gesamtüberleben bzw. einem verlängerten tumorfreien Überleben assoziiert (Taube et al., 2012; Lipson et al., 2013 b; Velcheti et al., 2014; Schalper et. al, 2014; Cimino-Mathews et al., 2016). Wang et al. (2016) führten die kontroversen Aussagen der diversen Forschungsgruppen zusammen. Hierbei zeigte sich ein ambivalentes Bild: Einige Krebsentitäten zeigten unter gesteigerter PD-L1-Expression eine verbesserte Prognose (Mamma- und Merkelzellkarzinom), eine verschlechterte Prognose (Pankreas-, Magen-, Ösophagus-, Nierenzell-, Ovarial-, Harnblasenkarzinom sowie hepatozelluläres Karzinom) oder studienabhängig negative sowie positive prognostische Tendenzen (Malignes Melanom, Lungen- und Kolorektalkarzinom).

Die Annahme, dass Immuncheckpointinhibitoren der PD1-PD-L1-Schnittstelle auch beim Pankreaskarzinom zu einer verbesserten antitumoralen Therapie beitragen können, wird gestützt durch weitere Beobachtungen: Sogenannte Immuncheckpoint-Fallen ("Traps" sind Moleküle, die mit hoher Affinität ihre Zielmoleküle binden und zunächst indirekt als kodierendes DNA-Plasmid per Injektion in den Organismus eingebracht werden) führten zu einer verbesserten Tumorinvasion von T-Zellen und so zu einer gestärkten antitumoralen Immunantwort. Die kombinierte Applikation von PD-L1- sowie CXCL12-Fallen (C-X-C-Motiv-Chemokin 12) führte zu Tumorrückgang und signifikanter Fernmetastasenreduktion sowie prolongiertem Überleben. Die Autoren führten die gesteigerte Effektivität der Kombinationstherapie auf eine stärkere Veränderung des TME zurück (Miao et al., 2017). Zuvor war CXCL12 bereits als relevanter Faktor für ein tumorförderndes Mikromilieu ausgemacht worden: CXCL12 wird hauptsächlich von Tumor-assoziierten Fibroblasten sezerniert. Es zeigte sich, dass PDAC-Zellen von CXCL12-Molekülen überzogen und T-Zellen im Bereich des Tumors weitgehend abwesend waren. Die Applikation von Plerifaxor (AMD3100), einem CXCR4-Inhibitor (C-X-C-Chemokin-Rezeptor 4), führte zu einer T-Zell-Anreicherung im Bereich des Tumors und unter Kombination mit einem PD-L1-Inhibitor zu Tumorrückgang im Mausmodell (Feig et al., 2013).

Die TME-assoziierte geringe Wirksamkeit von Monotherapien beim Pankreaskarzinom führt derzeit zur Testung neuartiger Therapiekonzepte z.B. in Form einer Kombination mehrerer Immuncheckpointinhibitoren, der Kombination dieser mit Gemcitabin, anderer Chemotherapieregime wie FOLFIRINOX, der Applikation neuartiger inhibitorischer Moleküle (PI3K-, JAK-STAT-Inhibitoren) oder einer immunzellstimulierenden Vakzine (GVAX) (Conroy et al., 2018; Guo et al., 2017; Johansson et al., 2016). Zuvor zeigte sich bereits eine statistisch signifikante Überlegenheit einer Kombinationstherapie bestehend aus PD-L1-Antikörper und Gemcitabin gegenüber beiden Substanzen als Monotherapie in einem murinen Pankreaskarzinommodell. Im Übrigen waren PD-L1-Antikörper als Monotherapie ähnlich effektiv (Nomi et al., 2007).

konnte eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mit einem Daneben verbesserten Ansprechen von Immuncheckpointinhibitoren in Verbindung gebracht werden. Defekte des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems (dMMR) oder Funktionsverlust der Mismatch-Reparatur-Proteine (u.a. MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 und PMS2) führen zu gesteigerter Mutationslast in Mikrosatelliten (kurze repetitive DNA-Sequenzen, die anfällig für DNA-Replikationsfehler sind) (Macherla et al., 2018; Silva et al., 2009; Vasen et al., 1999; Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2016). Bereits beim Kolorektalkarzinom (CRC) führten Immuncheckpointinhibitoren zunächst oft nicht zum gewünschten therapeutischen Erfolg (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012). Jedoch konnte hier die selektive Wirksamkeit für Personen mit MSI oder dMMR, wie sie z.B. beim Lynch-Syndrom (HNPCC) vorliegen, ermittelt werden: Ein CRC-Patient, der zuvor positiv auf eine Therapie mit Nivolumab (PD-1-Antikörper) reagiert hatte (Brahmer et al., 2010), konnte mit einer MSI in Verbindung gebracht werden (Lipson et al., 2013) a). Ein therapeutischer Vergleich mit Pembrolizumab (PD-1-Antikörper) erhärtete diese Annahme: CRC-Patienten mit dMMR zeigten eine progessionsfreie Überlebensrate von 78 % nach 20 Wochen, CRC-Patienten ohne dMMR hingegen von nur 11 %. Zusätzlich zeigte sich eine progressionsfreie Überlebensrate nach 20 Wochen von 67 % bei Krebsentitäten mit dMMR, die keine CRCs waren (Le et al., 2015). Eine MSI oder dMMR konnte beim Pankreaskarzinom in 0,8 % (n = 833) (Hu et al., 2017) bzw. 22 % (n = 109) der Fälle (Eatrides et al., 2016) ausgemacht werden. Die starken Unterschiede des Anteils an Pankreaskarzinomen mit MSI bzw. dMMR seien am ehesten zu begründen in Unterschieden der Histologie, Stichprobengröße sowie der Verwendung verschiedener (Next-Generation-Sequenzierung bzw. Gewebemikroarray) und nichtstandardisierter Detektionsverfahren (Macherla et al., 2018). Weitere Untersuchungen an soliden Tumoren (inkl. Pankreaskarzinomen) mit MSI bzw. dMMR zeigten ebenfalls ein objektives Therapieansprechen einer Immuncheckpointinhibition von ca. 40 bis 55 % (Le et al., 2017; Lemery et al., 2017; U.S. Food and Drug Administration, 2017).

Einhergehend mit derartigen Beobachtungen wurde der PD-1-Antikörper Pembrolizumab (Keytruda[®]) für die Therapie des fortgeschrittenen PDAC sowie anderer solider Tumoren mit hoher MSI (MSI-H) bzw. dMMR zugelassen. Im Rahmen der zugrundeliegenden Therapiestudie zeigten 83 % der involvierten Patienten mit Pankreaskarzinomen (n = 6) ein objektives Therapieansprechen (Lemery et al., 2017; National Comprehensive Cancer Network, 2017; U.S. Food and Drug Administration, 2017).

Ein weiteres interessantes Molekül mit Blick auf therapeutische Immuncheckpointmodulation bildet CDK5 (Cyclin-abhängige Kinase 5). CDK5 stellt eine atypische CDK dar und besitzt Funktionen in Zellmigration sowie neuronaler Entwicklung. Dorand et al. (2016) wiesen im Medulloblastom-Mausmodell eine CDK5abhängige PD-L1-Hochregulation nach, die die antitumorale Immunabwehr negativ beeinflusste. Umgekehrt führte eine verringerte CDK5-Aktivität auch zu einer verringerten PD-L1-Expression und verstärkte so indirekt die antitumorale Immunantwort (Haupteffektorzellen waren CD4-positive T-Zellen), welche sich in längerem tumorfreien Überleben sowie signifikant kleineren Tumoren äußerte (Abb. 2).



Abb. 2: CDK5-abhängige Expression des Programmed Cell Death Ligand 1 nach Dorand et al. (2016): A) Interferon-γ (IFN-γ) bedingt eine CDK5-abhängige

Hochregulation von PD-L1. IFN-γ fördert die Expression von IRF1 (Interferon-Regulationsfaktor 1), der seinerseits aktivierend am Promotor der Gentranskription für PD-L1 wirkt. Vermehrte PD-L1-Expression führte zur Beeinträchtigung der antitumoralen Immunabwehr. Überdies fördert IFN-γ die Expression von p35, einem der Co-Aktivatoren von CDK5 (Der et al., 1998; Dorand et al., 2016; Harada et al., 1989; Lee et al., 2006; Song et al., 2005). B) Dorand et al. blockierten die CDK5-Aktivität mittels shRNA (Short hairpin RNA) sowie CRISPR-Cas9-Zielmutation. Dies führte über posttranslationale Modifikation von IRF2BP2 (Interferon-Regulationsfaktor-2-bindendes Protein) zu einem vermehrten Anstieg von IRF2 wie auch IRF2BP2 selbst. IRF2 wirkt inhibierend am Promotor der PD-L1-Gentranskription, IRF2BP2 bildet den Co-Repressor von IRF2. Konsekutiv zeigte sich eine verringerte PD-L1-Expression und damit einhergehend eine verbesserte antitumorale Immunantwort (Childs und Goodbourn, 2003; Dorand et al., 2016; Harada et al., 1989).

CDK5-Blockade in Rhabdomyosarkomen führte ebenfalls zu einer verringerten IFN-γinduzierten PD-L1-Hochregulationen, was die Autoren zur Annahme brachte, dass die CDK5-abhängige IFN-y-vermittelte PD-L1-Hochregulation nicht Medulloblastomspezifisch sei (Dorand et al., 2016). Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass eine CDK5-abhängige PD-L1-Expression auch in dendritischen Zellen der nasalen Mukosa vorkommt. Es zeigte sich eine positive Korrelation der Expressionen sowie eine zelluläre Kolokalisation beider Moleküle beim Menschen. Zudem war CDK5 bei der Zellreifung der dendritischen Zellen von Bedeutung (Liu et al., 2019). Einhergehend mit diesen Beobachtungen entwickelten Forscher ein CRISPR-Cas9-basiertes Genom-Editing-System mit dem Ziel eines spezifischen Knock-Outs von CDK5 in vivo. Das CDK5-Knock-Out führte zu Wachstumshemmung muriner maligner Melanome, Lungenmetastasenreduktion muriner Triple-negativer Mammakarzinome (Xenotransplantationsmodell durch Zellinokulation) sowie signifikantem Expressionsrückgang von PD-L1 auf Tumorzellen. Überdies wurde die antitumorale Antwort durch einen signifikanten Anstieg von CD8-positiven T-Zellen sowie die Reduktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) verbessert. IRF2 und IRF2BP2 waren unter CDK5-Knock-Out hierbei ebenfalls hochreguliert (Deng et al., 2019).

Auch für das Pankreaskarzinom gibt es Indizien, dass eine CDK5-Inhibition möglicherweise an einer verbesserten antitumoralen Immunantwort beteiligt ist:

Feldmann et al. (2010) beschrieben eine Ras-CDK5-Ral-Signalachse. RalA und RalB bilden Haupteffektormoleküle des Protoonkogens Kras, das in über 90 % der Pankreaskarzinome bereits frühzeitig mutiert ist (Hruban et al., 2000; Jones et al., 2008). Feldmann et al. (2010) zeigten, dass die Applikation von Dinaciclib (Inhibition von CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9) in einem murinen Xenotransplantationsmodell des Rückgang Pankreaskarzinoms in vivo zu signifikantem des subkutanen Tumorwachstums sowie zu einer reduzierten Metastasenbildung führte. Auch in vitro kam es zu signifikanter Reduktion von Zellwachstum, Zellmotilität und Kolonieformierung. Die Kombination von Dinaciclib mit Gemcitabin war zudem signifikant effektiver als beide Substanzen in Monotherapie (Feldmann et al., 2011). Auch bei der Bekämpfung humaner Pankreaskarzinome zeigte sich Dinaciclib als vielversprechend: Im Rahmen eines murinen Xenotransplantationsmodells mittels Tumorgewebe von acht Patienten führte die kombinierte Gabe von Dinaciclib sowie dem Akt-Inhibitor MK-2206 zu starker Wachstumshemmung des Tumors und Metastasenreduktion. Basierend darauf wurde eine Phase-I-Studie für die Kombinationstherapie von Dinaciclib mit MK-2206 eingeleitet (Hu et al., 2015).

Die beschriebene CDK5-abhängige PD-L1-Hochregulation (Abb. 2, Deng et al., 2019; Dorand et al., 2016; Liu et al., 2019) ist folglich auch im Kontext des duktalen Adenokarzinoms des Pankreas von wissenschaftlichem Interesse und wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit in vitro anhand von PDAC-Zelllinien sowie in vivo anhand genmodifizierter Mauslinien analysiert.

1.3 Ziele der Studie

Die Vermutung Dorands et al. (2016), dass die CDK5-abhängige IFN-y-vermittelte PD-L1-Hochregulation (Abb. 2 A) nicht spezifisch für das Medulloblastom sei, scheint sich zu bewahrheiten (Deng et al., 2019; Liu et al., 2019). Wie zuvor erläutert, stellt PD-L1 im Kontext eines tumorfördernden Mikromilieus ein überwiegend immuninhibitorisches Molekül dar (vgl. 1.2; Pardoll, 2012; Birnbaum et al., 2016), das somit einen therapeutischen Angriffspunkt zur reaktiv verbesserten antitumoralen Immunabwehr bildet. Sollte sich die Annahme Dorands et al. bewahrheiten und PD-L1 in weiteren Tumorentitäten CDK5-abhängig hochreguliert werden, böte auch CDK5 ein potentes Angriffsziel für spezifische Inhibitoren. Durch die Hemmung von CDK5 würde weniger PD-L1 exprimiert und die antitumorale Immunantwort so indirekt verbessert (Abb. 2 B). Das Hauptziel dieser Dissertationsarbeit bestand – basierend auf angeführter These – darin, eine gesteigerte PD-L1-Expression unter vermehrter CDK5-Expression bzw. eine verringerte PD-L1-Expression unter verringerter CDK5-Expression auch für das duktale Adenokarzinom des Pankreas nachzuweisen. Sollte sich diese Annahme bewahrheiten, würde sie eine Grundvoraussetzung für zukünftige Therapiestudien mit Fokus auf Immuncheckpointmodulation des PD1-PD-L1-Signalweges durch den Einsatz von CDK5-Inhibitoren bilden.

Um den Zusammenhang von CDK5- und PD-L1-Expression beim duktalen Adenokarzinom des Pankreas zu untersuchen, kultivierten wir sieben PDAC-Zelllinien (vgl. 2.1) und nutzten ein etabliertes Mausmodell (vgl. 2.3), bei dem zwei Mauslinien der Genotypen LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre (homozygoter Wildtyp für CDK5, nachfolgend als "KPC-Mauspopulation" bezeichnet, vgl. 2.3.1) bzw. LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; CDK5 fl/fl (homozygotes konditionelles Gen-Knockout für CDK5, nachfolgend als "KPCC-Mauspopulation" bezeichnet, vgl. 2.3.2) generiert wurden, die im Verlauf beide PDAC entwickelten.

Verglichen wurde die Expression von CDK5 und PD-L1 in vitro anhand der sieben PDAC-Zelllinien mittels Western Blot (vgl. 2.2) sowie in vivo mittels immunhistochemischer Färbungen für CDK5 und PD-L1 unter Vergleich der beiden Mauspopulationen (vgl. 2.4). Da in der KPCC-Mauspopulation ein – Cre-Rekombinase-vermitteltes – konditionelles homozygotes Knock-Out von CDK5 erfolgte (vgl. 2.3.2),

sollte der Erfolg des Knock-Outs mittels Immunhistochemie überprüft werden. Erwartungsgemäß sollte sich eine niedrigere CDK5-Aktivität in der KPCC-Mauspopulation (homozygotes konditionelles Gen-Knockout für CDK5) als in der KPC-Mauspopulation (Wildtyp für CDK5) zeigen. Zugleich sollten Unterschiede in der CDK5-Expression zwischen KPC- und KPCC-Testgruppe durch Analyse der CDK5-Expression in beiden Gruppen besser objektivierbar werden. Unterschiede in der CDK5-Expression beider Testgruppen sollten gemäß der Ausgangsthese mit einer konkordant veränderten PD-L1-Expression einhergehen.

Ein untergeordnetes Ziel bildete überdies der Vergleich verschiedener histologischer Analysemethoden bei der Auswertung der Proteinexpression in immunhistochemischen Färbungen. Hierzu erfolgten zwei Arten manueller Auswertung der erzeugten immunhistochemischen Präparate sowie eine Art der maschinellen Auswertung mit dem Programm IHC Profiler (vgl. 2.5).

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit führten wir die Zellkultivierung sieben verschiedener Zelllinien duktaler Adenokarzinome des Pankreas durch. Mittels Proteinextraktion wurden Proben für weitere Untersuchungen der Zelllinien mittels Western Blot gewonnen. Im Western Blot wurde später die Expression von CDK5 sowie PD-L1 für die einzelnen Zelllinien untersucht und verglichen.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

|--|

Zelllinie	Katalognummer/Referenz	Quelle	
AsPC-1	ATCC-CRL-1682	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	
Beschreibung: AsPC-1 bezei	ichnet eine adhärente PDAC	-Zelllinie, die aus malignem	
Aszites einer 62-jährigen Kaul	kasierin infolge eines Pankre	askopfkarzinoms gewonnen	
und etabliert wurde (Chen et al., 1982).			
BxPC-3	ATCC-CRL-1687	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	
Beschreibung: BxPC-3 bezeichnet eine adhärente PDAC-Zelllinie, die aus einer			
Biopsie bei Pankreaskorpuskarzinom etabliert wurde. Die Zelllinie entstammt einer 61-			
jährigen Kaukasierin (Tan et al., 1986).			
Capan-1	ATCC-HTB-79	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	

Tab. 1, fortgesetzt: PDAC-Zelllinien (adaptiert nach Schütte, 2015).

Beschreibung: Capan-1 bezeichnet eine adhärente PDAC-Zelllinie, die aus			
Lebermetastasen eines 40-jä	hrigen kaukasischen Manne	es gewonnen und etabliert	
wurde (Fogh et al., 1977; Kyria	zis et al., 1982).		
MIAPaCa-2	ATCC-CRL-1420	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	
Beschreibung: MIAPaCa-2 b	ezeichnet eine adhärente P	DAC-Zelllinie, die aus dem	
Primärtumor eines 65-jähriger	n kaukasischen Mannes gew	onnen und etabliert wurde.	
Der Primärtumor involvierte Pa	nkreaskorpus und –schwanz	(Yunis et al., 1977).	
PANC-1	ATCC-CRL-1469	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	
Beschreibung: PANC-1 bez	eichnet eine adhärente PD	AC-Zelllinie, die aus dem	
Pankreaskopfkarzinom eines 5	i6-jährigen kaukasischen Mar	nnes gewonnen und etabliert	
wurde (Lieber et al., 1975).			
Panc 10.05	ATCC-CRL-2547	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	
Beschreibung: Panc 10.05 b	bezeichnet eine adhärente P	DAC-Zelllinie, die aus dem	
Pankreaskopfkarzinom eines adulten kaukasischen Mannes gewonnen und etabliert			
wurde (Jaffee et al., 1998).			
SU.86.86	ATCC-CRL-1837	American Type Culture	
		Collection,	
		Manassas, Virginia, USA.	
Beschreibung: SU.86.86 bezeichnet eine adhärente PDAC-Zelllinie die aus			
Lebermetastasen einer 57-jährigen Kaukasierin, die an einem Pankreaskopfkarzinom			
litt, gewonnen und etabliert wurde (Drucker et al., 1988).			

Tab. 2: Nicht-karzinomatöse Zelllinie des Pankreas (adaptiert nach Schütte, 2015).

Zelllinie	Katalognummer/Referenz	Quelle
hTERT-HPNE	ATCC-CRL-4023	American Type Culture
		Collection,
		Manassas, Virginia, USA.

Beschreibung: hTERT-HPNE bezeichnet eine adhärente nicht-karzinomatöse Zelllinie, die aus normalen humanen duktalen Pankreaszellen eines 52-jährigen Mannes extrahiert wurde. Diese Zelllinien bilden Nestin (Humane Pankreatische Nestin-Exprimierende Zellen, HPNE) und wurden genetisch mittels einer hTERT-cDNA (humane Telomerase Reverse Transkriptase, hTERT) modifiziert. Die modifizierten Zellen wurden dadurch positiv für das Enzym Telomerase, die Zellalterung wurde aufgehalten und eine Zellproliferation erfolgte auch noch nach mehr als 150 Zellteilungen. Die immortalisierten Zellen waren frei von typischen PDAC-assoziierten Veränderungen (Lee et al., 2003). Im Folgenden wird diese Zelle auch vereinfacht als "HPNE"-Zelllinie bezeichnet.

2.1.2 Material und Reagenzien für die Zellkultur

Basismedium		Herstelle	r		
Gibco [™] , DMEM, Ni	iedrige	Thermo	Fisher	Scientific,	Waltham,
Glukosekonzentration (1	g/l),	Massachu	usetts, US	Α.	
GlutaMAX [™] Supplement, Natriumpy	ruvat				
Zusatzmedium		Herstelle	r		
Gibco™, Fetales Bovines Serum (FB	SS)	Thermo	Fisher	Scientific,	Waltham,
		Massachu	usetts, US	Α.	

Tab. 3: Zellkulturreagenzien.

Tab. 3, fortgesetzt: Zellkulturreagenzien.

Antibiotika	Hersteller
GE Healthcare, Penicillin/Streptomycin,	PAA Laboratories GmbH, Pasching,
10.000 IU/ml und 10.000 μg/ml	Österreich.
Plasmocin [™] 25 mg/ml	InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA.
Puffer und Lösungen	Hersteller
DMSO, für Zellkulturen geeignet	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
GE Healthcare, Trypsin, 0,25 % in PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching,
	Österreich.
Gibco™, DPBS, ohne Calcium, ohne	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Magnesium	Massachusetts, USA.

Tab. 4: Komplettes DMEM Zellkulturmedium.

Komplettes Zellkulturmedium (KZKM)		
Gibco TM , DMEM, Niedrige	500 ml	
Glukosekonzentration (1 g/l),		
GlutaMAX [™] Supplement, Natriumpyruvat		
Gibco™, Fetales Bovines Serum (FBS),	50 ml	
hitzeinaktiviert		
GE Healthcare, Penicillin/Streptomycin,	5,5 ml	
10.000 IU/ml und 10.000 μg/ml		
Plasmocin [™] 25 mg/ml	100 µl	

2.1.3 Zellkultur mittels kryokonservierter Zelllinienaliquoten

Kryokonservierte Zelllinienaliquoten wurden bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung für die Zellkultur wurden diese unmittelbar nach Entnahme bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut. Danach wurden die Zellflüssigkeitssuspensionen mit 9 ml vorgewärmtem KZKM (Tab. 4) vermischt und bei 1200 RPM für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) unter Verwendung der Eppendorf[™]-Zentrifuge 5810 R zentrifugiert. Der entstandene Flüssigkeitsüberstand wurde mittels einer Pipette abgesaugt und das entstandene Zellpellet in weiteren 12 ml des KZKM erneut suspendiert. Anschließend wurde die gesamte Zellflüssigkeitssuspension von ca. 12 ml in einen T75-Zellkulturkolben überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 90 % relativer Luftfeuchtigkeit (RH) bebrütet.

2.1.4 Passagieren der Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % RH bebrütet. Alle 2 bis 3 Tage wurde altes Zellkulturmedium durch frisches KZKM ersetzt. Sobald die Zellen mikroskopisch ca. 80 % der Oberfläche der dem Zellkulturmedium (ZKM) zugewandten Seite des Zellkulturkolbens bedeckt hatten, wurden diese zur weiteren Subkultivierung aufgeteilt. Hierzu wurde das verbliebene ZKM abgesaugt. Die Zellen wurden dann mit 10 ml DPBS gewaschen und dieses dann ebenfalls abgesaugt. Anschließend wurden 2 ml der verwendeten Trypsinlösung in den Zellkulturkolben gegeben und dieser bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % RH für 5 Minuten in den Zellinkubator gestellt. Nach mikroskopisch validierter erfolgreicher Zelladhäsiolyse wurden 8 ml des KZKM in den Kolben hinzugefügt und eine homogene Zellflüssigkeitssuspension erzeugt. Diese wurde nun in ein 15 ml Falcon[®]-Tube überführt und bei 1200 RPM und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Flüssigkeitsüberstand abpipettiert und die Zellen in 10 ml frischem KZKM homogen suspendiert. Zur weiteren Zellkultivierung wurden hieraus zuletzt 1 ml in einen T75-Zellkulturkolben sowie 2 ml in einen T175-Zellkulturkolben überführt und weitere 10 bzw. 20 ml KZKM in den jeweiligen Kolben hinzugegeben. Waren die durch Zentrifugation gewonnen Zellpellets bei optischer Prüfung auffällig klein, wurden stattdessen 2 bzw. 4 ml der homogenen Zellsuspension in die entsprechenden Zellkulturkolben überführt.

2.1.5 Zellpelletextraktation für Proteinanalysen

Zur Zellpelletextraktation für weitere Proteinanalysen wurden die zuvor bebrüteten T75-Zellkulturkolben herangezogen. Ähnlich dem zuvor beschriebenen Ablauf wurde zunächst verbliebenes ZKM abgesaugt, die Zellen anschließend mit 10 ml DPBS gewaschen und diese dann nach Hinzugabe von 2 ml der Trypsinlösung bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % RH für 5 Minuten inkubiert. Nach mikroskopisch validierter erfolgreicher Zelladhäsiolyse wurden die Zellen mit 8 ml frischem KZKM homogen suspendiert. Diese Suspension wurde dann in ein 15 ml Falcon[®]-Tube überführt und dieses bei 1200 RPM und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Flüssigkeitsüberstand entfernt und das entstandene Zellpellet in 800 µl eisgekühltem DPBS erneut suspendiert und in das zugehörige Eppendorf[™]-Tube überführt. Dieses wurde dann unter Verwendung der Eppendorf[™]-Zentrifuge bei 800 RCF und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der entstandene DPBS-Überstand abpipettiert und das Pellet durch Platzierung des Eppendorf[™]-Tubes in Trockeneis für ca. 2 Minuten gefroren. Die Zellpellets wurden dann bei -80 °C gelagert.

2.1.6 Kryokonservierung der Zelllinien

Zur Kryokonservierung der Zelllinien wurden die zuvor bebrüteten T175-Zellkulturkolben herangezogen. Ähnlich zuvor beschriebenen Abläufen wurde zunächst verbliebenes ZKM abgesaugt, die Zellen anschließend mit 20 ml DPBS gewaschen und diese dann nach Hinzugabe von 4 ml der Trypsinlösung bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % RH für 5 Minuten inkubiert. Nach mikroskopisch validierter erfolgreicher Zelladhäsiolyse wurden die Zellen mit 16 ml frischem KZKM homogen suspendiert. Diese Suspension wurde dann in ein 50 ml Falcon[®]-Tube überführt und dieses bei 1200 RPM und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Flüssigkeitsüberstand entfernt und das entstandene Zellpellet in 6 ml 4 °C kühlem FBS resuspendiert. Dann wurden 600 µl 4 °C kühlen DMSO hinzugegeben und eine homogene Lösung erzeugt. Aus dieser Suspension wurden 6 Aliquoten à 1 ml durch Überführung in Kryoröhrchen gebildet. Diese wurden wiederum in einem Kühlbehältnis graduell auf -80 °C herabgekühlt. Zur Langzeitlagerung kryokonservierten Zelllinien im Anschluss konnten die in Gefrierschränke bei -150 °C überführt werden.

2.1.7 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Der BCA-Assay, nach seinem Entdecker auch als Smith-Assay bekannt, beschreibt eine Methode zur Ermittlung der Proteinkonzentration von Proben innerhalb eines stark alkalischen Milieus. Die Proteingesamtkonzentration wird dabei kolorimetrisch bestimmt. Das pH-Optimum der Reaktion liegt bei 11,25. Die eigentliche Reaktion gliedert sich in zwei Teilschritte. Im ersten Schritt wird zweiwertiges Kupfer (Cu²⁺) in einwertiges Kupfer (Cu¹⁺) umgesetzt. Cu¹⁺ ist wiederum in der Lage zwei BCA-Moleküle zu binden. Das durch Bindung entstehende, zeitlich stabile sowie wasserlösliche Produkt bewirkt einen Farbumschlag ins Violette und zeigt das Maximum seines Absorptionsspektrums bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Reaktion und damit auch die final gemessene Gesamtabsorption ist proportional zur Proteinmenge einer Probe (Smith et al., 1985).

2.1.8 Material und Reagenzien für den Bicinchoninsäure-Assay

Reagenzien	Hersteller	
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.	
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.	
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham,	
	Massachusetts, USA.	
Pierce™ RIPA Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham,	
	Massachusetts, USA.	
PMSF Protease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham,	
	Massachusetts, USA.	
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.	
Material	Hersteller	
96-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-one CELLSTAR®	
FLUOstar [®] OPTIMA Microplate Reader	BMG Labtech	

Tab. 5: Reagenzien und Material für den BCA-Assay.

 Tab. 6: RIPA Plus für Proteinkonzentrationsmessung.

RIPA Plus	
Pierce™ RIPA Puffer	1 ml
PMSF Protease Inhibitor	10 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	10 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	10 µl
Protease Inhibitor Cocktail	10 µl

Tab. 7: BCA-Lösung für Proteinkonzentrationsmessung.

BCA-Lösung	
Pierce™ BCA Protein Assay Reagenz A,	10 ml
im Kit enthalten	
Pierce™ BCA Protein Assay Reagenz B,	200 ml
im Kit enthalten	

2.1.9 Quantifizierung des Proteingehalts mittels BCA-Assay

Zur Ermittlung des Proteingehalts der gezüchteten Zelllinien wurden die zuvor extrahierten Zellpellets herangezogen. Um die Proteinproben aus der Zellkultur der Prozedur unterziehen zu können, wurden diese entsprechend der optischen Einstufung der Größe der jeweiligen Zellpellets mit 50 bis 250 µl RIPA Plus (Tab. 6) versetzt. Die Proben wurden nun alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 50 Minuten mithilfe eines Vortexmischers vermischt. Im Anschluss wurden die Proben für 20 Minuten bei 4 °C und 14.000 RPM zentrifugiert. Nun konnten in Abhängigkeit des zuvor eingesetzten Volumens RIPA Plus optional Aliquoten à 50 µl erzeugt werden. Im Folgenden wurde der Proteingehalt einer Aliquote jeder Zelllinie von Interesse ermittelt. Die Aliquoten konnten nun bei -80 °C gelagert werden. Die Detektion des Proteingehalts der ausgewählten Aliquoten erfolgte kolorimetrisch unter Vergleich mit BSA-Standards 0,0625 verschiedener bekannter Proteinkonzentrationen von µg/µl bis 2 µg/µl aus dem Pierce[™] BCA Protein Assay Kit. Hierzu wurden alle im Folgenden genannten Reagenzien bzw. Proben stets doppelt auf der 96-Well-Zellkulturplatte aufgetragen (aus beiden Absorptionsmessungen je Probe wurden im Anschluss die Mittelwerte gebildet): 10 µl aller BSA-Standards (0,0625 µg/µl, 0,125 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl), 10 µl RIPA Puffer, 10 µl RIPA Plus, 2,5 µl der zu untersuchenden Proben unter Hinzugabe von weiteren 7,5 µl RIPA Plus (Verdünnungsfaktor 1 : 4). In jede der verwendeten Wells wurde nun 200 µl BCA-Lösung hinzugegeben und die 96-Well-Zellkulturplatte wurde bei 37 °C, 5 % CO₂, 90 % RH für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Absorptionen der Proben mittels FLUOstar[®] OPTIMA Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm ausgelesen. Für diese Wellenlänge (im Vergleich zum eigentlichen Absorptionsmaximum von 562 nm (vgl. 2.1.7) war der Versuch in unserem Labor zuvor bereits etabliert und optimiert worden). Mithilfe der BSA-Standards bekannter Proteinkonzentrationen konnte nach Ermittlung der jeweiligen Absorptionen eine lineare Regression generiert werden, mithilfe derer die Proteinkonzentrationen der Zellinien berechnet wurden (Abb. 3). Allgemeine Informationen zur Generierung und Interpretation eines Proteinassays wie dem Pierce[™] BCA Protein Assay wurden durch den Hersteller bereitgestellt (Thermo Fisher Scientific, 2012).



Abb. 3: Absorptionsmessung der BSA-Standards: Auf der x-Achse sind sechs BSA-Standards bekannter Proteinkonzentrationen aufgetragen. Auf der y-Achse ist die entsprechende Absorption bei 570 nm in Prozent aufgetragen. Basierend auf den ermittelten Wertepaaren wurde die lineare Regression y = 0,3519x + 0,0101(Quadrierter Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,982$) generiert. Ausgehend von dieser Gleichung wurden im Weiteren basierend auf den Absorptionsmessungen der einzelnen Zelllinienproteinproben deren jeweiliger Proteingehalt bestimmt.

2.2 Western Blot

Western Blot bezeichnet eine Prozedur zur Detektion bestimmter Zielepitope oder -proteine. Die Proteine von Interesse werden zunächst mittels Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Danach wird ein erneutes elektrisches Feld senkrecht zum Gel mit den aufgetrennten Proteinen angelegt. Dadurch wandern die Proteine aus dem Gel heraus und können so auf eine Trägermembran überführt Diese wiederrum werden. Membran kann mit Primärund Sekundärantikörpern inkubiert werden, wodurch mittels einer Fluoreszenzreaktion die Zielstrukturen von Interesse sichtbar gemacht werden können.

2.2.1 Material und Reagenzien für den Western Blot

Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol ≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
2-Propanol BioChemica	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland.
4-lodophenylboronsäure (4IPBA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
Ammoniumperoxodisulfat (APS) \ge 98 %,	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
p.a., ACS	
Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Fraktion V ≥ 98 %, pulverisiert, für die	
Molekularbiologie	
DMSO, für Zellkulturen geeignet	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
Glycin 99 %, zur Synthese	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
Methanol ROTIPURAN [®] \geq 99,9 %, p.a.,	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
ACS, ISO	

Tab. 8: Reagenzien und Material f
 General f
 ür den Western Blot.
Tab. 8, fortgesetzt:
 Reagenzien und Material f
 ür den Western Blot.

Milchpulver für Blotting, pulverisiert, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Natriumchlorid (NaCl), reinst, Ph. Eur., USP	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland.
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
(10 bis 180 kDa)	Massachusetts, USA.
Roti [®] -Load 1, reduzierend, 4 x konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Rotiphorese [®] Gel 30 $(37,5 : 1)$,	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Gebrauchsfertige, gasstabilisierte,	
wässrige, 30 % Acrylamidstammlösung mit	
0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1	
Salzsäure (HCI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %,	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
Perhydrol [®] , zur Analyse	
Antikörper	Hersteller
Anti-Rabbit IgG, HRP-gekoppelter	Cell Signaling Technology, Danvers,
Antikörper	Massachusetts, USA.
Katalognummer: 7074S	
(Cell Signaling Technology, 2015)	
CDK5 (C-8) Rabbit Polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
CDK5 (C-8) Rabbit Polyklonaler Antikörper Katalognummer: sc-173	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA.
CDK5 (C-8) Rabbit Polyklonaler Antikörper Katalognummer: sc-173 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA.

Tab. 8, fortgesetzt: Reagenzien und Material für den Western Blot.

GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers,
Katalognummer: 2118	Massachusetts, USA.
(Cell Signaling Technology, 2014)	
PD-L1 Rabbit Polyklonaler Antikörper	Biorbyt LLC., San Francisco, Kalifornien,
Katalognummer: orb158130	USA.
(Biorbyt, PDL1 antibody orb158130)	
Material	Hersteller
ChemiDoc™ XRS+, Geldokumentations-	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules,
system	Kalifornien, USA.
Consort EV202, Elektrophorese-	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.
stromversorgung	
Eppendorf™ Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland.
F20 FiveEasy™, pH-Meter	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA.
Fusion SL [™] , Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat Deutschland GmbH,
	Eberhardzell, Deutschland.
Mini-PROTEAN [®] Tetra System,	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules,
Elektrophoreseeinheit (vertikal)	Kalifornien, USA.
Mini Trans-Blot [®] Cell, Blotting-Einheit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules,
	Kalifornien, USA.
Whatman [®] PROTRAN [®] , Transfer-	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland.
membranen aus Nitrocellulose	
Material zur Auswertung	Erwerbsmöglichkeit
ImageJ 1.53	imagej.nih.gov/ij/

Tab. 9: Puffer und Lösungen für den Western Blot.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
0,1 % TBS Tween [®] (TBST)	900 ml Doppelt destilliertes Wasser
	100 ml 1 x TBS-Puffer
	20 ml Tween [®] 20
10 x konzentrierter TBS-Puffer (TBS)	900 ml Doppelt destilliertes Wasser
	100 ml TRIS-HCI, 1,0 M, pH 8,0
	48,15 g NaCl
10 x konzentrierter TRIS-Puffer (T.Puffer)	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
	143 g Glycin
	30,3 g TRIS
5 % BSA-Lösung für Primärantikörper-Mix	6 ml TBST
	0,3 g BSA
5 % BSA-Lösung zum Blocken	25 ml TBST
unspezifischer Epitope	1,25 g BSA
5 % Milchpulver-Lösung für Sekundär-	6 ml TBST
antikörper-Mix	0,3 g Milchpulver
ECL-Stammlösung	50 ml Doppelt destilliertes Wasser
	3,3 ml TRIS-HCI, 1,5 M, pH 8,8
	1111 µl 90 mM 4IBPA in DMSO
	250 µl 250 mM Luminol in DMSO
ECL-Substrat	1 ml ECL-Stammlösung
	0,5 μΙ 30 % Η ₂ Ο ₂
Laufpuffer	900 ml Doppelt destilliertes Wasser
	100 ml 10 x konzentrierter TRIS-Puffer
	1 g SDS

Stripping-Puffer	67,5 ml Doppelt destilliertes Wasser
	20 ml 10 % SDS
	12,5 ml TRIS-HCl, 0,5 M, pH 6,8
Transferpuffer	700 ml Doppelt destilliertes Wasser
	100 ml 10 x konzentrierter TRIS-Puffer
	200 ml Methanol
TRIS-HCI, 0,5 M, pH 6,8	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
	TRIS 60,57 g
	Zugabe konzentrierter HCI bis pH = 6,8
TRIS-HCI, 1,0 M, pH 6,8	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
	TRIS 121,14 g
	Zugabe konzentrierter HCl bis pH = 6,8
TRIS-HCI, 1,0 M, pH 8,0	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
	TRIS 121,14 g
	Zugabe konzentrierter HCI bis pH = 8,0
TRIS-HCI, 1,5 M, pH 8,8	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
	TRIS 181,71 g
	Zugabe konzentrierter HCI bis pH = 8,8

Tab. 9, fortgesetzt: Puffer und Lösungen für den Western Blot.

 Tab. 10: Gele f
 ür den Western Blot.

Laufgel	
Doppelt destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	4000 µl
Rotiphorese [®] Gel 30,	3300 µl
30 % Acrylamidstammlösung mit	
0,8 % Bisacrylamid (Verhältnis 37,5 : 1)	
TRIS-HCI, 1,5 M, pH 8,8	2500 μl
10 % SDS-Lösung (SDS gelöst in ddH ₂ O)	100 µl
10 % APS-Lösung (APS gelöst in ddH ₂ O)	100 µl
TEMED	10 µl
Stacking-Gel	
Stacking-Gel Doppelt destilliertes Wasser (ddH2O)	2100 µl
Stacking-GelDoppelt destilliertes Wasser (ddH2O)Rotiphorese®Gel30,	2100 μl 500 μl
Stacking-GelDoppelt destilliertes Wasser (ddH2O)Rotiphorese® Gel30 % Acrylamidstammlösung	2100 μl 500 μl
Stacking-GelDoppelt destilliertes Wasser (ddH2O)Rotiphorese® Gel 30,30 % Acrylamidstammlösung mit0,8 % Bisacrylamid (Verhältnis 37,5 : 1)	2100 μl 500 μl
Stacking-GelDoppelt destilliertes Wasser (ddH2O)Rotiphorese® Gel 30,30 % Acrylamidstammlösung mit0,8 % Bisacrylamid (Verhältnis 37,5 : 1)TRIS-HCl, 1,0 M, pH 6,8	2100 μl 500 μl 380 μl
Stacking-GelDoppelt destilliertes Wasser (ddH2O)Rotiphorese® Gel 30,30 % Acrylamidstammlösung mit0,8 % Bisacrylamid (Verhältnis 37,5 : 1)TRIS-HCI, 1,0 M, pH 6,810 % SDS-Lösung (SDS gelöst in ddH2O)	2100 μl 500 μl 380 μl 30 μl
Stacking-GelDoppelt destilliertes Wasser (ddH2O)Rotiphorese® Gel 30,30 % Acrylamidstammlösung mit0,8 % Bisacrylamid (Verhältnis 37,5 : 1)TRIS-HCI, 1,0 M, pH 6,810 % SDS-Lösung (SDS gelöst in ddH2O)10 % APS-Lösung (APS gelöst in ddH2O)	2100 μl 500 μl 380 μl 30 μl 30 μl

2.2.2 Gelpräparation

Gemäß Tab. 10 wurden Laufgel und Stacking-Gel hergestellt. Beim Vermischen der Reagenzien wurden die 10 % APS-Lösung sowie TEMED zuletzt hinzugegeben, da diese die Polymerisation der Gele initiierten. Die Gele wurden mittels der dafür vorgesehenen Bestandteile der Mini-PROTEAN[®] Tetra System Elektrophoreseeinheit hergestellt. Nach Vermischen der Reagenzien des Laufgels wurde dieses zwischen die beiden Glasplatten der Elektrophoreseeinheit gegeben bis dessen Spiegel ca. 1 cm unter der Oberkante der Glasplatten stand. Anschließend wurde dieser mit einem ca. 1 mm hohen Spiegel von 2-Propanol bedeckt, um die Formierung von Blasen zu verhindern. Nach ca. 20 Minuten bei RT, RH, war das Laufgel ausreichend gefestigt. Der Überstand 2-Propanol wurde vorsichtig mit Whatman[®] PROTRAN[®] abgeschöpft. Anschließend wurde der verbliebene freie Bereich zwischen den Glasplatten mit flüssigem Stacking-Gel aufgefüllt und ein Kamm zur Erzeugung von Wells eingesetzt. Nach ca. 30 Minuten bei RT, RH, war auch das Stacking-Gel getrocknet und das Gel damit einsatzfähig.

2.2.3 Vorbereitung der Proteinproben

Die Proteinproben der Zelllinien von Interesse wurden während der weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Proteingehalte waren zuvor mittels BCA-Assay ermittelt worden (vgl. 2.1.7, 2.1.8 und 2.1.9). Um die Gele zu beladen wurden Proben à 20 µl hergestellt. Diese beinhalteten u.a. 30 µg Protein und 5 µl Roti[®]-Load. Entsprechend BCA-Assay wurde eine Menge an Flüssigkeit aus den Zelllinienaliquoten von Interesse entnommen, um eine Proteinmenge von 30 µg pro Zelllinie zu gewährleisten. Die Proben für den Western Blot wurden nun mit RIPA Plus (Tab. 6) bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 20 µl aufgefüllt. Zudem wurden weitere Dummy-Proben bestehend aus 5 µl Roti[®]-Load sowie 15 µl RIPA Plus hergestellt, um bei der folgenden Elektrophorese ein gleichmäßigeres Laufbild aller Proben zu erzeugen. Alle Proben inkl. Dummys wurden nun bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend einem Short Spin unterzogen. Die Vorbereitung der Proteinproben zur Untersuchung der Expressionen von PD-L1 sowie CDK5 erfolgte jeweils identisch.

2.2.4 Expressionsdetektion von PD-L1

Nach Vorbereitung der Proben wurde die vollständige Elektrophoreseeinheit eingerichtet und mit Laufpuffer befüllt. Die Wells wurden nun mit den vorbereiteten Proteinproben inkl. Dummys (zum Balancieren der sonst leerstehenden Wells) sowie 7 µl PageRuler™ (Proteinleiter) befüllt. Nun wurde eine vertikale Gelelektrophorese bei initial 75 V für 20 Minuten durchgeführt, dann wurde die Spannung für 1 h auf 110 V erhöht. Stromstärke und Leistung wurden an der Elektrophoresestromversorgung Consort EV202 zu Versuchsbeginn auf 250 mA bzw. 300 W gesetzt und über den gesamten Versuch nicht verändert. Anschließend wurde die Mini Trans-Blot[®] Cell Blotting-Einheit präpariert und mit Transferpuffer befüllt. Es wurde eine seitlich gerichtete Spannung angelegt, um die Proteine auf eine Whatman[®] PROTRAN[®] Transfermembranen aus Nitrocellulose zu übertragen. Der Transfer erfolgte über 1 h bei 300 V unter ständiger Kühlung mittels eines Kühlpacks, das in die Blotting-Kammer eingesetzt wurde. Nach erfolgreicher Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese für 1 h bei RT mit 25 ml 5 % BSA-Lösung zum Blocken in einem 50 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller inkubiert. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit 6 ml Primärantikörper-Mix, bestehend aus 6 ml 5 % BSA-Lösung sowie 12 µl PD-L1-Antikörper (Verdünnung 1 : 500), in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Membran zunächst 3-mal mit 6 ml TBST in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller für je 5 Minuten bei RT gewaschen. die Zwischen den Waschungen wurde TBST-Lösung jeweils ausgetauscht. Anschließend wurde die Membran für 75 Minuten bei RT mit 6 ml Sekundärantikörper-Mix, bestehend aus 6 ml 5 % Milchpulver-Lösung sowie 3 µl Anti-Rabbit IgG, HRPgekoppelter Antikörper (Verdünnung 1 : 2000), in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller inkubiert. Nun wurde die Membran erneut 3-mal mit 6 ml TBST in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller für je 5 Minuten bei RT gewaschen, wobei zwischen den Waschungen die TBST-Lösung ausgetauscht wurde. Zur Detektion der Zielproteine wurde die Membran nun mit ECL-Substrat, das unmittelbar zubereitet wurde, für 5 Minuten bei RT, RH, bedeckt. Anschließend wurde die Membran mit einer bedeckt und die Chemilumineszenz mittels ChemiDoc™ Plastikfolie XRS+ Geldokumentationssystem detektiert. Hiernach wurde die Membran mit 6 ml Stripping-Puffer in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller für je 5 Minuten bei RT inkubiert, wodurch die bestehenden Antikörper-Epitop-Bindungen gelöst wurden. Nun wurde die Membran erneut wie zuvor beschrieben 3-mal mit 6 ml TBST gewaschen und anschließend mit 25 ml 5 % BSA-Lösung zum Blocken für 1 h bei RT inkubiert. Über Nacht die Membran 4 °C mit 6 ml wurde dann bei eines zweiten Primärantikörper-Mixes, bestehend aus 6 ml 5 % BSA-Lösung sowie 6 µl GAPDH-Antikörper (Verdünnung 1 : 1000), in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller inkubiert. Am dritten Tag wurden alle Schritte bis zur Detektion der GAPDH-Expression

in identischer Art und Weise wie am zweiten Tag durchgeführt. Die Auslesung der Chemilumineszenz unter GAPDH-Applikation erfolate bei der in dieser Dissertationsarbeit im Folgenden abgebildeten Grafik (vgl. 3.1.1, Abb. 8 B) mittels Fusion SL[™] Geldokumentationssystem, da es während des Versuchs zu einem technischen Defekt des bis dato eingesetzten ChemiDoc™ XRS+ Geldokumentationssystem kam. GAPDH wird als sogenanntes Housekeeping-Gen von den verwendeten Zelllinien standardmäßig in ausgeprägter Weise exprimiert. Die Inkubation mittels GAPDH-Antikörper diente daher der Überprüfung einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Wells (Ladekontrolle). Ein weiteres Stripping der Membran wurde am dritten Tag nicht mehr durchgeführt. Es erfolgte insgesamt dreimal (n = 3) die Versuchsreplikation mit Testung der PD-L1-Expression bei jeweils separater Ladekontrolle durch Ermittlung der GAPDH-Expression entsprechend des bis hierhin beschriebenen Prozederes. Im Weiteren wurde die PD-L1-Expression durch Einsatz des Programmes ImageJ 1.53 weiter guantifiziert: Hierzu wurde eine je gleichgroße rechteckige Markierung über jede einzelne Proteinbande gelegt, jedem dieser Rechtecke wurde in ImageJ 1.53 eine Nummer zugeordnet. Danach wurde über den Befehl "Plot Lanes" eine graphische Darstellung (optisch einer Glockenkurve ähnelnd) entsprechend der jeweiligen Proteinexpression einer Bande erstellt. Die relative Expression der einzelnen Zelllinien für PD-L1 bzw. GAPDH wurde dann indirekt durch Bestimmung der Fläche unter der Kurve ermittelt. Anfang- und Ende der Kurven wurden mit einer geraden Linie verbunden, wodurch diese von einer stets bestehenden leichten Hintergrundintensität klar abgegrenzt wurden. Mittels der Funktion "Wand (tracing) tool" konnte dann die Fläche unter der Kurve bestimmt werden. Da auch die Proteinmengen der einzelnen Zelllinien, mit der die Wells beladen wurden, Einfluss auf die ermittelte PD-L1-Menge hat, erfolgte eine Normierung der PD-L1-Expression auf Basis der zugehörigen GAPDH-Ladekontrolle. Nach Bestimmung der relativen GAPDH-Expression durch Ermittlung der Fläche unterhalb der Expressionskurven in ImageJ 1.53 wurde für jeden durchgeführten Western Blot separat aus den ermittelten Einzelwerten der Mittelwert der jeweiligen relativen GAPDH-Expression gebildet. Die Werte der relativen GAPDH-Expression jeder Zelllinie wurden dann durch den Mittelwert der GAPDH-Expression zur Standardisierung dividiert. Anschließend wurden die Werte der relativen PD-L1-Expression jedes Western Blots durch den standardisierten Wert der zugehörigen relativen GAPDH-Expression dividiert. Dies ermöglichte auch die Standardisierung der Werte der relativen PD-L1-Expression. Aus den Werten der standardisierten relativen PD-L1-Expression jedes einzelnen Western Blots (n = 3) wurden dann wiederum entsprechende Mittelwerte gebildet, um eine graphische Auftragung (vgl. Abb. 10 und Abb. 11) zu ermöglichen. Anzumerken ist, dass mehrere Zelllinien vollkommen negativ für PD-L1 waren und konsekutiv keine Banden im Western Blot präsentierten. Bei diesen Zelllinien zeigte sich konsekutiv auch keine Expressionskurve, sodass eine Flächenbestimmung unterhalb der Kurven nicht erfolgen konnte. Die Werte der relativen Expression für PD-L1 dieser Zelllinien wurde mit "0,00" bewertet.

2.2.5 Expressionsdetektion von CDK5

In identischer Art und Weise wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben, wurde mittels Western Blot und Detektion der Chemilumineszenz ein Expressionsprofil der Zelllinien von Interesse für CDK5 generiert. Zusätzlich zu den PDAC-Zelllinien wurde hierbei auch die HPNE-Zelllinie im Bezug auf eine CDK5-Expression untersucht. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit 6 ml Primärantikörper-Mix, bestehend aus 6 ml 5 % BSA-Lösung sowie 12 µl CDK5-Antikörper (Verdünnung 1 : 500), in einem 15 ml Falcon[®]-Tube auf einem Tube-Roller inkubiert. Nach Auswertung der CDK5-Expression am zweiten Tag erfolgte in identischer Art ein erneutes Stripping und eine erneute Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C mit 6 ml eines zweiten Primärantikörper-Mixes, bestehend aus 6 ml 5 % BSA-Lösung sowie 6 µl GAPDH-Antikörper (Verdünnung 1 : 1000), in einem 15 ml Falcon®-Tube auf einem Tube-Roller. Die Auswertung der Chemilumineszenzen unter CDK5- sowie korrespondierender GAPDH-Applikation erfolgten mittels ChemiDoc[™] XRS+ Geldokumentationssystem. Die weitere Auswertung erfolgte ebenfalls, wie zuvor unter Punkt 2.2.4 beschrieben, mittels ImageJ 1.53 durch Standardisierung der relativen CDK5-Expression der einzelnen Western Blots unter Berücksichtigung der entsprechenden GAPDH-Ladekontrollen. Es erfolgte insgesamt zweimal (n = 2) die Versuchsreplikation mit Testung der CDK5-Expression der PDAC-Zelllinien bei jeweils separater Ladekontrolle durch Ermittlung der GAPDH-Expression. Die Bande der nicht-kanzerösen HPNE-Zelllinie, deren CDK5-Expression

lediglich einmal bestimmt wurde (n = 1), wurde bei der Berechnung der relativen CDK5-Expression der PDAC-Zelllinien nicht berücksichtigt.

2.3 Mausmodelle duktaler Adenokarzinome des Pankreas

Mausmodelle sind im Bereich immunologischer Forschung von großer Bedeutung, da sich Immunsysteme von Lebewesen mit all ihrer Komplexität im Bezug auf Funktionen und Interaktionen in vitro schlichtweg nicht vergleichbar mit jenen in vivo abbilden lassen. Dazu zählen u.a. die Präsenz diverser Immunzellpopulationen, das reaktive Hoch- und Herabregulieren bestimmter Zelltypen oder Oberflächenantigenen sowie das Einwandern solcher Zellen über den Blutstrom oder aus umliegenden Geweben. Auch wenn mittels Versuchen in vitro Hinweise auf Prozesse des Immunsystems gewonnen werden, ist letztlich eine Untersuchung immunmodulatorischer Prozesse, wie z.B. die Auswirkung eines relativen zellulären CDK5-Abfalls bzw. -Anstiegs auf die Expression von PD-L1, in vivo notwendig, um aussagekräftige Daten im Kontext solch komplexer können. Abläufe gewinnen zu Gleiches gilt für Therapiestudien mit Immuncheckpointinhibitoren wie z.B. PD-L1- oder PD1-Inhibitoren.

2.3.1 KPC-Mausmodell – LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zuvor beschriebenes und inzwischen weit fortgeschrittenes LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; Mausmodell verwendet. Die als Zuchttiere verwendeten LSL-Kras^{G12D}-, LSL-Trp53^{R172H}- und PDX1-Cre-Mäuse wurden bereits andernorts beschrieben (Habbe et al., 2008; Hingorani et al., 2003; Hingorani et al., 2005). In der Vergangenheit wurde das vorliegende Mausmodell bereits für Therapiestudien eingesetzt (Fendrich et al., 2010). Die für diese Studie benötigten LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; Mäuse wurden durch mehrere gezielte Kreuzungen der entsprechenden LSL-Kras^{G12D}-, LSL-Trp53^{R172H}- und PDX1-Cre-Breeder bzw. deren Nachkommen im Haus für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn (HET) erzeugt. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte im Alter von 3 bis 4 Wochen postnatal. Hierzu wurde den Schwanzspitzen der Mäuse Gewebe durch unsere technischen Assistenten entnommen. Diese untersuchten dann mittels PCR-Amplifikation bei bereits etabliertem Protokoll die Proben im Bezug auf die

eingebrachten transgenen Konstrukte. Die Auswertung der PCR-Amplifikationen erfolgte in unserer Forschungsgruppe durch Frau Dr. phil. Bisht-Feldmann. Mäuse, die die notwendige Genotypkonstellation LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre aufwiesen, wurden als "KPC-Mäuse" bezeichnet (Olive et al., 2009). Insgesamt konnten 18 Mäuse mit einer "KPC-Genotypkonstellation" erzeugt und in den Versuch eingegliedert werden. Auf genetischer Ebene führt die vorliegende KPC-Genotypkonstellation zur Expression des Enzyms Cre-Rekombinase, einem Enzym das aus dem Bakteriophagen P1 extrahiert wurde. Im vorliegenden Mausmodell ist dieses an PDX1, das pankreatische und duodenale Homöobox-Gen, gekoppelt. Das PDX1-Gen ist von herausragender Bedeutung in der embryonalen Entwicklung von Duodenum und Pankreas. Entsprechend wird durch die Kopplung der Gensequenz für das Enzym Cre-Rekombinase mit jener des PDX1-Gens die Cre-Rekombinase weitgehend selektiv in duktalen Epithelzellen des Pankreas gebildet. Die Cre-Rekombinase erkennt dann die an beiden Seiten durch die Erkennungssequenz loxP flankierten Stellen und schneidet so die floxed-Region (flankiert von loxP) unter Bildung eines zirkulären DNA-Abschnittes, der in der Zelle abgebaut wird, heraus. Dabei werden die Stopcodons der LSL-Sequenzen (LoxP-Stopcodon-LoxP) des LSL-Kras^{G12D}- sowie des LSL-Trp53^{R172H}-Gens ausgeschnitten und die mutierten Versionen von Kras sowie Trp53 konsekutiv exprimiert. Bedingt durch die lokal verstärkte Ausbildung dieser defekten Genprodukte bilden die Versuchstiere weitgehend selektiv Tumoren der Bauchspeicheldrüse aus. Überdies treten jedoch gelegentlich andere Tumoren insbesondere der Haut im Kopfund Halsbereich als Off-Target-Effekte auf. Gemäß Dorand et al. (2016) nahmen wir vor Versuchsbeginn eine verstärkte PD-L1-Expression im Rahmen der nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen für das PDAC-Gewebe der KPC-Mauspopulation (homozygote Wildtypen für CDK5) im Vergleich zu jenem der KPCC-Mauspopulation (homozygotes konditionelles Gen-Knockout von CDK5) (vgl. 2.3.2) an.

2.3.2 KPCC-Mausmodell – LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; CDK5 fl/fl

Die KPCC-Mauspopulation wurde analog der KPC-Mauspopulation (vgl. 2.3.1) generiert. Hier wurden zudem in weiteren Zuchtschritten homozygote CDK5-floxed-Regionen eingeführt (The Jackson Laboratory, 2019). Dadurch ergab sich eine finale LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; CDK5 fl/fl; Genotypkonstellation. Analog zur KPC- Mauspopulation wurde hierbei von einer KPCC-Mauspopulation gesprochen. Insgesamt konnten 22 Mäuse mit einer "KPCC-Genotypkonstellation" erzeugt und in den Versuch eingegliedert werden. Auf genetischer Ebene kommt es im Unterschied zur KPC-Mauspopulation zusätzlich zu einer Entfernung der CDK5-Gensequenz durch die Cre-Rekombinase und folglich im Idealfall zu einem vollständigen konditionellen homozygoten Gen-Knockout für CDK5. Wie bereits eingangs erläutert (vgl. 1.3), sollte anschließend der Erfolg des CDK5-Knock-Outs mittels Immunhistochemie überprüft werden. Erwartungsgemäß sollte sich in der KPCC-Mauspopulation (homozygotes konditionelles Gen-Knockout für CDK5) eine geringere CDK5-Aktivität als in der KPC-Mauspopulation (homozygote Wildtypen für CDK5, vgl. 2.3.1) zeigen. Gemäß Dorand et al. (2016) nahmen wir vor Versuchsbeginn – unter Voraussetzung eines erfolgreichen Knock-Outs von CDK5 – eine abgeschwächte PD-L1-Expression im Rahmen der folgenden immunhistochemischen Untersuchungen für das PDAC-Gewebe der KPCC-Mauspopulation im Vergleich zu jenem der KPC-Mauspopulation an.

2.3.3 Feststellung über die Zuchtgenehmigung genmodifizierter Mauslinien

Die im Rahmen dieses Versuchs verwendeten KPC- bzw. KPCC-Mauslinien (vgl. 2.3.1 und 2.3.2) wurden mit Genehmigung unter Verweis auf Zuchtgenehmigungsnummer 84-02.04.2014.A436 gezüchtet.

2.4 Immunhistochemie

Immunhistochemie bezeichnet ein biochemisches Reaktionsverfahren zur Detektion bestimmter Oberflächenantigene von Zellen. Gewebsschnitte werden mit einem spezifischen Zielantikörper behandelt, der an sein zugehöriges Antigen binden. Danach erfolgt im vorliegenden Fall die Applikation eines Zweitantikörpers, der an den Erstantikörper bindet. Dieser Zweitantikörper wiederrum ist HRP-gekoppelt. Bei Zusatz des entsprechenden Substrats kommt es durch die HRP zur Umsetzung des Substrats in ein braunes Präzipitat, das sich im Gewebe ablagert. Durch Gegenfärbung mittels Hämatoxylin wird ein besserer Kontrast für die Auswertung der Präparate erzielt. Im Anschluss an die Färbeprozedur können die Präparate mithilfe verschiedener Methoden auf die quantitative Ausprägung des Zielantigens hin untersucht werden.

2.4.1 Gewinn der duktalen Adenokarzinome des Pankreas

Die PDAC-Präparate der Genotypkonstellationen "KPC" und "KPCC" wurden, wie unter 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben, generiert. Die Versuchsmäuse entwickelten bei Vorliegen einer der genannten Genotypkonstellationen PDACs. Die Mäuse wurden regelhaft auf wachsenden Tumoren hin untersucht. Bei Detektion eines Tumors, bspw. bei Bauchpalpation, und einhergehender allgemeiner Zustandsverschlechterung der einzelnen Versuchsmaus wurde das Versuchstier beim Erreichen definierter Abbruchkriterien aus humanitären Gründen getötet und der Bauchspeicheldrüsentumor mittels Nekropsie entnommen. Zudem wurden standardmäßig Leber, Lunge und Nieren sowie singuläre verdächtige Herde zur Option einer späteren Metastasensuche entnommen. Auf beschriebene Weise konnten von allen 18 KPC- sowie von allen 22 KPCC-Mäusen PDACs für den Versuch asserviert werden. Zusätzlich zeigten sich im weiteren Verlauf in 11/18 bzw. 14/22 Fällen Lebermetastasen in einem singulären Leberschnittpräparat im Falle der KPC- bzw. KPCC-Mäuse, die in der vorliegenden Studie ebenfalls weiter untersucht wurden.

2.4.2 Einbettung in Paraffin

Tab. 11: Reagenzien und Material für die Einbettung in Paraffin.

Reagenzien	Hersteller
Formaldehyd 10,0 %	Otto Fischar GmbH & Co.KG,
	Saarbrücken, Deutschland.
Material	Hersteller
Einbettkassetten	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG,
	Lauda-Königshofen, Deutschland.
Leica EG1150 C, Kühlplatte für das	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland.
modulare Einbettsystem	
Leica EG1150 H, Beheizte	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland.
Paraffinausgießstation	
Tissue-Tek [®] VIP™ Jr, Vakuum-	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen,
infiltrationsprozessor	Deutschland.

Nach Entnahme der Organe mittels Nekropsie wurden die Organe über Nacht in 10 % Formaldehyd bei RT, RH, inkubiert. Danach erfolgte der Gewebsflüssigkeitsaustausch gegen Paraffin und die Fixation der Präparate als Paraffinblock auf den dafür vorgesehenen Einbettkassetten. Nun konnten mittels Mikrotom Schnitte der Organe erzeugt werden. Tab. 12: Reagenzien und Material zur Erzeugung von Serienschnitten mittels Mikrotom.

Reagenzien	Hersteller
OSTEOSOFT®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
Material	Hersteller
Feather Mikrotomklingen aus Edelstahl	FEATHER [®] Safety Razor Co., Ltd., Osaka,
S35	Japan.
KPC-Paraffinblöcke mit Pankreas- bzw.	AG Feldmann, Bonn, Deutschland.
Lebergewebe	
KPCC-Paraffinblöcke mit Pankreas- bzw.	AG Feldmann, Bonn, Deutschland.
Lebergewebe	
Medite Färbeautomat TST 33.000	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland.
Microm HM 355S automatisches Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	Massachusetts, USA.
Objektträger 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG,
	Lauda-Königshofen, Deutschland.
Paraffin-Streckbad TFB 45	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland.
Tissue Tek-II Tissue Embedding Center	VOGEL GmbH & Co.KG, Fernwald,
Kühlplatte	Deutschland.

Nach Einbettung der Präparate in Paraffin wurden einzelne Serienschnitte mithilfe eines automatischen Mikrotoms bei RT, RH, erzeugt. Hierzu wurden die Präparate zunächst für mindestens 20 Minuten bei umgebender RH auf der Kühlplatte herabgekühlt. Zudem wurde OSTEOSOFT[®] auf die Präparate geträufelt. Dieses zog in die oberen Schichten des Bauchspeicheldrüsen- bzw. Lebergewebes ein. Hier diente es der Zersetzung von Kalzifikationen, die in einigen Fällen der Tumoren bzw. Metastasen auftraten, und die Erzeugung qualitativer Gewebsschnitte teils enorm erschwerten. Zur Standardisierung wurden alle Präparate mit OSTEOSOFT[®] während der Schneideprozedur behandelt. Pro Präparat wurden zunächst ca. 6 Schnitte à 4 µm erzeugt. Nach Möglichkeit wurden

unmittelbar aufeinanderfolgende Serienschnitte akquiriert, um in den späteren immunhistochemischen Untersuchungen, bei denen zwei unterschiedliche Färbungen durchgeführt wurden, die korrespondierenden Bereiche innerhalb der Gewebsschnitte besser vergleichen zu können. In den Fällen, in denen eine Akquisition unmittelbarer Serienschnitte technisch nicht möglich war, wurden dennoch möglichst nah beieinander liegende Schnittebenen akquiriert, die sich weiterhin makroskopisch sowie mikroskopisch stark ähnelten. Die einzelnen Gewebsschnitte wurden vom Mikrotom auf das Paraffin-Streckbad übertragen und von dort auf die Objektträger überführt. Überschüssiges Wasser wurde entfernt. Nach Trocknen der Präparate wurden diese bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung konserviert. Zudem wurde von jedem Einzelpräparat mittels eines Färbeautomaten ein Übersichtspräparat in HE-Färbung erzeugt.

2.4.4 Immunhistochemische Färbung der Präparate

Reagenzien	Hersteller
Dako EnVision [®] + Dual Link System-HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark.
(DAB+) Kit	
Ethanol 99,8 % vergällt mit IPA, MEK und	AppliChem GmbH, Darmstadt,
Bitrex zur Analyse	Deutschland.
Gibco™, Fetales Bovines Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	Massachusetts, USA.
Hämatoxylinlösung nach Harris für die	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Mikroskopie	
Natriumchlorid (NaCl), reinst, Ph. Eur.,	AppliChem GmbH, Darmstadt,
USP	Deutschland.
Natriumhydroxid (NaOH), Pellets	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.

Tab. 13: Reagenzien für die Immunhistochemie.

Tab. 13, fortgesetzt: Reagenzien für die Immunhistochemie.

Salzsäure (HCI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.
Xylol (Isomere) > 98 %, rein, für die	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Histologie	
Zitronensäure, wasserfrei, gepulvert,	AppliChem GmbH, Darmstadt,
reinst, Ph. Eur., USP	Deutschland.
Antikörper	Hersteller
CDK5 (C-8) Rabbit Polyklonaler Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
Katalognummer: sc-173	Santa Cruz, Kalifornien, USA.
(Santa Cruz Biotechnology, Inc.,	
CDK5 (C-8): sc-173)	
PD-L1 Rabbit Polyklonaler Antikörper	Biorbyt LLC., San Francisco, Kalifornien,
Katalognummer: orb158130	USA.
(Biorbyt, PDL1 antibody orb158130)	
Material	Hersteller
Cytoseal™ 60	Thermo Fisher Scientific, Waltham,
	Massachusetts, USA.
Dampfgarer	Massachusetts, USA. Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern,
Dampfgarer	Massachusetts, USA. Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland.
Dampfgarer Deckgläser	Massachusetts, USA. Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik
Dampfgarer Deckgläser	Massachusetts, USA. Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland.
Dampfgarer Deckgläser F20 FiveEasy™, pH-Meter	Massachusetts, USA. Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland. Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA.
Dampfgarer Deckgläser F20 FiveEasy™, pH-Meter KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher,	Massachusetts, USA. Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland. Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland. Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA. KIMBERLY-CLARK GmbH, Koblenz,

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 x konzentrierter Citratpuffer, pH 6,0	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
(CB)	19,2 g Zitronensäure
	Zugabe konzentrierten NaOH bis pH = 6,0
5 x konzentrierter TBS-Puffer (TBS)	950 ml Doppelt destilliertes Wasser
	50 ml TRIS-HCI, 1,0 M, pH 8,0
	24,075 g NaCl
TRIS-HCI, 1,0 M, pH 8,0	1000 ml Doppelt destilliertes Wasser
	TRIS 121,14 g
	Zugabe konzentrierter HCI bis pH = 8,0

Tab. 14: Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie.

Zur Detektion der Zielantigene PD-L1 bzw. CDK5 wurden die zuvor erzeugten Gewebsschnitte (vgl. 2.4.3) einer immunhistochemischen Reaktion unterzogen. Zunächst wurden 1 x konzentrierte Arbeitslösungen für CB sowie TBS aus 10 x konzentriertem CB bzw. 5 x konzentriertem TBS-Puffer hergestellt. Die KPC- bzw. KPCC-Präparate wurden zunächst bei RT drei Waschvorgängen von je 5 Minuten mit Xylol zur Deparaffinierung unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte eine Rehydratation des Gewebes durch das Baden der Gewebeschnitte bei RT über je 5 Minuten in ca. 100 %, 95 % und 70 % Ethanol sowie in doppelt destilliertem Wasser. Die absteigenden Ethanollösungen wurden zuvor durch Verdünnung von Ethanol 99,8 % mit doppelt destilliertem Wasser erzeugt. Parallel hierzu wurde 1 x konzentrierter Citratpuffer mittels des Dampfgarers erhitzt, in dem nun über 20 Minuten die Objektträger zur Antigenwiederherstellung erhitzt wurden. Im Anschluss kühlten die Objektträger im Citratpufferbad für 30 Minuten ab. Nun wurden die Präparate mit einer Lösung aus dem Kit, die einen dualen endogenen Peroxidase-Block im Gewebe bewirkt, beträufelt und mit dieser über 10 Minuten bei RT, RH, inkubiert. Danach wurden die Präparate einmalig mit 1 x TBS gereinigt und zwei TBS-Bädern (1 x TBS) à 5 Minuten unterzogen. Im Anschluss erfolgte die Applikation einer 10 % FBS-Lösung (FBS verdünnt mit 1 x TBS) bei RT, RH, über 10 Minuten zum Zwecke des Blockens unspezifischer Antigene.

Nun wurde der Primärantikörper für das Zielantigen von Interesse appliziert. Im Falle des PD-L1-Antikörpers erfolgte die Applikation von ca. 50 bis 150 µl in Abhängigkeit der Fläche des Gewebeschnittes bei einer Verdünnung von 1: 400 mittels einer 1 % FBS-Lösung (FBS verdünnt mit 1 x TBS), die Applikation des CDK5-Antikörpers erfolgte analog bei einer Verdünnung von 1: 200. Im Anschluss wurden die Präparate zur Verhinderung von Austrocknung abgedeckt und über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte zunächst eine erneute Reinigung mittels 1 x TBS sowie zwei TBS-Bädern (1 x TBS) bei RT, RH, über je 5 Minuten. Danach wurde das HRP-Polymer aus dem Kit (Zweitantikörper zur Detektion des Primärantikörpers) appliziert und die Präparate wurden über 30 Minuten bei RT, RH, unter Schutz vor Lichteinfall inkubiert. Nun erfolgte eine weitere Reinigung mittels 1 x TBS sowie zwei TBS-Bädern (1x TBS) bei RT, RH, über je 5 Minuten. Hiernach wurde die DAB-Reaktionslösung (21 µl DAB+ Chromogen gelöst in 1 ml DAB+ Substratpuffer aus dem Kit) appliziert und die Präparate wurden für 4 Minuten bei Einsatz des PD-L1-Primärantikörpers bzw. für 3 Minuten bei Einsatz des CDK5-Primärantikörpers bei RT, RH, inkubiert. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper bewirkte einen makroskopisch sichtbaren Farbumschlag des Substrates ins Braune. Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger für ca. 3 Minuten in ein Behältnis mit doppelt destilliertem Wasser überführt, wonach eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin über 15 Sekunden bei RT erfolgte. Daraufhin wurden die Präparate rasch mehrfach mit doppelt destilliertem Wasser zur Entfernung überschüssigen Hämatoxylins gereinigt. Im Anschluss daran wurden die Präparate erneut dehydriert, wozu diese bei RT für jeweils 5 Minuten in aufsteigenden Ethanollösungen (70 %, 95 %, 100 %) sowie zweimalig über je 5 Minuten in Xylol gebadet wurden. Im Anschluss wurden die Präparate für mindestens 30 Minuten unter dem Abzug bei RT getrocknet. Am nächsten Tag wurden sie mittels Cytoseal™ 60 eingedeckelt. Zwischen allen Waschvorgängen sowie Überführungen von einem in ein anderes Medium wurde darauf geachtet, dass die Präparate nicht austrockneten, da dies die Detektionsreaktion teils stark beeinträchtigte oder völlig verhinderte. Bei Zeichen einer Störung der Färbereaktion wurde die Färbereaktion mit einem weiteren Gewebeschnitt des betroffenen Präparates wiederholt. Um zudem Schwankungen der Färbereaktion auszugleichen, wurden im Rahmen jeder durchgeführten CDK5- sowie PD-L1-Färbung grundsätzlich KPC- und KPCC-Präparate simultan gefärbt.

2.5 Histologische Auswertung

2.5.1 Feldauswahl und Fotodokumentation

Tab. 15: Material für die Fotodokumentation der Präparate.

Material	Hersteller
BX51 Systemmikroskop	Olympus, Tokio, Japan.
DP21 HD Mikroskopkamera	Olympus, Tokio, Japan.

Es erfolgte eine Auswahl von sechs Bildbereichen innerhalb jedes zuvor mittels IHC gefärbten Pankreaspräparats (vgl. 2.4). Zunächst wurden die zur Detektion von PD-L1 gefärbten Präparate untersucht. Hierbei wurden am Mikroskop in Übersichtsvergrößerungen selektiv die beiden Feldbereiche mit der optisch schwächsten sowie der optisch stärksten PD-L1-Intensität aufgesucht und diese fotografiert. Dann erfolgte die zufällige Auswahl und Fotodokumentation vierer weiterer Bereiche innerhalb der Präparate. Die Fotodokumentation der IHC-Präparate erfolgte stets in standardisierter Form. Hierzu wurden alle Bilder der Präparate bei einer ISO-Empfindlichkeit von 100 und einer Auflösung von 1600 x 1200 aufgenommen und im JPG-Format abgespeichert. Es wurden Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen (40 x, 100 x, 500 x, 1000 x) gemacht. Die Belichtungszeit bei 40 x bzw. 100 x Vergrößerung betrug 156,3 µs, bei 500 x Vergrößerung 1,3 ms und bei 1000 x Vergrößerung 4 ms. Der Schalter für den ND6-Filter des Mikroskops war eingeschaltet. Im Anschluss wurden die korrespondierenden Bereiche der mittels CDK5-Antikörper gefärbten Serienschnitte der entsprechenden Präparate aufgesucht und in identischer Weise dokumentiert. Hierbei wurde im Falle der Unmöglichkeit der Erzeugung unmittelbarer Serienschnitte die Zellmorphologie der Zellsubpopulationen in den einzelnen Präparatbereichen zwischen den für PD-L1 bzw. für CDK5 gefärbten Gewebeschnitten miteinander verglichen. Bei identischer Zellmorphologie im korrespondierenden Präparatsbereich wurde von einer Herkunft der Zellen aus einer gemeinsamen Stammpopulation ausgegangen. Damit einhergehend konnte ein exakter Vergleich zwischen PD-L1- und CDK5-Färbung für die einzelnen Teilbereiche und

Zellsubpopulationen innerhalb unserer Präparate gewährleistet werden. Vereinzelt wurden überdies nichtstandardisierte Bilder bestimmter HE-Präparate erzeugt. Anzumerken ist, dass für die Auswertung der Lebermetastasen pro Versuchsmaus lediglich bis zu drei zufällig ausgewählte metastatische Regionen abfotografiert wurden. In einigen Fällen wurden keine Lebermetastasen detektiert. Auch hierbei wurden entsprechend dem erläuterten Schema die korrespondierenden Regionen im Präparat der CDK5-Färbung aufgesucht und dokumentiert.







Abb. 4: Schematische Darstellung der Analysefeldauswahl innerhalb der Präparate: Sechs Bildbereiche wurden innerhalb iedes Präparats fotografiert (A bis F). Dabei wurden zunächst die PD-L1-Präparate analysiert und dokumentiert (rechte Grafik). Die Bereiche mit der optisch stärksten PD-L1-Intensität (A) sowie der optisch schwächsten PD-L1-Intensität (F) wurden gezielt aufgesucht und abfotografiert. Zudem wurden vier zufällige Bereiche mit einer konsekutiv zufälligen PD-L1-Intensität (B bis E) dokumentiert. Im Anschluss wurden die korrespondierenden Bereiche im Serienschnitt des zugehörigen CDK5-Präparats (A bis F, linke Grafik) aufgesucht und dokumentiert. Gemäß unserer Ausgangshypothese nach Dorand et al. (2016) erwarteten wir für die Präparate der KPC-Mäuse (WT für CDK5) eine korrelierende CDK5-Expressionsintensität für Bereiche starker (A), schwacher (F) oder zufälliger PD-L1-Intensitäten (B bis E). Dies ist hier schematisch durch unterschiedliche Farbintensitäten der einzelnen Felder (A bis F, vgl. rechte und linke Grafik) dargestellt.



Abb. 5: Exemplarische Darstellung der erzeugten Serienschnitte, PDAC-Gewebe aus Primärtumoren: Die Abbildung zeigt exemplarisch zwei Serienschnitte je eines KPC-sowie eines KPCC-PDAC-Mauspräparates aus Primärtumoren des Pankreas. Links sind die KPC-, rechts die KPCC-PDAC-Präparate gezeigt. Die Serienschnitte wurden einer immunhistochemischen Färbung für CDK5 (obere Reihe) bzw. für PD-L1 (untere Reihe) unterzogen (500 x Vergrößerung).



Abb. 6: Exemplarische Darstellung der erzeugten Serienschnitte, PDAC-Gewebe einer Lebermetastase: Die Abbildung zeigt von links nach rechts HE-, CDK5- sowie PD-L1-Färbung einer Lebermetastase eines KPC-Präparats in 100 x Vergrößerung (obere Reihe) bzw. in 500 x Vergrößerung (untere Reihe).

2.5.2 Vierstufige manuelle Klassifikation

Im Kontext histologischer Evaluationen ist es üblich, die Färbeintensitäten der einzelnen Präparate im Sinne einer Ordinalskala in vier Stufen einzuteilen: 0 - negativ; 1+ schwach positiv; 2+ - intermediär positiv; 3+ - stark positiv. Für gewöhnlich sehen die Untersucher rasch die einzelnen Bilder in definierter Vergrößerung durch und bewerten diese mit der Intensität von 0 bis 3+ entsprechend der subjektiv am häufigsten vorliegenden Intensitätsausprägung. Zur Minimierung des subjektiven Faktors auf das Evaluationsergebnis erzeugten wir zunächst am Computer mittels dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.8 (gimp.org) gesonderte Panels für PD-L1- sowie CDK5-Färbung, in denen wir alle Bilder der PD-L1- bzw. CDK5-Färbungen der KPC-Präparate aus den Bereichen mit maximaler PD-L1-Intensität (vgl. 2.5.1) entsprechend ihrer optischen Intensität aufreihten. Die Panels wurden im Anschluss im Bereich der schwachen Intensitäten um einzelne Bilder der KPCC-Präparate erweitert. Nun wurden

Grenzbereiche festgelegt, die definierten, bis zu welcher optischen Intensität im Bereich der Panels eine Intensität von 0, 1+, 2+ bzw. 3+ vorliegen sollte. Die folgenden Präparate wurden dann stets parallel in GIMP 2.8 geöffnet und mit dem Panel und entsprechend klassifiziert. So konnten wir mithilfe veralichen unserer Auswertungspanels eine objektivierte Einstufung der restlichen Präparate der Pankreaskarzinome bzw. Lebermetastasen erreichen. In den Fällen, in denen die zu evaluierenden Präparate in den Grenzbereichen der Panels lagen, zogen wir zur zu einer Intensitätsstufe zudem qualitativen Zuordnung Bildvergleiche des entsprechenden Präparats mit den grenzwertdefinierenden Präparaten bei stärkerer Vergrößerung hinzu. Auch die detektierten Lebermetastasen wurden analog mithilfe der erstellten Panels kategorisiert. Da sich ordinale Verteilungen mathematisch nicht sinnvoll zusammenfassen lassen, z.B. durch das Bilden von Durchschnittswerten, entspricht der Stichprobenumfang "n" im Rahmen der vierstufigen manuellen Klassifikation stets der Gesamtzahl der jeweils analysierten Präparatbereiche und weicht damit bei den Auswertungen der zufällig ausgewählten Präparatbereiche der PDAC sowie jenen der Lebermetastasen von der Gesamtzahl der verwendeten Versuchstiere ab. Die im Folgenden gezeigten assoziierten Grafiken wurden mit Microsoft[®] Excel 2007 unter Verwendung des Diagrammtyps "Säule" erstellt.



Abb. 7: Intensitätsstufen der vierstufigen manuellen Klassifikation: Die Abbildung zeigt die vier Intensitätsstufen exemplarisch anhand einer immunhistochemischen PD-L1-Färbung (1000 x Vergrößerung): A) Stark positiv (3+); B) Intermediär positiv (2+); C) Schwach positiv (1+); D) Negativ (0). Es handelt sich um die Bereiche mit der stärksten PD-L1-Intensität dreier KPC-Präparate (A bis C) sowie eines KPCC-Präparats (D).

2.5.3 Zweistufige manuelle Klassifikation

Bei der Entscheidungsfindung darüber, ob bestimmte Therapeutika, insbesondere Biologika, im klinischen Kontext eingesetzt werden sollten, wird es immer mehr zum Standard, die Zellen in einem Gewebe nach dessen Entnahme histopathologisch prozentual auf das Vorliegen bestimmter Antigene zu untersuchen. Hierbei wird vornehmlich zwischen Vorliegen (positiv) sowie Nichtvorliegen (negativ) des Antigens von Interesse unterschieden. Bei Erfüllung gewisser Prozentquoten im Bezug auf bestimmte Antigene kann dann der Einsatz entsprechender Therapeutika erwogen werden. Da PD-L1 mit seiner immunmodulierenden Wirkung immer mehr in den Fokus klinischer Therapiemöglichkeiten rückt. evaluierten wir ebenfalls unsere Zellsubpopulationen der einzelnen generierten Bilder im Hinblick auf positive bzw. negative Zellen für PD-L1 sowie für CDK5. Hierzu wurden je Präparatsbereich bis zu

200 Tumorzellen der Primärtumoren bzw. der Lebermetastasen manuell mithilfe eines Zellzählers bei 500 x Vergrößerung ausgezählt. In einigen Fällen hatten die einzelnen Zellsubpopulationen weniger als 200 Zellen bei 500 x Vergrößerung in einem definierten Bereich. In einem solchen Fall wurden alle Tumorzellen im vorliegenden Bereich ausgezählt und der Bereich wurde ggf. um den unmittelbar angrenzenden Bereich erweitert, um die Einzelstichprobe des Präparatbereiches von Interesse zu vergrößern. Um eine identische Gewichtung jedes einzelnen Bereichs zu gewährleisten wurde im Anschluss zunächst die Prozentquote positiver Zellen für PD-L1 bzw. für CDK5 für jedes einzelne untersuchte Präparatfeld gebildet. Aus diesen Einzelquoten wurden dann die Gesamtquoten PD-L1- bzw. CDK5-positiver Zellen für die KPC- sowie die KPCC-Mauspopulation errechnet. Der Stichprobenumfang "n" im Rahmen der zweistufigen manuellen Klassifikation entspricht somit stets der Anzahl der verwendeten Pankreata bzw. der Anzahl der Lebern mit Metastasennachweis und damit zugleich der Gesamtzahl der jeweils verwendeten Versuchstiere. Mit Hilfe von Microsoft[®] Excel 2007 wurden im Anschluss basierend auf den gesammelten Daten die im Folgenden gezeigten, assoziierten Grafiken unter Verwendung des Diagrammtyps "Säule" erstellt sowie angeführte Korrelationskoeffizienten R berechnet. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde unter Verwendung der Funktion "Vertikale Fehlerindikatoren" und "Fester Wert" eingefügt. p-Werte, Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes wurden unter Verwendung eines Online-Kalkulators für den ungepaarten t-Test berechnet (graphpad.com/quickcalcs/ttest1).

2.5.4 Zweistufige maschinelle Klassifikation

Material	Erwerbsmöglichkeit
ImageJ 1.52a	imagej.nih.gov/ij/
IHC Profiler, Version vom 09.05.2014	sourceforge.net/projects/ihcprofiler/

Tab. 16: Material für die zweistufige maschinelle Klassifikation.

Um einen Vergleich zwischen einer manuellen sowie einer automatischen bzw. maschinellen Auszählung herstellen zu können, evaluierten wir die Präparatsbereiche mit der optisch stärksten sowie schwächsten PD-L1-Intensität zusätzlich mit dem ImageJ-Plug-in IHC Profiler. IHC Profiler ist ein Programm, das für immunhistochemische DAB-Färbungen optimiert sei. Zudem sei es für die Detektion zytoplasmatischer sowie nukleärer Proteine optimiert (Varghese et al., 2014). Mithilfe eines Markierungswerkzeuges wurden die PDAC-Zellen der einzelnen Bilder der PD-L1bzw. CDK5-Präparate in der 500 x Vergrößerung markiert und anschließend mit IHC Profiler im Hinblick auf positive bzw. negative Pixel analysiert. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Standardeinstellungen von ImageJ 1.52a sowie IHC Profiler. Eine zusätzliche Veränderung und Optimierung der Grenzwerteinstellungen zur Definition negativer bzw. positiver Pixel erfolgte nicht. Der Stichprobenumfang "n" hierbei entspricht der Anzahl der verwendeten Pankreata und damit zugleich der Gesamtzahl der jeweils verwendeten Versuchstiere. Mit Hilfe von Microsoft[®] Excel 2007 wurden im Anschluss basierend auf den gesammelten Daten die im Folgenden gezeigten, assoziierten Grafiken unter Verwendung des Diagrammtyps "Säule" erstellt sowie angeführte Korrelationskoeffizienten R berechnet. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde unter Verwendung der Funktion "Vertikale Fehlerindikatoren" und "Fester Wert" und Standardfehler Standardabweichung eingefügt. p-Werte, Mittelwerte, des Mittelwertes wurden unter Verwendung eines Online-Kalkulators für den ungepaarten t-Test berechnet (graphpad.com/quickcalcs/ttest1).

3. Ergebnisse

Zur Evaluation des Einflusses von CDK5 auf die Expression von PD-L1 erfolgten invitro-Analysen anhand von Western Blots sowie in-vivo-Analysen mittels eines Mausmodells gemäß der eingangs dargelegten Protokolle (vgl. 2).

Es erfolgte die Durchführung des Western Blots zur Expressionsanalyse von PD-L1 sowie CDK5 in den zuvor kultivierten Zelllinien (vgl. 2.1 und 2.2). Das Expressionsprofil von CDK5 wurde zweimal im Western Blot für die PDAC-Zellinien (n = 2) untersucht, jenes von PD-L1 wurde dreimal (n = 3) untersucht. Die weitere Analyse der erhaltenen Proteinbanden (Abb. 8 und Abb. 9) zur Bestimmung der relativen Expression beider Proteine erfolgte mit dem Programm ImageJ 1.53, wie unter 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben.

Alle PDAC-Zelllinien zeigten stets eine Expression von CDK5 (100%). Auch die nichtkarzinomatöse Zelllinie hTERT-HPNE zeigte sich positiv für CDK5. Vier der getesteten PDAC-Zelllinien (SU.86.86, BxPC-3, PANC-1 und Panc 10.05) präsentierten zugleich eine PD-L1-Expression (57,14%) (Abb. 9 bis 11).

AsPC-1 zeigte die stärkste relative CDK5-Expression (2,70) bei fehlender PD-L1-Expression. 5/7 (71,43%) der Zelllinien (MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-1, BxPC-3, und Panc 10.05) zeigten eine relative CDK5-Expression von 0,61 bis 0,93 und lagen damit nahe dem Mittelwert der relativen Proteinexpression von 1,00 (Abb. 10 bis 11). Drei Zelllinien (SU.86.86, BxPC-3 und PANC-1) zeigten stets eine PD-L1-Expression: SU.86.86 zeigte die stärkste relative PD-L1-Expression mit 4,36 ± 1,15 SD, gefolgt von BxPC-3 (1,49 ± 0,75 SD) und PANC-1 (0,93 ± 0,87 SD). Außerdem zeigte Panc 10.05 (0,22 ± 0,38 SD) in zumindest einem der drei Western Blots für PD-L1 Anhalt für eine PD-L1-Expression. Neben AsPC-1 waren auch MIAPaCa-2 und Capan-1 stets negativ für PD-L1 (Abb. 8 bis 11).

Die relative Expression von CDK5 und PD-L1 unter den vier PD-L1-positiven Zelllinien war nicht konkordant: Die stärkste CDK5-Expression der vier positiv auf PD-L1-getesteten Zelllinien zeigte BxPC-3 (0,93 \pm 0,18 SD), gefolgt von PANC-1 (0,92 \pm 0,56 SD), Panc 10.05 (0,61 \pm 0,36 SD) und SU.86.86 (0,11 \pm 0,02 SD). SU.86.86 zeigte somit bei höchster relativer PD-L1-Expression die niedrigste relative CDK5-Expression. Die übrigen drei PD-L1-positiven Zelllinien nahmen jedoch im Bezug auf die relative

CDK5-Expression eine identische Reihenfolge ein: BxPC-3 zeigte eine stärkere relative CDK5- sowie PD-L1-Expression als PANC-1 und Panc 10.05, wobei BxPC-3 (0,93 \pm 0,18 SD) und PANC-1 (0,92 \pm 0,56 SD) eine annähernd gleiche relative CDK5-Expression aufwiesen. Bei geringen Stichprobengrößen ergaben sich allerdings große Standardabweichungen, sodass die ermittelte Rangfolge der PDAC-Zelllinien im Bezug auf CDK5-Expression und PD-L1-Expression unsicher ist. Entgegen Western-Blot-Resultaten andernorts (Liu et al., 2019) zeigte sich eine negative Korrelation für die Expression von CDK5 und PD-L1 im Western Blot (R = -0,542) (Abb. 10 und Abb. 11).

Im Rahmen unserer in-vivo-Experimente generierten wir erfolgreich transgene Mauslinien der Genotypen LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre (KPC) und LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; CDK5 fl/fl (KPCC) (vgl. 2.3). Insgesamt konnten 18 KPC-Mäuse und 22 KPCC-Mäuse generiert und in den Versuch eingegliedert werden. Alle 18 KPC- sowie alle 22 KPCC-Mäuse entwickelten im Verlauf PDAC. Die entstandenen Bauchspeicheldrüsentumoren sowie die Lebern der Mäuse wurden asserviert und immunhistochemischen Färbungen für CDK5 und PD-L1 unterzogen (vgl. verschiedener 2.4). Die weitere histologische Analyse im Rahmen dreier Analysemethoden erfolgte gemäß den zuvor angeführten Protokollen (vgl. 2.5): Vier Bereiche im histologischen PD-L1-Präparat jedes Primärtumors wurden zufällig die ausgewählt und analysiert. Anschließend wurden korrespondierenden Tumorsubpopulationen in den korrespondierenden Serienschnitten der CDK5-Präparate analysiert. Ergänzend suchten wir die beiden Präparatbereiche mit maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität und auch deren korrespondierende Präparatbereiche in den CDK5-Präparaten gezielt auf und analysierten diese separat. Im Verlauf hatten sich zudem bei 11/18 (61,11 %) der KPC-Mäuse (CDK5 WT) sowie bei 14/22 (63,64 %) der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) in einem singulären Leberschnittpräparat zwischen 1 und 3 Lebermetastasen gezeigt. Auch diese Leberschnittpräparate wurden in identischer Weise analysiert.

Zunächst erfolgte die Auswertung mittels vierstufiger manueller Klassifikation (vgl. 2.5.2 und 3.2.1). Die KPC-Mäuse (CDK5 WT) zeigten hierbei in annähernd allen Fällen aller Vergleichsgruppen (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) größere Anteile innerhalb der drei Intensitätsstufen positiver Intensität für PD-L1 (Abb. 12; Abb. 14; Abb. 16; Abb. 18)

sowie für CDK5 als die KPCC-Population (CDK5 fl/fl) (Abb. 13; Abb. 15; Abb. 17; Abb. 19).

So zeigten sich in den Präparatbereichen zufälliger PD-L1-Intensität 2,78 % der KPC-Präparatbereiche stark positiv für PD-L1, 29,17 % intermediär positiv und 68,06 % schwach positiv. Kein zufällig ausgewählter KPC-Präparatbereich war hierbei negativ für PD-L1. 25,00 % der KPCC-Präparatbereiche zeigten sich intermediär positiv für PD-L1, 51,14 % schwach positiv und 23,86 % negativ. Kein zufällig ausgewählter KPCC-Präparatbereich zeigte sich stark positiv für PD-L1 (Abb. 12). Eine ähnliche prozentuale Verteilung zeigte sich in den korrespondierenden Serienschnitten der CDK5-Färbung im Falle der KPC-Population: 5,56 % der KPC-Präparatbereiche zeigten sich stark positiv für CDK5, 27,78 % intermediär positiv, 62,50 % schwach positiv und 4,17 % negativ. die Erwartungsgemäß präsentierte KPCC-Mauspopulation (CDK5 fl/fl) bei konditionellem Knock-Out von CKD5 entsprechend eine deutlich herabgesetzte Positivität für CDK5: 1,14 % der KPCC-Präparatbereiche zeigten sich intermediär positiv für CDK5, 50,00 % zeigten sich schwach positiv und 48,86 % negativ (Abb. 13).

In den Präparatbereichen maximaler PD-L1-Intensität zeigten sich 11,11 % der KPC-Präparate stark positiv für PD-L1, 66,67 % intermediär positiv und 22,22 % schwach positiv. 9,09 % der KPCC-Präparate zeigten sich stark positiv für PD-L1, 50,00 % intermediär positiv, 27,27 % schwach positiv und 13,64 % negativ (Abb. 14). Damit zeigte sich sowohl für die KPC- als auch für die KPCC-Population eine deutliche Verschiebung hin zu stärker positiven Intensitätsstufen im Vergleich zu den Präparatbereichen mit zufälliger PD-L1-Intensität (Abb. 12 und Abb. 14). Eine Verschiebung hin zu stärker positiven Intensitätsstufen zeigte sich auch in den korrespondierenden Serienschnitten der CDK5-Färbung Falle im beider Mauspopulationen: 16,67 % der KPC-Präparate zeigten sich stark positiv für CDK5, 44,44 % intermediär positiv und 38,89 % schwach positiv. 4,55 % der KPCC-Präparate zeigten sich intermediär positiv für CDK5, 72,73 % zeigten sich schwach positiv und 22,73 % negativ (Abb. 15). Damit zeigte sich für beide Mauspopulationen bei vermehrtem PD-L1-Nachweis zugleich eine vermehrte Positivität des Gewebes für CDK5 (Abb. 13 und Abb. 15).

In den Präparatbereichen minimaler PD-L1-Intensität zeigten sich 100,00 % der KPC-Präparate schwach positiv für PD-L1. 50,00 % der KPCC-Präparate zeigten sich schwach positiv für PD-L1 und 50,00 % negativ (Abb. 16). Damit zeigte sich sowohl für die KPC- als auch für die KPCC-Population eine deutliche Verschiebung hin zu weniger positiven Intensitätsstufen bzw. hin zu vermehrter Negativität für PD-L1 im Vergleich zu den Präparatbereichen mit zufälliger PD-L1-Intensität (Abb. 12 und Abb. 16). Eine Verschiebung hin zu weniger positiven Intensitätsstufen bzw. hin zu vermehrter Negativität zeigte sich auch in den korrespondierenden Serienschnitten der CDK5-Färbung im Falle beider Mauspopulationen: 16,67 % der KPC-Präparate zeigten sich intermediär positiv für CDK5, 72,22 % schwach positiv und 11,11 % negativ. 31,82 % der KPCC-Präparate zeigten sich schwach positiv für CDK5 und 68,18 % negativ (Abb. 17). Damit zeigte sich für beide Mauspopulationen bei verringertem PD-L1-Nachweis (passend zu den Auswertungsergebnissen der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität, s. oben) zugleich eine verringerte Positivität des Gewebes für CDK5 (Abb. 13 und Abb. 17).

In den untersuchten Leberschnittpräparaten mit Lebermetastasen zeigten sich 18,18 % der KPC-Präparatbereiche intermediär positiv für PD-L1, 77,27 % schwach positiv und 4,55 % negativ. 3,57 % der KPCC-Präparatbereiche zeigten sich stark positiv für PD-L1, 14,29 % zeigten sich intermediär positiv, 53,57 % schwach positiv und 28,57 % negativ (Abb. 18). In den korrespondierenden Serienschnitten der Lebermetastasen zeigten sich 4,55 % der KPC-Präparatbereiche stark positiv für CDK5, 9,09 % zeigten sich intermediär positiv, 68,18 % schwach positiv und 18,18 % negativ. 3,57 % der KPCC-Präparatbereiche zeigten sich stark positiv für CDK5, 7,14 % zeigten sich intermediär positiv, 46,43 % schwach positiv und 42,86 % negativ (Abb. 19). Bei Vergleich der Intensitätsaufteilungen der vier Untersuchungsgruppen (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) ähnelten die Intensitätsverteilungen der Lebermetastasen für PD-L1 sowie für CDK5, die ihrerseits selbst Bereiche zufälliger PD-L1-Intensität darstellten, am stärksten den jeweiligen Intensitätsverteilungen innerhalb der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität im Primarius (Abb. 12; Abb. 13; Abb. 18; Abb. 19).

Konkordant mit den beobachteten Phänomenen in der vierstufigen manuellen Klassifikation präsentierten sich auch unsere Ergebnisse der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3 und 3.2.2). Hierbei zeigten sich bei jedem der vier analysierten Testpaare aus KPC- und KPCC-Präparaten (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression. PDAC-Zellen der KPC- bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für PD-L1 zu 83,56 % bzw. 51,96 % in den Bereichen zufälliger PD-L1-Expression, zu 86,14 % bzw. 63,79 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression, zu 73,38 % bzw. 32,72 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression sowie zu 76,50 % bzw. 51,96 % in den Lebermetastasen (Abb. 20; Abb. 23; Abb. 26; Abb. 29). Wie schon in der vierstufigen manuellen Klassifikation zeigten sich auch in der zweistufigen manuellen Klassifikation aufgrund des konditionellen CDK5-Knock-Outs (KPCC-Mäuse) zu erwartende Unterschiede in der CDK5-Expression. Auch diese Unterschiede waren bei allen vier Testpaaren statistisch signifikant: KPC- bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für CDK5 zu 84,40 % bzw. 13,07 % in den Bereichen zufälliger PD-L1-Expression, zu 85,76 % bzw. 21,46 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression, zu 59,49 % bzw. 11,86 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression sowie zu 52,16 % bzw. 16,48 % in den Lebermetastasen (Abb. 21; Abb. 24; Abb. 27; Abb. 30).

Bei Auftragen der einzelnen korrespondieren Wertepaare für CDK5- und PD-L1-Färbung ließ sich zudem für alle vier KPC-Subgruppen (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetasen) eine positive Korrelation nachweisen (Korrelationskoeffizienten R (WT) = 0,180, 0,446, 0,298 bzw. 0,174). Innerhalb der KPCC-Subgruppen zeigte sich in drei Fällen eine negative Korrelation (Präparatbereiche zufälliger, maximaler sowie minimaler PD-L1-Intensität im Primarius) und in nur einem Fall eine positive Korrelation (Lebermetastasen) (Korrelationskoeffizienten R (fl/fl) = -0,104, -0,124, -0,316 bzw. 0,319). Zugleich zeigte sich, dass innerhalb aller vier Testpaare die KPC-Präparate (CDK5 WT) größere Maximal-, Minimal- und Mittelwerte sowohl für CDK5 als auch für PD-L1 aufwiesen als die entsprechenden Vergleichsgruppen der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) (Abb. 22; Abb. 25; Abb. 28; Abb. 31). Desweiteren erfolgte eine Überlagerung der Wertegruppen des Anteils CDK5-positiver Zellen lediglich innerhalb der Testpaare mit vergleichsweise geringem Anteil CDK5-positiver Zellen innerhalb der KPC-Population (Präparate minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) (Abb. 28; Abb. 31). In

den Bereichen maximaler PD-L1-Intensität im Primarius zeigten sich KPC- und KPCC-Testgruppen bei annähernd identischem Minimal- (KPC) bzw. Maximalwert (KPCC) im Bezug auf die Anteile CDK5-positiver Zellen gerade eben von einander abgegrenzt. Beachtlich war, dass innerhalb dieser Bereiche mit hohem Anteil PD-L1-positiver Zellen der Anteil CDK5-positiver Zellen auch in der KPCC-Mauspopulation (CDK5 fl/fl) in 27,27 % (6/22) der Fälle über 30 % lag (Abb. 25). Innerhalb der anderen drei analysierten KPCC-Subgruppen (Präparatbereiche zufälliger bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) zeigte jeweils kein bzw. lediglich ein Präparat (0 % bzw. 4,55 %) eine CDK5-Positivität von über 30 % (Abb. 22; Abb. 28; Abb. 31). Eine sehr deutliche Separation der KPC- und KPCC-Vergleichsgruppen zeigte sich in den Bereichen zufälliger PD-L1-Intensität (Abb. 22).

Ergänzend erfolgten zudem Analysen der Feldbereiche mit maximaler sowie minimaler PD-L1-Positivität unter Verwendung des Programms IHC Profiler im Rahmen der zweistufigen maschinellen Klassifikation (vgl. 2.5.4 und 3.2.3). Hierbei zeigten sich ebenfalls bei jedem analysierten Testpaar aus KPC- und KPCC-Präparaten (Präparatbereiche maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius) statistisch signifikante Unterschiede in der PD-L1- bzw. CDK5-Expression. PDAC-Zellen der KPC-bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für PD-L1 zu 94,83 % bzw. 78,34 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression sowie zu 78,41 % bzw. 50,70 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression (Abb. 32; Abb. 35). KPC- bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für CDK5 zu 84,47 % bzw. 68,06 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression sowie zu 74,81 % bzw. 54,80 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression (Abb. 33; Abb. 36).

Bei Vergleich der Ergebnisse des IHC Profilers (zweistufige maschinelle Klassifikation) mit jenen der zweistufigen manuellen Klassifikation zeigten sich innerhalb der KPC-Mauspopulation PD-L1-positive Anteile von 94,83 % bzw. 86,14 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) (Abb. 23; Abb. 32) sowie 78,41 % bzw. 73,38 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 26; Abb. 35). Für die KPCC-Mauspopulation ergaben sich im Vergleich PD-L1-positive Anteile von 78,34 % bzw. 63,79 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) (Abb. 23; Abb. 32) sowie 50,70 % bzw. 32,72 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 26; Abb. 35). Im Bezug auf die CDK5-Expression zeigte die KPC-Mauspopulation CDK5-Anteile von 84,47 % bzw. 85,76 % (Bereiche maximaler PD-L1-

Intensität) in zweistufiger maschineller bzw. zweistufiger manueller Klassifikation (Abb. 24; Abb. 33) sowie von 74,81 % bzw. 59,49 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 27; Abb. 36). Die KPCC-Mauspopulation zeigte im Vergleich CDK5-positive Anteile von 68,06 % bzw. 21,46 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) (Abb. 24; Abb. 33) sowie von 54,80 % bzw. 11,86 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 27; Abb. 36). Konsekutiv zeigten auch die Wertepaargruppen von KPC- sowie KPCC-Mauspopulation stärkere Überlagerungen im Bezug auf CDK5- und PD-L1-Expression. Zusätzlich ergaben sich im Rahmen der Auswertung mittels IHC Profiler positive Korrelationen für CDK5- und PD-L1-Expression in beiden KPC- sowie KPCC-Testgruppen (Abb. 34; Abb. 37). Im Vergleich zur zweistufigen manuellen Klassifikation stufte IHC Profiler einige Präparatbereiche als deutlich positiver ein, sodass sich unter Vergleich der beiden Analysemethoden in 5/8 (62,50 %) der Fälle statistisch signifikante Unterschiede ergaben (Tab. 25; Tab. 26; Tab. 27; Tab. 28). In einem weiteren Fall wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zudem nur knapp verfehlt (p = 0.0645) (Tab. 26). Wie eingangs erläutert, wurde IHC Profiler als objektives Analysewerkzeug ohne weitere Optimierung in die Versuchsauswertung eingegliedert (vgl. 2.5.4). Im Rahmen der Auswertung wurde deutlich, dass IHC Profiler ohne weitere Modifikationen einerseits einen sehr niedrigen Grenzwert aufwies, sodass bereits früh Pixel als positiv eingestuft wurden. Zugleich waren die Grenzwerte zwischen einzelnen Intensitätsstufen (stark, intermediär bzw. schwach positiv sowie negativ), die das Programm zeitgleich ebenfalls analysierte, sehr hoch, sodass nahezu alle als positiv bezifferten Pixel von IHC Profiler lediglich als schwach positiv gewertet wurden (Daten nicht gezeigt). Beide Beobachtungen standen in starkem Kontrast zu den Ergebnissen der zweistufigen sowie vierstufigen manuellen Klassifikation.

Da wir im Rahmen unserer Literaturrecherche auf Berichte beschriebener Heterogenitäten der Proteinexpression im Tumorgewebe stießen (Madore et al., 2015; McLaughlin et al., 2016) und derartige Unterschiede im Rahmen der mikroskopischen Analyse selber, sowohl für PD-L1 als auch für CDK5, beobachteten, erfolgte eine weitere Untersuchung zur Ermittlung der Homogenität bzw. Heterogenität des Tumorgewebes: Berücksichtigt hierbei wurde eine Vergabe von Intensitätsabstufungen unter Einschluss von mindestens drei Intensitätsabstufungen innerhalb der vierstufigen manuellen Klassifikation (z.B. 3+, 2+ und 1+ bzw. 3+ und 1+) (vgl. 2.5.2) als Zeichen für eine besonders starke Heterogenität unter Berücksichtigung aller sechs analysierten Felder im Primarius (Felder zufälliger, maximaler sowie minimaler PD-L1-Intensität). Im Bezug auf die PD-L1-Expression zeigte sich eine solche Heterogenität bei 2/18 (11,11 %) der KPC- bzw. bei 6/22 (27,27 %) der KPCC-Präparate des Primarius. Im Rahmen der CDK5-Evaluation wurde eine solche Färbeheterogenität bei 3/18 (16,67 %) der KPC- bzw. bei 2/22 (9,09 %) der KPCC-Präparate des Primarius detektiert. Basierend hierauf bewerteten wir das PDAC-Gewebe innerhalb eines Tumors mehrheitlich als weitgehend homogen im Bezug auf PD-L1- sowie CDK5-Expressionsverhalten. Dennoch zeigten die Ergebnisse, dass es vereinzelt starke Heterogenitäten gab (Daten nicht gezeigt).

Unsere Ergebnisse zusammenfassend, konnten wir die Beobachtung, dass eine gesteigerte CDK5-Expression im Western Blot mit einer erhöhten PD-L1-Expression einherging (Liu et al., 2019), hier nicht replizieren. Im Rahmen unserer Western-Blot-Resultate zeigte sich konträr dazu eine negative Korrelation für die Expression von CDK5 und PD-L1.

Im Rahmen unserer in-vivo-Experimente hingegen zeigten sich positive Korrelationen für die Expression von CDK5 und PD-L1: In der vierstufigen manuellen Klassifikation zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expressionsintensität von PD-L1 sowie CDK5 zwischen KPC- und KPCC-Mauspopulation, wobei die KPC-Population eine vermehrte Expression beider Proteine präsentierte. Konkordant damit zeigten sich in der zweistufigen manuellen Klassifikation stets statistisch signifikante Unterschiede in der PD-L1- sowie in der CDK5-Expression zwischen KPC- und KPCC-Mauspopulation. Durch den Nachweis einer signifikant niedrigeren CDK5-Expression in der KPCC-Mauspopulation konnten wir den Erfolg des konditionellen Cre-Rekombinasevermittelten Knock-Outs in der KPCC-Mauspopulation bestätigen. Da die KPC-Mauspopulation (CDK5 WT) jeweils mehr PD-L1- als auch mehr CDK5 im Vergleich zur KPCC-Mauspopulation (CDK5 fl/fl) exprimierte und sich positive Korrelationen der korrespondieren Wertepaare für CDK5- und PD-L1-Färbung für alle vier KPC-Subgruppen (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetasen) nachweisen ließen, konnten wir zugleich das Hauptziel dieser Arbeit bestätigen und eine gesteigerte PD-L1-Expression unter vermehrter CDK5Expression bzw. eine verringerte PD-L1-Expression unter verringerter CDK5-Expression auch für das duktale Adenokarzinom des Pankreas nachweisen.

Das Programm IHC Profiler (zweistufige maschinelle Klassifikation) konnte zudem als objektives Hilfsmittel die zunächst mittels vierstufiger sowie zweistufiger manueller Klassifikation detektierten Unterschiede in CDK5- und PD-L1-Expression zwischen KPC- und KPCC-Population bekräftigen, da sich auch hierbei stets statistisch signifikante Unterschiede sowohl für PD-L1- als auch für CDK5-Expression zwischen KPC- und KPCC-Mauspopulation nachweisen ließen. Zugleich wurde schnell deutlich, dass eine rein maschinelle Auswertung mit dem Programm IHC Profiler einer weiteren Optimierung diverser Parameter bedarf.




3.1.1 PD-L1-Expressionsprofil in PDAC-Zelllinien im Western Blot

Abb. 8: PD-L1-Expressionsprofil der PDAC-Zelllinien im Western Blot: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Western Blots im Hinblick auf das Expressionsprofil für PD-L1 sieben getesteter PDAC-Zelllinien (von links nach rechts: MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, SU.86.86 und Panc 10.05): A) Panc-1, BxPC-3 und SU.86.86 zeigen positive Banden bei einem Molekulargewicht von 32 kDa unter Inkubation mit dem verwendeten PD-L1-Antikörper bei einer Verdünnung von 1 : 500. Hierbei zeigt SU.86.86 die optisch stärkste Bande für PD-L1, gefolgt von PANC-1 und BxPC-3.; B) Alle sieben Zelllinien zeigen positive Banden bei einem Molekulargewicht von 37 kDa unter Inkubation mit dem verwendeten GAPDH-Antikörper bei einer Verdünnung von 1 : 1000. Capan-1 und AsPC-1 zeigen optisch schmalere und zugleich geringfügig schwächer fluoreszierende Banden als die anderen fünf Zelllinien. Abbildung B wurde mittels Fusion SL[™] Geldokumentationssystem generiert, da es während des Versuchs zu einem Defekt des ansonsten verwendeten ChemiDoc[™] XRS+ Geldokumentationssystem kam (vgl. 2.2.4).



3.1.2 CDK5-Expressionsprofil in PDAC-Zelllinien im Western Blot

Abb. 9: CDK5-Expressionsprofil der HPNE- sowie PDAC-Zelllinien im Western Blot: Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Western Blots im Hinblick auf das Expressionsprofil für CDK5 einer nicht-karzinomatösen hTERT-HPNE-Zelllinie (erste Bande von links) sowie sieben getesteter PDAC-Zelllinien (anschließend an hTERT-HPNE, von links nach rechts: MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, SU.86.86 und Panc 10.05): A) Alle acht Zelllinien zeigen positive Banden bei einem Molekulargewicht von 35 kDa unter Inkubation mit dem verwendeten CDK5-Antikörper bei einer Verdünnung von 1 : 500. PANC-1 zeigt die optisch stärkste Bande von CDK5, gefolgt von hTERT-HPNE, MIAPaCa-2, AsPC-1, BxPC-3 sowie Panc 10.05. Capan-1 und SU.86.86 zeigen deutlich schmalere und schwächer fluoreszierende Banden als die anderen sechs Zelllinien; B) Alle acht Zelllinien zeigen positive Banden bei einem Molekulargewicht von 37 kDa unter Inkubation mit dem verwendeten GAPDH-Antikörper bei einer Verdünnung von 1 : 1000. Capan-1 und AsPC-1 zeigen schwächer fluoreszierende Banden als die anderen sechs Zellinien zeigen anderen sechs Zellinien; B) Alle acht Zelllinien zeigen positive Banden bei einem Molekulargewicht von 37 kDa unter Inkubation mit dem verwendeten GAPDH-Antikörper bei einer Verdünnung von 1 : 1000. Capan-1 und AsPC-1 zeigen schwächer fluoreszierende Banden als die anderen sechs Zellinien.



3.1.3 Relative Expression von PD-L1 und CKD5 im Western Blot im Vergleich

Abb. 10: Relative Expression von CDK5- und PD-L1 im Western Blot: Die Grafik zeigt die relative Expression für CDK5 sowie PD-L1 von sieben PDAC-Zelllinien (MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, SU.86.86 und Panc 10.05) im Western Blot. Zudem zeigt die Grafik die relative gemittelte Expression von 1,00 aller PDAC-Zelllinien und die gemittelten Standardabweichungen für CDK5 bzw. für PD-L1. Bei Berechnung der gemittelten Standardabweichung für PD-L1 wurden lediglich die vier PD-L1-positiven PDAC-Zelllinien berücksichtigt. Das Expressionsprofil von CDK5 wurde zweimal im Western Blot (n = 2) untersucht, jenes von PD-L1 wurde dreimal (n = 3) untersucht. Alle Zelllinien zeigten eine Expression von CDK5, wobei die relative CDK5-Expression von AsPC-1 (2,70 \pm 0,60 SD) am stärksten ausfiel. Schwächere Expressionen von CDK5 zeigten Panc 10.05 (0,61 \pm 0,36 SD) und SU.86.86 (0,11 \pm 0,02 SD). Vier der sieben PDAC-Zelllinien zeigten eine Expression von PD-L1. SU.86.86 zeigte die stärkste relative PD-L1-Expression (4,36 \pm 1,15 SD), gefolgt von BxPC-3 (1,49 \pm 0,75 SD), PANC-1 (0,93 \pm 0,87 SD) und Panc 10.05 (0,22 \pm 0,38 SD).



Abb. 11: Korrelation der Expression von CDK5- und PD-L1 im Western Blot: Die Grafik zeigt die relative Expression für CDK5 sowie PD-L1 von sieben PDAC-Zelllinien (MIAPaCa-2, PANC-1, Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, SU.86.86 und Panc 10.05) im Western Blot. Zudem zeigt die Grafik die relative gemittelte Expression von 1,00 aller PDAC-Zelllinien. Das Expressionsprofil von CDK5 wurde zweimal im Western Blot (n = 2) untersucht, jenes von PD-L1 wurde dreimal (n = 3) untersucht. Alle Zelllinien zeigten eine Expression von CDK5, doch nur vier der Zelllinien zeigten auch eine PD-L1-Expression. AsPC-1 zeigte die stärkste relative CDK5-Expression (2,70) bei fehlender PD-L1-Expression. 5/7 (71,43%) der Zelllinien zeigten eine relative CDK5-Expression von 0,61 bis 0,93 und lagen damit knapp unter dem Mittelwert. SU.86.86 zeigte die schwächste CDK5-Expression (0,11) bei zugleich stärkster relative PD-L1-Expression (4,36). BxPC-3 und PANC-1 zeigte neine negative Korrelation von CDK5 und PD-L1 im Western Blot (R = -0,542).



3.2

Abb. 12: PD-L1-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die zufällige Auswahl und Fotodokumentation vierer Präparatbereiche, die mittels vierstufiger manueller Klassifikation ausgewertet wurden. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). Insgesamt wurden 72 bzw. 88 (Stichprobenumfang n) histologische Bereiche analysiert. 2/72 (2,78 %) der KPC-Präparatbereiche (CDK5 WT) zeigten sich stark positiv für PD-L1, 21/72 (29,17 %) intermediär positiv und 49/72 (68,06 %) schwach positiv. 22/88 (25,00 %) der KPCC-Präparatbereiche (CDK5 fl/fl) zeigten sich intermediär positiv für PD-L1, 45/88 (51,14 %) schwach positiv und 21/88 (23,86 %) negativ.

3.2.1 Ergebnisgrafiken der vierstufigen manuellen Klassifikation

Ergebnisgrafiken der histologischen Analysemethoden



13: CDK5-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität im Abb. Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation der vier korrespondierenden Präparatbereiche zu den zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitten bzw. Präparatbereichen (vgl. Abb. 12). Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). Insgesamt wurden 72 bzw. 88 (Stichprobenumfang n) histologische Bereiche analysiert. 4/72 (5,56 %) der KPC-Präparatbereiche (CDK5 WT) zeigten sich stark positiv für CDK5, 20/72 (27,78 %) intermediär positiv, 45/72 (62,50 %) schwach positiv und 3/72 (4,17 %) negativ. 1/88 (1,14 %) der KPCC-Präparatbereiche (CDK5 fl/fl) zeigte sich intermediär positiv für CDK5, 44/88 (50,00 %) zeigten sich schwach positiv und 43/88 (48,86 %) negativ.



Abb. 14: PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die selektive Auswahl und Fotodokumentation des Präparatbereiches mit der stärksten PD-L1-Intensität. Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). 2/18 (11,11 %) der KPC-Präparate (CDK5 WT) zeigten sich stark positiv für PD-L1, 12/18 (66,67 %) intermediär positiv und 4/18 (22,22 %) schwach positiv. 2/22 (9,09 %) der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zeigten sich stark positiv für PD-L1, 11/22 (50,00 %) intermediär positiv, 6/22 (27,27 %) schwach positiv und 3/22 (13,64 %) negativ.



Abb. 15: CDK5-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation des korrespondierenden Präparatbereiches zu dem zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitt bzw. Präparatbereiche erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). 3/18 (16,67 %) der KPC-Präparate (CDK5 WT) zeigten sich stark positiv für CDK5, 8/18 (44,44 %) intermediär positiv und 7/18 (38,89 %) schwach positiv. 1/22 (4,55 %) der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zeigte sich intermediär positiv für CDK5, 16/22 (72,73 %) zeigten sich schwach positiv und 5/22 (22,73 %) negativ.



Abb. 16: PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die selektive Auswahl und Fotodokumentation des Präparatbereiches mit der schwächsten PD-L1-Intensität. Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). 18/18 (100,00 %) der KPC-Präparate (CDK5 WT) zeigten sich schwach positiv für PD-L1 und 11/22 (50,00 %) negativ.



Abb. 17: CDK5-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation des korrespondierenden Präparatbereiches zu dem zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitt bzw. Präparatbereiche mit schwächster PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 16). Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). 3/18 (16,67 %) der KPC-Präparate (CDK5 WT) zeigten sich intermediär positiv für CDK5, 13/18 (72,22 %) schwach positiv und 2/18 (11,11 %) negativ. 7/22 (31,82 %) der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zeigten sich schwach positiv für CDK5 und 15/22 (68,18 %) negativ.



Abb. 18: PD-L1-Expression der Lebermetastasen, vierstufige manuelle Klassifikation: Bei 11/18 (61,11 %) der KPC-Mäuse (CDK5 WT) sowie bei 14/22 (63,64 %) der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) wurden in einem singulären Leberschnittpräparat zwischen 1 und 3 Lebermetastasen sicher detektiert und fotografisch dokumentiert. Hierdurch ergaben sich Gesamtanzahlen (Stichprobenumfang 22 sicher n) von detektierten Lebermetastasen für die KPC-Präparate (CDK5 WT) bzw. von 28 sicher detektierten Lebermetastasen für die KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl). Diese Leberschnittpräparate waren zuvor einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen worden (vgl. 2.4). Die Auswertung der Lebermetastasen erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden die ausgewählten Präparatbereiche entsprechend ihrer Färbeintensität als stark positiv (3+), intermediar positiv (2+), schwach positiv (1+) oder negativ (0) klassifiziert (vgl. 2.5 und 2.5.2). 4/22 (18,18 %) der KPC-Präparatbereiche (CDK5 WT) zeigten sich intermediär positiv für PD-L1, 17/22 (77,27 %) schwach positiv und 1/22 (4,55 %) negativ. 1/28 (3,57 %) der KPCC-Präparatbereiche (CDK5 fl/fl) zeigte sich stark positiv für PD-L1, 4/28 (14,29 %) zeigten sich intermediär positiv, 15/28 (53,57 %) schwach positiv und 8/28 (28,57 %) negativ.



Abb. 19: CDK5-Expression der Lebermetastasen, vierstufige manuelle Klassifikation: Bei 11/18 (61,11 %) der KPC-Mäuse (CDK5 WT) sowie bei 14/22 (63,64 %) der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) wurden in einem singulären Leberschnittpräparat zwischen 1 und 3 detektiert. Lebermetastasen sicher Hierdurch ergaben sich Gesamtanzahlen (Stichprobenumfang n) von 22 sicher detektierten Lebermetastasen für die KPC-Präparate (CDK5 WT) bzw. von 28 sicher detektierten Lebermetastasen für die KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl). Diese Leberschnittpräparate waren zuvor einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen worden (vgl. 2.4). Es erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation der korrespondierenden Lebermetastasen zu den zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Leberserienschnitten (vgl. Abb. 18). Die Einteilung erfolgte mittels vierstufiger manueller Klassifikation in stark positive (3+), intermediar positive (2+), schwach positive (1+) oder negative (0) Lebermetastasen (vgl. 2.5 und 2.5.2). 1/22 (4,55 %) der KPC-Präparatbereiche (CDK5 WT) zeigte sich stark positiv für CDK5, 2/22 (9,09 %) zeigten sich intermediär positiv, 15/22 (68,18 %) schwach positiv und 4/22 (18,18 %) negativ. 1/28 (3,57 %) der KPCC-Präparatbereiche (CDK5 fl/fl) zeigte sich stark positiv für CDK5, 2/28 (7,14 %) zeigten sich intermediär positiv, 13/28 (46,43 %) schwach positiv und 12/28 (42,86 %) negativ.



3.2.2 Ergebnisgrafiken der zweistufigen manuellen Klassifikation

Abb. 20: PD-L1-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die zufällige Auswahl und Fotodokumentation vierer Präparatbereiche. Die Auswertung der insgesamt 72 KPC-bzw. 88 KPCC-Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich manuell hin auf das Vorliegen von PD-L1 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht. Die vier analysierten histologischen Bereiche je PDAC wurden zusammengefasst, sodass sich ein Stichprobenumfang von n = 18 (KPC) bzw. n = 22 (KPCC) ergab (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 83,56 % (SD 8,26 %, SEM 1,95 %) als positiv für PD-L1 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 51,96 % (SD 27,54 %, SEM 5,87 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 21: CDK5-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation der vier korrespondierenden Präparatbereiche zu den zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitten bzw. Präparatbereichen (vgl. Abb. 20). Die Auswertung der insgesamt 72 KPC- bzw. 88 KPCC-Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich manuell hin auf das Vorliegen von CDK5 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht. Die vier analysierten histologischen Bereiche je PDAC wurden zusammengefasst, sodass sich ein Stichprobenumfang von n = 18 (KPC) bzw. n = 22 (KPCC) ergab (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 84,40 % (SD 6,57 %, SEM 1,55 %) als positiv für CDK5 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 13,07 % (SD 5,84 %, SEM 1,24 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 22: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1- sowie CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die zufällige Auswahl und Fotodokumentation vierer in beiden Färbungen korrespondierender Präparatbereiche. Bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich wurden manuell hin auf das Vorliegen (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) von PD-L1 bzw. CDK5 untersucht. Die vier analysierten histologischen Bereiche je Präparat wurden zusammengefasst, sodass sich ein Stichprobenumfang von n = 18 (KPC) bzw. n = 22 (KPCC) ergab (vgl. 2.5 und 2.5.3). PD-L1-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 57,90 %, maximal zu 93,45 % und gemittelt zu 83,56 % (SD 8,26 %, SEM 1,95 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 2,86 %, maximal zu 87,12 % und gemittelt zu 51,96 % (SD 27,54 %, SEM 5,87 %). CDK5-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 66,66 %, maximal zu 92,87% und gemittelt zu 84,40 % (SD 6,57 %, SEM 1,55 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 4,5 %, maximal zu 25,38 % und gemittelt zu 13,07 % (SD 5,84 %, SEM 1,24 %). Die Gruppenunterschiede in PD-L1- sowie CDK5-Expression waren statistisch signifikant (vgl. Abb. 20 und Abb. 21). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression in der KPC- (R(WT) = 0,180) sowie eine negative Korrelation (R(fl/fl) = -0.104) in der KPCC-Testgruppe.



Abb. 23: PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die selektive Auswahl und Fotodokumentation des Präparatbereiches mit der stärksten PD-L1-Intensität. Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich manuell hin auf das Vorliegen von PD-L1 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 86,14 % (SD 5,07 %, SEM 1,20 %) als positiv für PD-L1 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 63,79 % (SD 27,16 %, SEM 5,79 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0014 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 24: CDK5-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation des korrespondierenden Präparatbereiches zu dem zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitt bzw. Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich manuell hin auf das Vorliegen von CDK5 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 85,76 % (SD 11,31 %, SEM 2,67 %) als positiv für CDK5 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 21,46 % (SD 13,32 %, SEM 2,84 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 25: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1- sowie CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte die selektive Auswahl und Fotodokumentation der Präparatbereiche mit der stärksten PD-L1-Intensität sowie der korrespondierenden Bereiche der CDK5-Präparate. Bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich wurden manuell hin auf das Vorliegen (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) von PD-L1 bzw. CDK5 untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.3). PD-L1-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 75,50 %, maximal zu 96,00 % und gemittelt zu 86,14 % (SD 5,07 %, SEM 1,20 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 1,50 %, maximal zu 92,31 % und gemittelt zu 63,79 % (SD 27,16 %, SEM 5,79 %). CDK5-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 49,50 %, maximal zu 96,00 % und gemittelt zu 85,76 % (SD 11,31 %, SEM 2,67 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 2,34 %, maximal zu 48,50 % und gemittelt zu 21,46 % (SD 13,32 %, SEM 2,84 %). Die Gruppenunterschiede in PD-L1- sowie CDK5-Expression waren statistisch signifikant (vgl. Abb. 23 und Abb. 24). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression in der KPC- (R(WT) = 0.446) sowie eine negative Korrelation (R(fl/fl)) = -0,124) in der KPCC-Testgruppe.



Abb. 26: PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die selektive Auswahl und Fotodokumentation des Präparatbereiches mit der schwächsten PD-L1-Intensität. Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich manuell hin auf das Vorliegen von PD-L1 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 73,38 % (SD 17,68 %, SEM 4,17 %) als positiv für PD-L1 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 32,72 % (SD 26,33 %, SEM 5,61 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 27: CDK5-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation des korrespondierenden Präparatbereiches zu dem zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitt bzw. Präparatbereich mit schwächster PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26). Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich manuell hin auf das Vorliegen von CDK5 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 59,49 % (SD 24,39 %, SEM 5,75 %) als positiv für CDK5 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 11,86 % (SD 10,12 %, SEM 2,16 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 28: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1- sowie CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte die selektive Auswahl und Fotodokumentation der Präparatbereiche mit der schwächsten PD-L1-Intensität sowie der korrespondierenden Bereiche der CDK5-Präparate. Bis zu 200 Zellen pro Präparatbereich wurden manuell hin auf das Vorliegen (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) von PD-L1 bzw. CDK5 untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.3). PD-L1-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 29,50 %, maximal zu 92,81 % und gemittelt zu 73,38 % (SD 17,68 %, SEM 4,17 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 1,17 %, maximal zu 84,00 % und gemittelt zu 32,72 % (SD 26,33 %, SEM 5,61 %). CDK5-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 18,00 %, maximal zu 86,50 % und gemittelt zu 59,49 % (SD 24,39 %, SEM 5,75 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 1,00 %, maximal zu 41,00 % und gemittelt zu 11,86 % (SD 10,12 %, SEM 2,16 %). Die Gruppenunterschiede in PD-L1- sowie CDK5-Expression waren statistisch signifikant (vgl. Abb. 26 und Abb. 27). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression in der KPC- (R(WT) = 0,298) sowie eine negative Korrelation (R(fl/fl)) = -0,316) in der KPCC-Testgruppe.



Abb. 29: PD-L1-Expression der Lebermetastasen, zweistufige manuelle Klassifikation: Bei 11/18 (61,11 %) der KPC-Mäuse (CDK5 WT) sowie bei 14/22 (63,64 %) der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) wurden in einem singulären Leberschnittpräparat zwischen 1 und 3 Lebermetastasen sicher detektiert und fotografisch dokumentiert. Hierdurch ergaben sich Gesamtanzahlen detektierter Lebermetastasen von 22 für die KPC-Präparate (CDK5 WT) 28 fl/fl). bzw. von für die **KPCC-Präparate** (CDK5 Diese Leberschnittpräparate waren zuvor einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen worden (vgl. 2.4). Die Auswertung der Lebermetastasen erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Lebermetastase manuell hin auf das Vorliegen von PD-L1 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht. Die analysierten Lebermetastasen je Leberschnittpräparat wurden zwecks gleichmäßiger Gewichtung der einzelnen Präparate zusammengefasst, sodass sich ein Stichprobenumfang von n = 11 (KPC) bzw. n = 14 (KPCC) ergab (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 76,50 % (SD 15,93 %, SEM 4,80 %) als positiv für PD-L1 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 51,96 % (SD 19,39 %, SEM 5,18 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0025 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 30: CDK5-Expression der Lebermetastasen, zweistufige manuelle Klassifikation: Bei 11/18 (61,11 %) der KPC-Mäuse (CDK5 WT) sowie bei 14/22 (63,64 %) der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) wurden in einem singulären Leberschnittpräparat zwischen 1 und 3 Lebermetastasen sicher detektiert. Hierdurch ergaben sich Gesamtanzahlen detektierter Lebermetastasen von 22 für die KPC-Präparate (CDK5 WT) bzw. von 28 für die KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl). Diese Präparate waren zuvor einer CDK5-Antikörperfärbung unterzogen worden (vgl. 2.4). Es folgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation der korrespondierenden Lebermetastasen zu den zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Leberserienschnitten (vgl. Abb. 29). Die Auswertung der Lebermetastasen erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation. Hierzu wurden bis zu 200 Zellen pro Lebermetastase manuell hin auf Positivität bzw. Negativität für CDK5 untersucht. Die analysierten Lebermetastasen je Leberschnitt wurden zwecks gleichmäßiger Gewichtung der einzelnen Präparate zusammengefasst, sodass sich ein Stichprobenumfang von n = 11 (KPC) bzw. n = 14 (KPCC) ergab (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die ausgezählten Zellen der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 52,16 % (SD 20,01 %, SEM 6,03 %) als positiv für CDK5 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 16,48 % (SD 7,24 %, SEM 1,94 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 31: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Lebermetastasen, zweistufige manuelle Klassifikation: Bei 11/18 (61,11 %) der KPC-Mäuse (CDK5 WT) sowie bei 14/22 (63,64 %) der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) wurden in singulären Leberschnittpräparaten insgesamt 22 (KPC) bzw. 28 (KPCC) Lebermetastasen detektiert, die einer PD-L1- sowie CDK5-Antikörperfärbung unterzogen wurden (vgl. 2.4). Dann erfolgte das Aufsuchen und die Fotodokumentation der korrespondierenden Lebermetastasen in beiden Färbepräparaten. Die Auswertung erfolgte mittels zweistufiger manueller Klassifikation (vgl. 2.5 und 2.5.3). Die analysierten Lebermetastasen je Präparat wurden zusammengefasst, sodass sich ein Stichprobenumfang von n = 11 (KPC) bzw. n = 14 (KPCC) ergab. PD-L1-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 34,50 %, maximal zu 88,06 % und gemittelt zu 76,50 % (SD 15,93 %, SEM 4,80 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 29,11 %, maximal zu 80,50 % und gemittelt zu 51,96 % (SD 19,39 %, SEM 5,18 %). CDK5-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 11,29 %, maximal zu 79,53 % und gemittelt zu 52,16 % (SD 20,01 %, SEM 6,03 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 7,25 %, maximal zu 33,01 % und gemittelt zu 16,48 % (SD 7,24 %, SEM 1,94 %). Die Gruppenunterschiede in PD-L1- sowie CDK5-Expression waren statistisch signifikant (vgl. Abb. 29 und Abb. 30). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression in der KPC- (R(WT) = 0.174) sowie in der KPCC-Testgruppe (R(fl/fl) = 0.319).



3.2.3 Ergebnisgrafiken der zweistufigen maschinellen Klassifikation

Abb. 32: PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die selektive Auswahl und Fotodokumentation des Präparatbereiches mit der stärksten PD-L1-Intensität. Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger maschineller Klassifikation mit Hilfe des ImageJ-Plug-ins IHC Profiler (Varghese et al., 2014). Hierzu wurden Bereiche mit PDAC-Zellpopulationen markiert und entsprechende Pixel maschinell hin auf das Vorliegen von PD-L1 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.4). Die ausgewerteten Pixel der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 94,83 % (SD 5,05 %, SEM 1,19 %) als positiv für PD-L1 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 78,34 % (SD 23,55 %, SEM 5,02 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0060 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 33: CDK5-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-WT) Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation des korrespondierenden Präparatbereiches zu dem zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitt bzw. Präparatbereich mit stärkster PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 32). Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger maschineller Klassifikation mit Hilfe des ImageJ-Plug-ins IHC Profiler (Varghese et al., 2014). Hierzu wurden Bereiche mit PDAC-Zellpopulationen markiert und entsprechende Pixel maschinell hin auf das Vorliegen von CDK5 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.4). Die ausgewerteten Pixel der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 84,47 % (SD 11,26 %, SEM 2,65 %) als positiv für CDK5 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 68,06 % (SD 19,10 %, SEM 4,07 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0027 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 34: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1- sowie CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte die selektive Auswahl und Fotodokumentation der Präparatbereiche mit der stärksten PD-L1-Intensität sowie der korrespondierenden Bereiche der CDK5-Präparate. Mit dem Programm IHC Profiler wurden diese Präparatbereiche hin auf das Vorliegen (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) von PD-L1 bzw. CDK5 untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.4). PD-L1-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 81,88 %, maximal zu 99,86 % und gemittelt zu 94,83 % (SD 5,05 %, SEM 1,19 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 9,29 %, maximal zu 97,80 % und gemittelt zu 78,34 % (SD 23,55 %, SEM 5,02 %). CDK5-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 51,47 %, maximal zu 97,09 % und gemittelt zu 84,47 % (SD 11,26 %, SEM 2,65 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 22,19 %, maximal zu 96,67% und gemittelt zu 68,06 % (SD 19,10 %, SEM 4,07 %). Die Gruppenunterschiede in PD-L1- sowie CDK5-Expression waren statistisch signifikant (vgl. Abb. 32 und Abb. 33). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression in der KPC- (R(WT) = 0,194) sowie in der KPCC-Testgruppe (R(fl/fl)) = 0,276).



Abb. 35: PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1-WT) Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat die selektive Auswahl und Fotodokumentation des Präparatbereiches mit der schwächsten PD-L1-Intensität. Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger maschineller Klassifikation mit Hilfe des ImageJ-Plug-ins IHC Profiler (Varghese et al., 2014). Hierzu wurden Bereiche mit PDAC-Zellpopulationen markiert und entsprechende Pixel maschinell hin auf das Vorliegen von PD-L1 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.4). Die ausgewerteten Pixel der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 78,41 % (SD 11,87 %, SEM 2,80 %) als positiv für PD-L1 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 50,70 % (SD 23,26 %, SEM 4,96 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 36: CDK5-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer CDK5-WT) Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte für jedes Präparat das Aufsuchen und die Fotodokumentation des korrespondierenden Präparatbereiches zu dem zugehörigen mittels PD-L1-Antikörperfärbung behandelten Serienschnitt bzw. Präparatbereich mit schwächster PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35). Die Auswertung der Präparatbereiche erfolgte mittels zweistufiger maschineller Klassifikation mit Hilfe des ImageJ-Plug-ins IHC Profiler (Varghese et al., 2014). Hierzu wurden Bereiche mit PDAC-Zellpopulationen markiert und entsprechende Pixel maschinell hin auf das Vorliegen von CDK5 (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.4). Die ausgewerteten Pixel der KPC-Präparate (CDK5 WT) wurden zu einem Anteil von 74,81 % (SD 12,37 %, SEM 2,92 %) als positiv für CDK5 klassifiziert, jene der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) zu einem Anteil von 54,80 % (SD 22,78 %, SEM 4,86 %). Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0019 im ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.



Abb. 37: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation: 18 murine KPC-Präparate (CDK5 WT) sowie 22 murine KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) wurden einer PD-L1- sowie CDK5-Antikörperfärbung unterzogen (vgl. 2.4). Im Anschluss erfolgte die selektive Auswahl und Fotodokumentation der Präparatbereiche mit der schwächsten PD-L1-Intensität sowie der korrespondierenden Bereiche der CDK5-Präparate. Mit dem Programm IHC Profiler wurden diese Präparatbereiche hin auf das Vorliegen (positiv) bzw. das Nichtvorliegen (negativ) von PD-L1 bzw. CDK5 untersucht (vgl. 2.5 und 2.5.4). PD-L1-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 48,21 %, maximal zu 93,22 % und gemittelt zu 78,41 % (SD 11,87 %, SEM 2,80 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 10,10 %, maximal zu 90,10 % und gemittelt zu 50,70 % (SD 23,26 %, SEM 4,96 %). CDK5-Expression zeigte sich bei den KPC-Präparaten (CDK5 WT) minimal zu 54,45 %, maximal zu 93,71 % und gemittelt zu 74,81 % (SD 12,37 %, SEM 2,92 %) sowie bei den KPCC-Präparaten (CDK5 fl/fl) minimal zu 23,70 %, maximal zu 95,45 % und gemittelt zu 54,80 % (SD 22,78 %, SEM 4,86 %). Die Gruppenunterschiede in PD-L1- sowie CDK5-Expression waren statistisch signifikant (vgl. Abb. 35 und Abb. 36). Zudem zeigte sich eine positive Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression in der KPC- (R(WT) = 0,190) sowie in der KPCC-Testgruppe (R(fl/fl)) = 0,213).

3.2.4 Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen

Tab. 17: Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 20)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)
Mittelwert [%]	83,56	86,14
SD [%]	8,26	5,07
SEM [%]	1,95	1,20
n	18	18
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,2666 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 20)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)
Mittelwert [%]	83,56	73,38
SD [%]	8,26	17,68
SEM [%]	1,95	4,17
n	18	18
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0337 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)
Mittelwert [%]	86,14	73,38
SD [%]	5,07	17,68
SEM [%]	1,20	4,17
n	18	18
Ergebnis: Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0058 im		
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		

Tab. 17, fortgesetzt: Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5WT) unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Lebermetastasen (vgl. Abb. 29)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 20)	
Mittelwert [%]	83,56	76,50
SD [%]	8,26	15,93
SEM [%]	1,95	4,80
n	18	11
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,1265 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche maximaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 29)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)	
Mittelwert [%]	86,14	76,50
SD [%]	5,07	15,93
SEM [%]	1,20	4,80
n	18	11
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0235 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Primarius, Bereiche minimaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 29)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)	
Mittelwert [%]	73,38	76,50
SD [%]	17,68	15,93
SEM [%]	4,17	4,80
n	18	11
Ergebnis: Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,6361 im		
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch nicht signifikant.		

Tab. 18: Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHC Profiler (vgl. 2.5.4).

	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 32)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35)
Mittelwert [%]	94,83	78,41
SD [%]	5,05	11,87
SEM [%]	1,19	2,80
n	18	18
Ergebnis: Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p < 0,0001 im		
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		

3.2.5 Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen

Tab. 19: Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 21)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)
Mittelwert [%]	84,40	85,76
SD [%]	6,57	11,31
SEM [%]	1,55	2,67
n	18	18
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,6604 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch nicht signifikant.		
	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 21)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)
Mittelwert [%]	84,40	59,49
SD [%]	6,57	24,39
SEM [%]	1,55	5,75
n	18	18
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0002 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)
Mittelwert [%]	85,76	59,49
SD [%]	11,31	24,39
SEM [%]	2,67	5,75
n	18	18
Ergebnis: Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei $p = 0,0002$ im		
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		

Tab. 19, fortgesetzt: Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5WT) unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Lebermetastasen (vgl. Abb. 30)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 21)	
Mittelwert [%]	84,40	52,16
SD [%]	6,57	20,01
SEM [%]	1,55	6,03
n	18	11
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p < 0,0001 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Primarius, Bereiche maximaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 30)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)	
Mittelwert [%]	85,76	52,16
SD [%]	11,31	20,01
SEM [%]	2,67	6,03
n	18	11
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p < 0,0001 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Primarius, Bereiche minimaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 30)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)	
Mittelwert [%]	59,49	52,16
SD [%]	24,39	20,01
SEM [%]	5,75	6,03
n	18	11
Ergebnis: Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei $p = 0,4097$ im		
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch nicht signifikant.		

Tab. 20: Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHC Profiler (vgl. 2.5.4).

	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 33)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)
Mittelwert [%]	84,47	74,81
SD [%]	11,26	12,37
SEM [%]	2,65	2,92
n	18	18
Ergebnis: Der Unterschied zwischen beiden Testgruppen war bei p = 0,0197 im		
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		
3.2.6 Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen

Tab. 21: Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 20)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)
Mittelwert [%]	51,96	63,79
SD [%]	27,54	27,16
SEM [%]	5,87	5,79
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,1588 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 20)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)
Mittelwert [%]	51,96	32,72
SD [%]	27,54	26,33
SEM [%]	5,87	5,61
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0225 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)
Mittelwert [%]	63,79	32,72
SD [%]	27,16	26,33
SEM [%]	5,79	5,61
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0004 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		

Tab. 21, fortgesetzt: Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5fl/fl)unterAnwendungderzweistufigenmanuellenKlassifikation(vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Lebermetastasen (vgl. Abb. 29)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 20)	
Mittelwert [%]	51,96	51,96
SD [%]	27,54	19,39
SEM [%]	5,87	5,18
n	22	14
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,9997 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche maximaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 29)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)	
Mittelwert [%]	63,79	51,96
SD [%]	27,16	19,39
SEM [%]	5,79	5,18
n	22	14
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,1667 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch nicht signifikant.		statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche minimaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 29)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)	
Mittelwert [%]	32,72	51,96
SD [%]	26,33	19,39
SEM [%]	5,61	5,18
n	22	14
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0245 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		

Tab. 22: Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHC Profiler (vgl. 2.5.4).

	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 32)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35)
Mittelwert [%]	78,34	50,70
SD [%]	23,55	23,26
SEM [%]	5,02	4,96
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0003 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.

3.2.7 Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen

Tab. 23: Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 21)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)
Mittelwert [%]	13,07	21,46
SD [%]	5,84	13,32
SEM [%]	1,24	2,84
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0098 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Primarius, Bereiche zufälliger	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 21)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)
Mittelwert [%]	13,07	11,86
SD [%]	5,84	10,12
SEM [%]	1,24	2,16
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,6289 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)
Mittelwert [%]	21,46	11,86
SD [%]	13,32	10,12
SEM [%]	2,84	2,16
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0102 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch signifikant.		

Tab. 23, fortgesetzt: Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5fl/fl)unterAnwendungderzweistufigenmanuellenKlassifikation(vgl. 2.5.3).

	Primarius, Bereiche zufälliger	Lebermetastasen (vgl. Abb. 30)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 21)	
Mittelwert [%]	13,07	16,48
SD [%]	5,84	7,24
SEM [%]	1,24	1,94
n	22	14
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,1296 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Primarius, Bereiche maximaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 30)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)	
Mittelwert [%]	21,46	16,48
SD [%]	13,32	7,24
SEM [%]	2,84	1,94
n	22	14
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,2092 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch nicht signifikant.		
	Primarius, Bereiche minimaler	Lebermetastasen (vgl. Abb. 30)
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)	
Mittelwert [%]	11,86	16,48
SD [%]	10,12	7,24
SEM [%]	2,16	1,94
n	22	14
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,1481 im
ungepaarten T-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau statistisch nicht signifikant.		

Tab. 24: Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHC Profiler (vgl. 2.5.4).

	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 33)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)
Mittelwert [%]	68,06	54,80
SD [%]	19,10	22,78
SEM [%]	4,07	4,86
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0424 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.

3.2.8 Vergleich von zweistufiger manueller Klassifikation und zweistufiger maschineller Klassifikation (IHC Profiler)

Tab. 25: Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 32)
Mittelwert [%]	86,14	94,83
SD [%]	5,07	5,05
SEM [%]	1,20	1,19
n	18	18
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p < 0,0001 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler
	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35)
Mittelwert [%]	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26) 73,38	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35) 78,41
Mittelwert [%] SD [%]	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26) 73,38 17,68	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35) 78,41 11,87
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%]	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26) 73,38 17,68 4,17	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35) 78,41 11,87 2,80
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%] n	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26) 73,38 17,68 4,17 18	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35) 78,41 11,87 2,80 18
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%] n Ergebnis: De	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26) 73,38 17,68 4,17 18 r Unterschied zwischen beiden Te	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35) 78,41 11,87 2,80 18 stgruppen war bei p = 0,3232 im

Tab. 26: Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 23)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 32)
Mittelwert [%]	63,79	78,34
SD [%]	27,16	23,55
SEM [%]	5,79	5,02
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,0645 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Primarius, Bereiche minimaler	Primarius, Bereiche minimaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 26)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 35)
Mittelwert [%]	32,72	50,70
SD [%]	26.33	22.26
	20,00	23,20
SEM [%]	5,61	4,96
SEM [%]	5,61 22	4,96 22
n Ergebnis: De	5,61 22 r Unterschied zwischen beiden Te	4,96 22 stgruppen war bei p = 0,0209 im

Tab. 27: Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 33)
Mittelwert [%]	85,76	84,47
SD [%]	11,31	11,26
SEM [%]	2,67	2,65
n	18	18
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p = 0,7329 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch nicht signifikant.
	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Primarius, Bereiche minimaler	Primarius, Bereiche minimaler
	Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)	Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)
Mittelwert [%]	Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 59,49	Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 74,81
Mittelwert [%] SD [%]	Primarius, Bereiche minimalerPD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)59,4924,39	Primarius, Bereiche minimalerPD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)74,8112,37
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%]	Primarius, Bereiche minimalerPD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)59,4924,395,75	Primarius, Bereiche minimalerPD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)74,8112,372,92
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%] n	Primarius, Bereiche minimalerPD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)59,4924,395,7518	Primarius, Bereiche minimalerPD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)74,8112,372,9218
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%] n Ergebnis: De	Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 59,49 24,39 5,75 18 r Unterschied zwischen beiden Te	Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 74,81 12,37 2,92 18 stgruppen war bei p = 0,0233 im

Tab. 28: Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Primarius, Bereiche maximaler	Primarius, Bereiche maximaler
	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 24)	PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 33)
Mittelwert [%]	21,46	68,06
SD [%]	13,32	19,10
SEM [%]	2,84	4,07
n	22	22
Ergebnis: De	r Unterschied zwischen beiden Te	stgruppen war bei p < 0,0001 im
ungepaarten T	-Test auf dem 95-%-Konfidenzniveau	statistisch signifikant.
	Manuelle Zellauszählung	IHC Profiler
	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler
	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27)	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36)
Mittelwert [%]	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 11,86	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 54,80
Mittelwert [%] SD [%]	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 11,86 10,12	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 54,80 22,78
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%]	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 11,86 10,12 2,16	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 54,80 22,78 4,86
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%] n	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 11,86 10,12 2,16 22	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 54,80 22,78 4,86 22
Mittelwert [%] SD [%] SEM [%] n Ergebnis: De	Manuelle Zellauszählung Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 27) 11,86 10,12 2,16 22 r Unterschied zwischen beiden Te	IHC Profiler Primarius, Bereiche minimaler PD-L1-Intensität (vgl. Abb. 36) 54,80 22,78 4,86 22 stgruppen war bei p < 0,0001 im

4. Diskussion

4.1 Vergleich von CDK5- und PD-L1-Expression im Kontext verschiedener Analysemethoden

Das Pankreaskarzinom bildet mit einem annähernd identischen jährlichen Mortalität/Inzidenz-Verhältnis von 0,98 die tödlichste Tumorerkrankung weltweit (Abb. 1; Ferlay et al., 2015) und Tumorrezidive sind selbst bei R0-Resektionen aufgrund früher Metastasierung praktisch immer gewiss (Carpelan-Holmström et al.. 2005). Entsprechend ist das duktale Adenokarzinom des Pankreas fortwährend Forschungsgegenstand neuartiger Therapiekonzepte, wobei sich zuletzt verschiedene Kombinationstherapien im Vergleich zu Monotherapien im Bezug auf Krankheitsprogression und Therapieansprechen häufig als überlegen präsentierten (Conroy et al., 2011; Conroy et al., 2018; Feig et al., 2013; Feldmann et al., 2011; Hu et al., 2015; Miao et al., 2017; Nomi et al., 2007). Entsprechend werden gegenwärtig diverse neuartige Kombinationstherapien unter Einbindung von Immuncheckpointinhibitoren erprobt (Johansson et al., 2016).

Zugleich wird nach genetischen Eigenschaften gesucht, die ein Tumoransprechen auf Inhibitoren des PD1-PD-L1-Signalweges wahrscheinlich machen. Untersuchungen an soliden Tumoren brachten eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bzw. Defekte des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems (dMMR) mit hohen objektiven Therapieansprechensraten in Verbindung (Le et al., 2017; Lemery et al., 2017; U.S. Food and Drug Administration, 2017). Die U.S. Food and Drug Administration ließ in der Folge Pembrolizumab als Therapeutikum für solide Tumoren mit hoher Mikrosatelliteninstabilität bzw. dMMR zu (National Comprehensive Cancer Network, 2017; U.S. Food and Drug Administration, 2017). Im Rahmen der assoziierten Studie zeigten 83 % (5/6) der PDACs mit MSI (n = 6) ein objektives Ansprechen (Lemery et al., 2017). Neben einer direkten PD1- bzw. PD-L1-Inhibition kommen auch Modulatoren der entsprechenden Genexpression therapeutisch in Frage: Es zeigte sich, dass eine funktionelle Inhibition von CDK5 in vivo zu einer verringerten PD-L1-Expression bei Medulloblastomen führte und diese mit einer verbesserten antitumoralen Immunantwort einherging (Dorand et al., 2016). Die CDK5abhängige PD-L1-Hochregulation (Abb. 2) scheint nicht gewebespezifisch zu sein und zeigte sich u.a. auch bei Rhabdomyosarkomen, dendritischen Zellen der nasalen Mukosa, Triple-negativen Mammakarzinomen sowie beim malignen Melanom (Deng et al., 2019; Dorand et al., 2016; Liu et al., 2019). Unselektive CDK5-Inhibitoren wie Dinaciclib (Inhibition von CDK1, CDK2, CDK5, CDK9) zeigten bereits in vitro sowie in vivo in Mono- sowie Kombinationstherapien signifikante antitumorale Eigenschaften wie verringerte Zellmigration, Rückgang des Primarius und verringerte Metastasierung (Feldmann et al., 2010; Feldmann et al., 2011; Hu et al., 2015).

Basierend auf den Experimenten Dorands et al. (2016) untersuchten wir im Rahmen dieser Studie die Auswirkungen einer verringerten CDK5-Expression auf die PD-L1-Expression von PDAC-Zellen in vitro sowie in vivo. Hierzu wurden sieben PDAC-Zelllinien kultiviert und mittels Western Blot hin auf eine Genexpression von CDK5 sowie PD-L1 untersucht (vgl. 2.2 und 3.1). Hierbei zeigten sich vier Zelllinien positiv für PD-L1. SU.86.86 wies mit 4,36 ± 1,15 SD die stärkste relative PD-L1-Expression auf, gefolgt von BxPC-3 (1,49 ± 0,75 SD), PANC-1 (0,93 ± 0,87 SD) und Panc 10.05 (0,22 ± 0,38 SD) (Abb. 10 und Abb. 11). Alle getesteten Zelllinien zeigten zudem eine CDK5-Expression (Abb. 9 bis 11). Die relativen CDK5-Expressionen der vier PD-L1-positiven Zelllinien verhielten sich nicht in identischer Weise: Die stärkste CDK5-Expression der vier positiv auf PD-L1-getesteten Zelllinien zeigte BxPC-3 (0,93 ± 0,18 SD), gefolgt von PANC-1 (0,92 \pm 0,56 SD), Panc 10.05 (0,61 \pm 0,36 SD) und SU.86.86 (0,11 \pm 0,02 SD). SU.86.86 zeigte somit bei der höchsten relativen PD-L1-Expression die niedrigste relative CDK5-Expression. Auffällig war zugleich, dass zumindest die übrigen drei PD-L1-positiven Zelllinien im Bezug auf die relative CDK5-Expression eine identische Reihenfolge einnahmen: BxPC-3 zeigte eine stärkere relative CDK5- sowie PD-L1-Expression als PANC-1 und Panc 10.05. Hierbei zeigten BxPC-3 (0,93 ± 0,18 SD) und PANC-1 (0,92 ± 0,56 SD) jedoch eine guasi identische relative CDK5-Expression. Bei zudem geringer Stichprobengröße bei n = 2 für die Expressionsanalyse von CDK5 im Western Blot bzw. n = 3 für PD-L1 ergaben sich überwiegend große Standardabweichungen, sodass schlussendlich das tatsächliche Ranking der PDAC-Zelllinien im Bezug auf CDK5-Expression und PD-L1-Expression ungewiss bleibt. Aktuell zeigte sich hier letztlich eine negative Korrelation für die Expression von CDK5 und PD-L1 im Western Blot (R = -0,542) (Abb. 10 und Abb. 11). Ein in-vitro-Experiment andernorts zeigte im Western Blot hingegen optisch eine positive Korrelation von CDK5und PD-L1-Expression am Beispiel dendritischer Zellen der nasalen Mukosa (Liu et al., 2019). Augenscheinlich sind weitere Untersuchungen notwendig, um eindeutige Aussagen bezüglich einer in-vitro-Expression von PD-L1 bei Zellen verschiedener Herkunft tätigen zu können. Letztlich lässt ein in-vitro-Experiment, das der Analyse immunmodulatorischer Moleküle dient, in unseren Augen keine adäquaten Ergebnisse und keine optimale Übertragbarkeit dieser auf Prozesse in vivo zu. Zellen in vitro sind keinem funktionierenden Immunsystem bzw. -einfluss ausgesetzt, sodass sie von einer Expression immunmodulatorischer Moleküle wie PD-L1 nicht profitieren. Im Gegenteil hierzu müssen sie sogar Ressourcen in Form von Aminosäuren und Energieträgern aufwenden, um diese zu synthetisieren. Unserer Auffassung nach profitieren (Tumor-) Zellen in vitro entsprechend von der Herabregulation solcher immunmodulatorischen Moleküle, sodass sie freiwerdende Ressourcen für andere - in vitro relevantere -Prozesse aufwenden können. Diese Annahme liefert eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass drei der getesteten sieben PDAC-Zelllinien (MIAPaCa-2, Capan-1, AsPC-1) im Western Blot negativ für PD-L1 waren (Abb. 10 und Abb. 11). Auch in vivo wurde zudem beobachtet, dass selbst innerhalb einzelner Tumoren bzw. bei Vergleich von Primarius und Metastasen starke Expressionsunterschiede bis hin zur Negativität einzelner Tumorbereiche herrschten (Madore et al., 2015; McLaughlin et al., 2016). Daraus schließen wir, dass in-vivo-Experimente bzw. Experimente an Resektionspräparaten eine bessere Übertragbarkeit auf die physiologischen Prozesse beim Menschen bieten. Ein funktionelles Immunsystem kann in vitro in all seiner Komplexität schlichtweg nicht adäquat nachgebildet werden. Entsprechend erachten wir unsere in-vivo-Ergebnisse als relevanter und aussagekräftiger im Bezug auf einen möglichen Einfluss von CDK5 auf die PD-L1-Expression beim Pankreaskarzinom.

Im Rahmen unserer in-vivo-Experimente generierten wir transgene Mauslinien der Genotypen LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre (KPC) und LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre; CDK5 fl/fl (KPCC) (vgl. 2.3). Die entstandenen Bauchspeicheldrüsentumoren sowie die Lebern der Mäuse wurden asserviert und immunhistochemische Färbungen für CDK5 und PD-L1 angefertigt (vgl. 2.4). Jeweils vier Bereiche wurden im PD-L1-Präparat jedes Primärtumors zufällig ausgewählt und analysiert. Anschließend wurden in den korrespondierenden Serienschnitten der CDK5-Präparate die korrespondierenden Tumorsubpopulationen analysiert. Überdies suchten

wir die Präparatbereiche mit maximaler sowie minimaler PD-L1-Intensität und deren korrespondierende Präparatbereiche in den CDK5-Präparaten gezielt auf und analysierten diese separat. Zuletzt wurden bis zu drei Lebermetastasen pro Präparat in einem singulären Leberschnittpräparat auf identische Weise analysiert (vgl. 2.5). Im Rahmen der zweistufigen manuellen Klassifikation analysierten wir bis zu 200 Tumorzellen pro Präparatbereich (500 x Vergrößerung) (vgl. 2.5.3 und 3.2.2). Hierbei zeigten sich bei jedem der vier analysierten Testpaare aus KPC- und KPCC-Präparaten (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) signifikante Unterschiede in der PD-L1-Expression. PDAC-Zellen der KPC- bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für PD-L1 zu 83,56 % bzw. 51,96 % in den Bereichen zufälliger PD-L1-Expression, zu 86,14 % bzw. 63,79 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression, zu 73,38 % bzw. 32,72 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression sowie zu 76,50 % bzw. 51,96 % in den Lebermetastasen (Abb. 20; Abb. 23; Abb. 26; Abb. 29). Ebenfalls zeigten sich - bei konditionellem CDK5-Knock-Out (KPCC-Mäuse) zu erwartende - statistisch signifikante Unterschiede der CDK5-Expression bei allen vier Testpaaren: KPC- bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für CDK5 zu 84,40 % bzw. 13,07 % in den Bereichen zufälliger PD-L1-Expression, zu 85,76 % bzw. 21,46 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression, zu 59,49 % bzw. 11,86 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression sowie zu 52,16 % bzw. 16,48 % in den Lebermetastasen (Abb. 21; Abb. 24; Abb. 27; Abb. 30). Durch die statistisch signifikanten Unterschiede in der CDK5-Expression zwischen KPC- und KPCC-Mauspopulation konnten wir zugleich den Erfolg des konditionellen Cre-Rekombinase-vermittelten Knock-Outs in der KPCC-Mauspopulation verifizieren und damit eines unserer Ziele dieser Arbeit bestätigen (vgl. 1.3 und 2.3.2). Auffällig war, dass sich bei Auftragen der einzelnen korrespondieren Wertepaare für CDK5- und PD-L1-Färbung für alle vier KPC-Subgruppen (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetasen) eine positive Korrelation nachweisen ließ (Korrelationskoeffizienten R (WT) = 0,180, 0,446, 0,298 bzw. 0,174). Innerhalb der KPCC-Subgruppen zeigte sich in drei Fällen eine negative Korrelation (Präparatbereiche zufälliger, maximaler sowie minimaler PD-L1-Intensität im Primarius) und in nur einem Fall eine positive Korrelation (Lebermetastasen) (Korrelationskoeffizienten R (fl/fl) =

-0,104, -0,124, -0,316 bzw. 0,319). Entsprechende Grafiken verdeutlichen zudem, dass innerhalb aller vier Testpaare die KPC-Präparate (CDK5 WT) größere Maximal-, Minimal- und Mittelwerte sowohl für CDK5 als auch für PD-L1 aufwiesen als die entsprechenden Vergleichsgruppen der KPCC-Präparate (CDK5 fl/fl) (Abb. 22; Abb. 25; Abb. 28; Abb. 31). Desweiteren erfolgte eine Überlagerung der Wertegruppen des Anteils CDK5-positiver Zellen lediglich innerhalb der Testpaare mit vergleichsweise geringem Anteil CDK5-positiver Zellen innerhalb der KPC-Population (Präparate minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) (Abb. 28; Abb. 31). In den Bereichen maximaler PD-L1-Intensität im Primarius zeigten sich KPC- und KPCC-Testgruppen bei annähernd identischem Minimal- (KPC) bzw. Maximalwert (KPCC) im Bezug auf die Anteile CDK5-positiver Zellen gerade eben von einander abgegrenzt. Beachtlich war, dass innerhalb dieser Bereiche mit hohem Anteil PD-L1-positiver Zellen auch der Anteil CDK5-positiver Zellen in der KPCC-Mauspopulation (CDK5 fl/fl) in 27,27 % (6/22) der Fälle über 30 % lag (Abb. 25). Innerhalb der anderen drei analysierten KPCC-Subgruppen (Präparatbereiche zufälliger bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) zeigte jeweils kein bzw. lediglich ein Präparat (0 % bzw. 4,55 %) eine CDK5-Positivität von über 30 % (Abb. 22; Abb. 28; Abb. 31). Das beobachtete Phänomen führten wir auf die Möglichkeit eines nicht vollständigen CDK5-Knock-Outs (konditionelles CDK5-Knock-Out mittels Cre-Rekombinase-Technik) sowie die Möglichkeit somatischer Rekombination in den relevanten Gensequenzen mit konsekutiver CDK5-Expression innerhalb der KPCC-Mauspopulation (CDK5 fl/fl) zurück. Überdies könnte auch eine selektiv verstärkte Anfärbbarkeit bzw. erhöhte endogene Peroxidaseaktivität in einzelnen Präparatbereichen vorliegen, wodurch auch unter Verwendung verschiedener Antikörper (PD-L1- bzw. CDK5-Primärantikörper) ein höherer bzw. niedrigerer Anteil positiver Zellen in einzelnen Präparatbereichen erzeugt wird. Bei Vergleich der einzelnen Testsubgruppen wurde zudem deutlich, dass gemittelte Werte des Anteils positiver Tumorzellen für das Antigen von Interesse (PD-L1 bzw. CDK5) durch Analyse mehrerer Präparatbereiche Ausreißerwerte besser ausglichen und in unserem Fall zu einer stärkeren Separation der KPC- und KPCC-

Vergleichsgruppen in den Bereichen zufälliger PD-L1-Intensität (vier analysierte Felder pro Präparat) führten (Abb. 22).

Als konkordant mit den beobachteten Phänomenen in der zweistufigen manuellen Klassifikation sind auch die detektierten Intensitätsverteilungen der analysierten Tumorfelder in der vierstufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.2 und 3.2.1) zu bewerten. Im Rahmen unserer vierstufigen manuellen Klassifikation teilten wir den einzelnen Präparatbereichen eine Intensitätsstufe (Stark positiv (3+), intermediär positiv (2+), schwach positiv (1+), negativ (0)) durch Vergleich mit einem zuvor erzeugten Panel bestehend aus Färbeabstufungen für CDK5 bzw. PD-L1 zu. Dadurch wurde ein möglichst hohes Maß an Objektivität bei der Intensitätsbeurteilung der Präparatbereiche gewährleistet. Die KPC-Präparate (CDK5 WT) zeigten in annähernd allen Fällen aller Vergleichsgruppen (Präparatbereiche zufälliger, maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius sowie Lebermetastasen) größere Anteile innerhalb der drei Intensitätsstufen positiver Intensität für PD-L1 (Abb. 12; Abb. 14; Abb. 16; Abb. 18) sowie für CDK5 (Abb. 13; Abb. 15; Abb. 17; Abb. 19). Zugleich bemerkten wir, dass nur in Einzelfällen KPC-Präparate im Bezug auf PD-L1- bzw. CDK5-Färbeintensität überhaupt als negativ eingestuft wurden. Bei Vergleich der Intensitätsaufteilungen der vier Untersuchungsgruppen ähnelten die Intensitätsverteilungen der Lebermetastasen für PD-L1 sowie für CDK5, die ihrerseits selbst gemittelte Intensitätswerte von durchschnittlich zwei zufälligen Präparatbereichen pro Leberschnittpräparat abbildeten, am stärksten den jeweiligen Intensitätsverteilungen innerhalb der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität (Abb. 12; Abb. 13; Abb. 18; Abb. 19). Die beobachteten Phänomene Rahmen der zweistufigen und im vierstufigen manuellen Klassifikationssysteme brachten uns zu der Annahme, dass eine probatorische Intensitätsevaluation in histologischen Präparaten nur durch eine ausreichend große Evaluationszahl subtotaler Präparatbereiche die Intensität des Gesamtpräparates adäquat repräsentieren kann und eine übermäßige Gewichtung besonders stark oder schwach angefärbter Präparatbereiche so im Allgemeinen gut kompensiert wird.

Um die Möglichkeit eines Beobachtungsfehlers zusätzlich zu reduzieren, führten wir desweiteren eine zweistufige maschinelle Klassifikation unter Verwendung des Programms IHC Profiler durch (vgl. 2.5.4 und 3.2.3). Hierbei zeigten sich ebenfalls bei jedem analysierten Testpaar aus KPC- und KPCC-Präparaten (Präparatbereiche maximaler bzw. minimaler PD-L1-Intensität im Primarius) statistisch signifikante Unterschiede in der PD-L1- bzw. CDK5-Expression. PDAC-Zellen der KPC- bzw. KPCC-

Mauspopulationen zeigten sich positiv für PD-L1 zu 94,83 % bzw. 78,34 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression sowie zu 78,41 % bzw. 50,70 % in den

Bereichen maximaler PD-L1-Expression sowie zu 78,41 % bzw. 50,70 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression (Abb. 32; Abb. 35). KPC- bzw. KPCC-Mauspopulationen zeigten sich positiv für CDK5 zu 84,47 % bzw. 68,06 % in den Bereichen maximaler PD-L1-Expression sowie zu 74,81 % bzw. 54,80 % in den Bereichen minimaler PD-L1-Expression (Abb. 33; Abb. 36). Basierend hierauf erachten wir unsere beobachteten Tendenzen mit Bezug auf die ermittelten Unterschiede von PD-L1- sowie CDK5-Expression innerhalb zweistufiger sowie vierstufiger manueller Klassifikation als grundsätzlich korrekt. Möglicherweise kommt dennoch eine gewisse Verzerrung der realen Werte durch den Beobachtungsfehler in Frage. Bei Vergleich der Ergebnisse des IHC Profilers (zweistufige maschinelle Klassifikation) mit jenen der zweistufigen manuellen Klassifikation zeigten sich innerhalb der KPC-Mauspopulation PD-L1-positive Anteile von 94,83 % bzw. 86,14 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) (Abb. 23; Abb. 32) sowie 78,41 % bzw. 73,38 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 26; Abb. 35). Für die KPCC-Mauspopulation ergaben sich im Vergleich PD-L1-positive Anteile von 78,34 % bzw. 63,79 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) (Abb. 23; Abb. 32) sowie 50,70 % bzw. 32,72 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 26; Abb. 35). Im Bezug auf die CDK5-Expression zeigte die KPC-Mauspopulation CDK5-Anteile von 84,47 % bzw. 85,76 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) in zweistufiger maschineller bzw. zweistufiger manueller Klassifikation (Abb. 24; Abb. 33) sowie von 74,81 % bzw. 59,49 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 27; Abb. 36). Die KPCC-Mauspopulation zeigte im Vergleich CDK5-positive Anteile von 68,06 % bzw. 21,46 % (Bereiche maximaler PD-L1-Intensität) (Abb. 24; Abb. 33) sowie von 54,80 % bzw. 11,86 % (Bereiche minimaler PD-L1-Intensität) (Abb. 27; Abb. 36). Konsekutiv zeigten auch die Wertepaargruppen von KPC- sowie KPCC-Mauspopulation stärkere Überlagerungen im Bezug auf CDK5- und PD-L1-Expression. Zusätzlich ergaben sich im Rahmen der Auswertung mittels IHC Profiler positive Korrelationen für CDK5- und PD-L1-Expression in beiden KPC- sowie KPCC-Testgruppen (Abb. 34; Abb. 37). Im Vergleich zur zweistufigen manuellen Klassifikation stufte IHC Profiler einige Präparatbereiche als deutlich positiver ein, sodass sich unter Vergleich der beiden Analysemethoden in 5/8 (62,50 %) der Fälle statistisch signifikante Unterschiede ergaben (Tab. 25; Tab. 26; Tab. 27; Tab. 28). In einem weiteren Fall wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zudem nur knapp verfehlt (p = 0.0645) (Tab. 26). Wie bereits erläutert, wurde IHC Profiler als objektives Analysewerkzeug ohne weitere Optimierung in die Versuchsauswertung eingegliedert (vgl. 2.5.4). Im Rahmen der Auswertung wurde deutlich, dass IHC Profiler ohne weitere Modifikationen einerseits einen sehr niedrigen Grenzwert aufwies, sodass bereits früh Pixel als positiv eingestuft wurden. Zugleich waren die Grenzwerte zwischen einzelnen Intensitätsstufen (stark, intermediär bzw. schwach positiv sowie negativ), die das Programm zeitgleich ebenfalls analysierte, sehr hoch, sodass nahezu alle als positiv bezifferten Pixel von IHC Profiler lediglich als schwach positiv gewertet wurden (Daten nicht gezeigt). Beide Beobachtungen standen in starkem Kontrast zu den Ergebnissen der zweistufigen sowie vierstufigen manuellen Klassifikation. Wir interpretierten die Beobachtungen so, dass IHC Profiler Hintergrundfärbungen, die im Kontext unserer optischen Klassifikationen noch als negativ eingestuft wurden, aufgrund des niedrigen Grenzwertes bereits früh als positiv klassifizierte. Dieser Effekt kam insbesondere bei den Analysegruppen zu tragen, bei denen die manuelle Auswertung einen verhältnismäßig niedrigen CDK5- bzw. PD-L1-Anteil ergeben hatte (Tab. 25; Tab. 26; Tab. 27; Tab. 28). Wir schlussfolgerten, dass die systematische Anwendung von IHC Profiler für eine repräsentative Analyse unserer immunhistochemischen Präparate nur unzureichend zuträglich ist bzw. es einer weiteren Adaptation der IHC-Färbungen, der Bildaufnahmeparameter sowie des Programms IHC Profiler selbst (insbesondere mit Bezug auf die Grenzwerteinstellungen) bedürfe. Eine weitere Schwierigkeit im Rahmen der Auswertung der Präparatbilder mittels IHC Profiler bildete zudem die Notwendigkeit der Markierung der einzelnen Tumorbereiche unter Aussparung duktaler Lumina, was einen hohen Zeitaufwand mit sich brachte. Setzung einer manuellen Markierung war hier notwendig, da PDAC-Zellen einerseits häufig von Azinuszellen bzw. Tumorstroma umgegeben waren, die bei IHC-Färbungen sowohl mit PD-L1- als auch mit CDK5-Antikörper zum Teil ebenfalls starke Färbeintensitäten aufwiesen (womöglich aufgrund endogener Enzymaktivität), und da andererseits eine starke Diskrepanz der Größe duktaler Lumina zwischen den einzelnen Präparaten bestand. Teilweise zeigten Pankreastumoren konvolutartiges Wachstum mit nur marginalen oder überhaupt keinen Lumina, teilweise bestanden weitgreifende duktale Strukturen. Letztere wären ohne definierte Markierungen der Tumorzellbereiche bei einer Analyse des gesamten erzeugten Bildes unweigerlich als überwiegend negativ

einer verstärkten Verzerrung geführt hätte. gewertet worden, was zu Bei Zusammenschau der angeführten Beobachtungen entschieden wir uns dafür, eine Analyse mittels IHC Profiler nicht mehr für die Bereiche zufälliger PD-L1-Intensität sowie für die Lebermetastasenpräparate durchzuführen. Wir gehen jedoch davon aus, dass diese vergleichbare Ergebnisse liefern würden wie die Analysen der Präparatbereiche maximaler bzw. minimaler PD-L1-Expression und entsprechend ebenfalls die Tendenz einer erhöhten PD-L1- sowie CDK5-Expression auf Seiten der KPC-Mauspopulation liefern und zugleich einen größeren Positivanteil für beide Färbungen im Vergleich mit der zweistufigen manuellen Klassifikation abbilden würden. Aus genannten Gründen erachten wir manuelle Klassifikationssysteme gegenüber einer Klassifikation mittels IHC bezüglich vorliegenden Profiler zumindest der IHC-Färbungen beim _ Pankreaskarzinom – als überlegen. Angemerkt sei jedoch, dass andernorts am Beispiel von Melanompräparaten eine maschinelle Analyse von immunhistochemischen Färbungen für PD-L1 auf augenscheinlich sinnvolle Art umgesetzt werden konnte (Sunshine et al., 2017).

Autoren gegenwärtiger Studien verweisen darauf, dass die prätherapeutische Bestimmung des PD-L1-Status Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens einer Immuncheckblockade des PD1-PD-L1-Signalweges zuließe (Brahmer et al., 2012; McLaughlin et al., 2016; Topalian et al., 2012). Damit einhergehend wird eine Standardisierung der Analyseverfahren der PD-L1-Expression von Tumoren im Rahmen der klinischen Entscheidungsfindung für oder gegen eine Immuncheckpointtherapie (ICT) zunehmend als notwendig erachtet (Gaule et al., 2017; Ilie et al., 2016; Sunshine et al., 2017; Udall et al., 2018). Derzeit sind mehrere Immuncheckpointinhibitoren des PD1-PD-L1-Signalweges zugelassen. Diese brachten ihre eigenen herstellerspezifischen Detektionsassays für PD-L1 mit sich. Jedoch variierten damit die Detektionsverfahren für PD-L1 sowie die Grenzwerte für PD-L1-Positivität zwischen den Studien. So wurden teilweise Tumorzellen als negativ bzw. positiv für PD-L1 klassifiziert, teilweise wurden jedoch auch Hybridscores gebildet aus Zellanzahl und -färbeintensität. Zugleich umfassten PD-L1-Detektionsverfahren in einigen Fällen nur Tumorzellen, teilweise Tumorzellen sowie tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) sowie in einigen Fällen lediglich TILs. Aufgrund genannter Phänomene zeigten sich signifikante Unterschiede in der Vergleichbarkeit derzeit verfügbarer PD-L1-Assays. Eine weitere Problematik bei der Übertragbarkeit von Ergebnissen ergebe sich zudem dadurch, dass der arößte Teil ICT-assoziierter Literatur gegenwärtig auf Studien bei Lungenkarzinomen (insbesondere NSCLC) zurückgehe (Udall et al., 2018). Im Rahmen diverser Vergleichsstudien zeigte sich eine teils starke Heterogenität der PD-L1-Detektionsassays und damit einhergehend teils schlechte Konkordanzen der verwendeten Detektionsantikörper (Hirsch et al., 2017; Ilie et al., 2016; McLaughlin et al., 2016; Scheel et al., 2016; Tsao et al., 2018; Udall et al., 2018). Insbesondere der PD-L1-Antikörper SP142 bzw. der assoziierte Detektionsassay führte u.a. im Vergleich mit PD-L1-Antikörpern 22C3, 28-8 und SP263 häufig zu einem schwächeren Färbeverhalten (Hirsch et al., 2017; Ilie et al., 2016; Scheel et al., 2016; Tsao et al., 2018). Die teils starken Unterschiede zwischen den Detektionsassays bedingen die Notwendigkeit von Austauschkriterien bzw. von Vergleichbarkeitskriterien der einzelnen Detektionsassays sowie die Notwendigkeit eines Verweises auf den verwendeten Assay in zukünftigen Studien (Gaule et al., 2017; Ilie et al., 2016; Sunshine et al., 2017; Udall et al., 2018). Um herauszufinden, ob die beschriebenen Unterschiede in den Detektionsantikörpern selbst oder in deren assoziierten Assays begründet sind, unternahmen Sunshine et al. (2017) eine Testung von fünf PD-L1-Antikörpern (22C3, 28-8, SP142, SP263 und 5H1) bei weitgehend standardisiertem Detektionsassay für alle Antikörper an Melanomproben. Die verwendeten Detektionsassays waren entsprechend nicht jene, die im Allgemeinen von den Herstellern der jeweiligen Antikörper empfohlen wurden. Hierbei zeigte sich eine auffallend hohe Konkordanz von mehr als 80 % bei Vergleich aller Antikörper miteinander. Auch der SP142-Antikörper zeigte sehr hohe Konkordanzwerte von ca. 87 % bis 96 %. Die Autoren stellten fest, dass zuvor beschriebene Unterschiede, u.a. jene zwischen SP142 und anderen PD-L1-Antikörpern (Hirsch et al., 2017; Ilie et al., 2016; Scheel et al., 2016; Tsao et al., 2018), am ehesten assoziierten Herstellerassay begründet und nicht auf Eigenschaften des im wie z.B. dessen PD-L1-Affinität, zurückzuführen seien. Detektionsantikörpers, Bemerkenswert war im Übrigen, dass im Rahmen mehrerer Studien teils sehr gute Konkordanzwerte bis >90 % zwischen verschiedenen Beobachtern bei selbigem Antikörper festgestellt wurden. Zugleich waren die Konkordanzwerte für die Analyse von Tumorzellen gegenüber jenen von Immunzellen höher (Hirsch et al., 2017; Ilie et al., 2016; Tsao et al., 2018; Udall et al., 2018). Auf Basis dieser Erkenntnisse erachten auch

wir eine Standardisierung der PD-L1-Detektionsassays sowie eine Auskunft über den verwendeten Assay im Rahmen von Studien als außerordentlich wichtig. Der Austausch der PD-L1-Detektionsassays könnte womöglich zu einer falschen Einschätzung des PD-L1-Status einiger Patienten führen (Hirsch et al., 2017). Ob zudem eine gesteigerte PD-L1-Expression einen positiven oder negativen prognostischen Faktor darstelle, sei womöglich nicht nur von der vorliegenden Tumorentität abhängig (Wang et al., 2016), sondern auch vom verwendeten Detektionsassay (Ilie et al., 2016; McLaughlin et al., 2016). Durch gezielte Auswahl bestimmter Detektionsassay wäre somit eine geringere Anfärbbarkeit des Tumorgewebes denkbar, wodurch möglicherweise Patienten fälschlicherweise einen zu niedrigen PD-L1-Status zugesprochen bekämen und folglich mögliche ICT nicht zum Einsatz käme. eine Dieser Aspekt könnte im Gesundheitssystem auf Kosten des Patientenwohles missbräuchlich eingesetzt werden. Zugleich ließen sich umgekehrt durch die Auswahl einiger Detektionsassays Patienten leichter für eine ICT bzw. ICT-Studien rekrutieren, da ihnen ein besonders hoher PD-L1-Status zugesprochen würde.

Ein weiterer Fehler bei der PD-L1-Quantifizierung von Tumoren entstehe durch den Versuch der Übertragung von Biopsieanalysen auf den Gesamttumor (McLaughlin et al., 2016; Udall et al., 2018). Wenngleich in einzelnen Studien hervorragende Konkordanzwerte zwischen Biopsie und Tumorresektat erzielt wurden (Kitazono et al., 2015), sei die Übertragbarkeit der Proteinexpression in Biopsiepräparaten oder Gewebemikroarrays auf einen Gesamttumor erschwert und führe möglicherweise zu einer fehlerhaften Einschätzung des PD-L1-Status (Ilie et al., 2016; McLaughlin et al., 2016). Solche beschriebenen Heterogenitäten der Proteinexpression im Tumorgewebe (Madore et al., 2015; McLaughlin et al., 2016) konnten wir ebenfalls sowohl für PD-L1 als auch für CDK5 im Rahmen unserer Experimente nachweisen. Berücksichtigt hierbei wurde eine Vergabe von Intensitätsabstufungen unter Einschluss von mindestens drei Intensitätsabstufungen innerhalb der vierstufigen manuellen Klassifikation (z.B. 3+, 2+ und 1+ bzw. 3+ und 1+) (vgl. 2.5.2) unter Berücksichtigung aller sechs analysierten Felder im Primarius (Felder zufälliger, maximaler sowie minimaler PD-L1-Intensität). Im Bezug auf die PD-L1-Expression traf dies auf 2/18 (11,11 %) der KPC- bzw. auf 6/22 (27,27 %) der KPCC-Präparate des Primarius zu. Im Rahmen der CDK5-Evaluation wurde eine solche Färbeheterogenität bei 3/18 (16,67 %) der KPC- bzw. bei 2/22 (9,09

%) der KPCC-Präparate des Primarius detektiert (Daten nicht gezeigt). Basierend hierauf erachten wir das PDAC-Gewebe innerhalb eines Tumors mehrheitlich als weitgehend homogen im Bezug auf PD-L1- sowie CDK5-Expressionsverhalten. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass es vereinzelt starke Heterogenitäten gibt, die insbesondere im Rahmen von kleinzahligen Probebiopsien zu Fehleinschätzung der PD-L1-Expression bzw. der Expression anderer Proteine von Interesse führen könnten.

Die aufgezeigten Problematiken im Rahmen immunhistochemischer PD-L1-Analysen, die derzeit den Hauptteil der PD-L1-Analysen bildeten (Udall et al., 2018), ziehen die Erprobung neuartiger PD-L1-Analysetechniken nach sich. Conroy et al. (2019) führten daher mRNA-Analysen mittels Next-Generation-Sequenzierung bei NSCLC, Melanomen und Nierenzellkarzinomen durch. Die Bewertung der PD-L1-Expression sowie die Vorhersagegenauigkeit eines Ansprechens auf eine ICT waren mit jenen durchgeführter immunhistochemischer Analysen vergleichbar. Ein kombiniertes positives Resultat für PD-L1 in IHC sowie mRNA-Sequenzierung führte zudem zu höheren Ansprechensraten einer ICT. Laut Autoren lägen Vorteile einer PD-L1-Expressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung in der einfacheren Standardisierung sowie der Vermeidung von beobachterabhängigen Schwankungen begründet. jedoch Da zuletzt hohe Konkordanzen bei IHC-Analysen zwischen verschiedenen Beobachtern bestanden (Hirsch et al., 2017; Ilie et al., 2016; Tsao et al., 2018; Udall et al., 2018), erachten wir weiterhin die Durchführung von Immunhistochemien zur Evaluation des PD-L1-Status als sinnvoll. Die Ergebnisse Conroys et al. (2019) zeigten, dass Präparate mit einer hohen PD-L1-Expression in der IHC tatsächlich meist auch hohe bis sehr hohe PD-L1mRNA Werte aufwiesen. Umgekehrt jedoch lagen die mRNA-Werte von immunhistochemisch weitgehend negativen Tumoren für PD-L1 häufig ebenfalls im Bereich der mRNA-Expression von Tumoren mit hoher immunhistochemischer PD-L1-Expression. Da letztlich der reine mRNA-Anteil keine direkte Aussage über die Translation und die Oberflächenexpression des entsprechenden Proteins zulässt, erachten wir die IHC hier im Allgemeinen als überlegen, sofern ein Detektionsassay mit guter Vergleichskonkordanz zu anderen Detektionsassays verwendet wird. Eine reine mRNA-Analyse könnte nach unserer Auffassung im Vergleich zu IHC-Analysen häufiger zu Fehleinschätzungen des PD-L1-Status führen und dadurch das Gesundheitssystem in Form nicht indizierter PD-1- bzw. PD-L1-ICTs unnötig belasten sowie für Patienten

prinzipiell vermeidbare Nebenwirkungen einer ICT nach sich ziehen. Ein kombiniertes Evaluationsverfahren basierend auf immunhistochemischer PD-L1-Expression sowie mRNA-Expression könnte dagegen eine Sensitivitätssteigerung für das Ansprechen auf eine ICT des PD1-PD-L1-Signalweges bewirken.

Zusammenfassend erachten wir eine detaillierte Auskunft über den verwendeten PD-L1-Detektionsassay im Rahmen von Studien als notwendig. Wir selber müssen die Möglichkeit des Einsatzes eines standardisierten PD-L1-Detektionsassays im Hinblick auf zukünftige Studien prüfen. Die Nichtverwendung eines solchen standardisierten Assays erklärt womöglich unsere hohe detektierte PD-L1-Expression der KPC-Präparate (CDK5 WT) von 83,56 % in den Bereichen zufälliger PD-L1-Expression (Abb. 20) im Vergleich zu bestehenden Literaturwerten zwischen 19 und 55 % (Birnbaum et al., 2016; Chen et al., 2009; Geng et al., 2008; Loos et al., 2008; Nomi et al., 2007; Wang et al., 2010). Weiterhin war unser Cre-Rekombinase-vermitteltes Gen-Knock-Out von CDK5 auf Seiten der KPCC-Population erfolgreich. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der CDK5-Expression in allen vier Testgruppen innerhalb der zweistufigen manuellen Klassifikation (Abb. 21; Abb. 24; Abb. 27; Abb. 30) sowie deutliche Unterschiede der Färbeintensität in der vierstufigen manuellen Klassifikation (Abb. 13; Abb. 15; Abb. 17; Abb. 19) zwischen KPC- und KPCC-Mauspopulation. Zugleich zeigten sich Indizien für eine endogene Reaktivierung (z.B. durch somatische Rekombination) von CDK5 bzw. für eine unvollständige Penetranz des konditionellen Gen-Knock-Outs in der KPCC-Population. Eine andernorts im Western Blot beschriebene relativ verstärkte PD-L1-Expression bei verstärkter CDK5-Expression (Liu et al., 2019) konnten wir hier nicht replizieren (vgl. 3 und 3.1), jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede der PD-L1-Expression in vivo zwischen KPC- (CDK5 WT) und KPCC-Mauspopulation (CDK5 fl/fl) (Abb. 20; Abb. 23; Abb. 26; Abb. 29). Konkordant mit Beobachtungen andernorts (Deng et al., 2019; Dorand et al., 2016; Liu et al., 2019) ging eine vermehrte CDK5-Expression in vivo mit einer gesteigerten PD-L1-Expression einher (Abb. 22; Abb. 25; Abb. 28; Abb. 31). Das Programm IHC Profiler konnte die detektierten Unterschiede in CDK5- und PD-L1-Expression zwischen KPC- und KPCC-Population zudem bekräftigen (Abb. 32; Abb. 33; Abb. 35; Abb. 36). Zugleich wurde deutlich, dass eine rein maschinelle Auswertung einer weiteren Optimierung diverser Parameter bedürfe. Entsprechend erachteten wir die verwendeten manuellen

Zellauszählungsmethoden gegenüber der Auszählung mittels IHC Profiler (ohne weitere Adaptation) beim PDAC als überlegen. Desweiteren zeigte sich die deutlichste Separation der beiden Versuchsgruppen bei gemittelten Werten bestehend aus vier ausgewerteten Tumorbereichen pro Präparat. Auch die Intensitätsverteilungen in der vierstufigen manuellen Klassifikation für PD-L1 bzw. CDK5 repräsentierten in besagten Bereichen das Tumorgewebe am umfassendsten (Abb. 12; Abb. 13; Abb. 22). Die Bildung von Mittelwerten in Bezug auf die Anteile PD-L1- bzw. CDK5-positiver Tumorzellen bzw. die Färbeintensitäten führte zu einer schwächeren Berücksichtigung von Ausreißern. Wir empfehlen entsprechend auch im klinischen Kontext die Entnahme einer hinreichenden Biopsieanzahl bei der Fragestellung nach Indikation für eine ICT, um den PD-L1-Status eines Patienten adäquat zu erfassen. Da sich das Ziel unserer Studie bestätigte und sich auch für das duktale Adenokarzinom des Pankreas eine gesteigerte PD-L1-Expression bei vermehrter CDK5-Expression zeigte (vgl. 1.3), kommt eine Immuncheckpointblockade PD1-PD-L1-Signalachse der auch beim Pankreaskarzinom prinzipiell in Frage. Aufgrund des beschriebenen schlechten Ansprechens von Pankreaskarzinomen auf Monotherapien prognostizieren wir Kombinationstherapien in Form einer ICT gepaart mit anderen Therapeutika als überlegen. Insbesondere eine Kombination mit CDK5-Inhibitoren wie Dinaciclib erscheint vielversprechend, da eine CDK5-Blockade über Beeinträchtigung der CDK5vermittelten PD-L1-Hochregulation sowie über tiefgreifende Inhibition des Ras-Signalweges zu verringertem Tumorwachstum und geringerer Metastasierung führte (Deng et al., 2019; Dorand et al., 2016; Feldmann et al., 2010; Hu et al., 2015; Liu et al., 2019). Bei Vorliegen aktivierender Mutationen des Kras-Signalweges in mehr als 90 % der Fälle (Hruban et al., 2000; Jones et al., 2008) ist CDK5 somit in zwei relevante Signalwege involviert, die potentielle Angriffspunkte in der Therapie des PDAC bilden.

Weitere Experimente werden nötig sein, um abschließend zu klären, ob die beobachtete verringerte PD-L1-Expression bei PDACs der KPCC-Mäuse (CDK5 fl/fl) tatsächlich im Gen-Knock-Out von CDK5 begründet ist und ob auch für das PDAC de facto eine CDK5-abhängige IFN-γ-vermittelte PD-L1-Hochregulation besteht (Dorand et al, 2016).

4.2 Ausblick

Die vorliegende Studie diente der Evaluation einer gesteigerten PD-L1-Expression bei erhöhter CDK5-Expression bzw. eines Abfalls der PD-L1-Expression bei CDK5-Knock-Out ähnlich dem Beispiel Dorands et al. (2016). Auch wir konnten eine positive Korrelation der Expression beider Moleküle für das duktale Adenokarzinom des Pankreas nachweisen. Um eine Kausalität auch für das PDAC herstellen zu können, bedarf es Folgeversuchen insbesondere mit Fokus auf die beschriebene CDK5abhängige IFN-y-vermittelte PD-L1-Hochregulation (Dorand et al., 2016). Die detektierte PD-L1-Herabregulation unter CDK5-Knock-Out bildet eine grundlegende Voraussetzung für unsere zukünftigen Therapieversuche, bei denen unselektive CDK5-Inhibitoren wie Dinaciclib oder Inhibitoren des PD1-PD-L1-Signalweges zum Einsatz kommen könnten. Eine CDK5-Inhibition führt augenscheinlich zu einer verringerten PD-L1-Expression und somit zu einer Immuncheckpointmodulation. Da unsere Literaturrecherche eine verbesserte antitumorale Wirkung bei Therapieregimen bestehend aus mehreren Therapeutika aufzeigte, erscheint auch die Testung kombinierter Therapieansätze sinnvoll. Im Rahmen weiterer Versuche sollen auch die Haupteffektorzellen der antitumoralen Immunantwort beim Pankreaskarzinom evaluiert werden. Organabhängig wurden sowohl CD4- als auch CD8-positive Immunzellen als Haupteffektorzellen beschrieben (Dorand et al., 2016; Topalian et al., 2016). Ein Erkenntnisgewinn hierüber könnte eine weitere direkte Immunzellstimulation durch entsprechende Aktivatoren zukünftig ermöglichen und die Bekämpfung des Pankreaskarzinoms weiter verbessern. Daneben soll in Folgeversuchen bei Vergleichen von KPC- (CDK5 WT) und KPCC-Mauspopulationen (CDK5 fl/fl) ein Hauptaugenmerk auf das Gesamtüberleben bzw. die Zeit bis zum Erreichen definierter Endpunktkriterien gelegt werden. Dadurch sowie durch eine statistische Erhebung von Metastasenanzahl, -größe und -morphologie sollen qualitative Aussagen über Unterschiede des Metastasierungsverhaltens sowie im Bezug auf das Gesamtüberleben beider Mauspopulation im Allgemeinen sowie unter Therapie ermöglicht werden.

5. Zusammenfassung

Dorand et al. zeigten 2016 am Medulloblastom-Mausmodell, dass eine von der Cyclinabhängigen Kinase 5 (CDK5) abhängige Interferon-y-vermittelte Hochregulation des Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) existient. Es gibt Indizien, dass dieser Mechanismus nicht Medulloblastom-spezifisch ist. Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, die CDK5-abhängige PD-L1-Hochregulation auch für das duktale Adenokarzinom des Pankreas nachzuweisen. Sieben Zelllinien duktaler Adenokarzinome des Pankreas (PDAC) wurden kultiviert und Mauslinien der Genotypen LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}; PDX1-Cre (KPC-Mauspopulation, homozygoter Wildtyp für CDK5) und LSL-Kras^{G12D}; LSL-Trp53^{R172H}: PDX1-Cre; CDK5 fl/fl (KPCC-Mauspopulation, homozygotes konditionelles Gen-Knockout für CDK5) erzeugt, die im Verlauf PDAC entwickelten. Die Beobachtung, dass eine gesteigerte CDK5-Expression im Western Blot mit einer erhöhten PD-L1-Expression einherging, konnten wir hier nicht reproduzieren. Im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen der Pankreastumoren zeigten sich hingegen signifikante Expressionsunterschiede für PD-L1 sowie für CDK5 im Vergleich beider Mauspopulationen. Der Nachweis einer signifikant niedrigeren CDK5-Aktivität in der KPCC-Population bestätigte den Erfolg des konditionellen CDK5-Knock-Outs. Die höhere CDK5-Expression in der KPC-Mauspopulation ging einher mit einer vermehrten PD-L1-Expression, wodurch wir unsere Ausgangshypothese bestätigten. Eine maschinelle Auswertung mit dem Programm IHC Profiler bekräftigte zudem als objektiver Parameter unsere Beobachtung. Die Auswertung mittels IHC Profiler ohne Optimierung der Analyseparameter erachteten wir jedoch als nachteilig gegenüber manuellen Auswertungsmethoden. Bei Analyse der Expression von CDK5 bzw. PD-L1 führte die Bildung von Mittelwerten zu stärkerer Separation der Versuchsgruppen, Ausreißerwerte wurden besser kompensiert und das Tumorgewebe in seiner Gesamtheit besser repräsentiert. Wir empfehlen daher die Entnahme von mindestens bzw. vier Biopsien unterschiedlichen Tumorbereichen aus Metastasen zur Expressionsanalyse therapeutisch relevanter Proteine. Auf Basis unserer Literaturrecherche erachten wir zudem eine Auskunft über verwendete PD-L1-Detektionsassays als sinnvoll. Außerdem besteht die Notwendigkeit definierter Austauschkriterien für entsprechende Detektionsassays. Therapeutisch kommen

aufgrund hoher Anteile PD-L1-positiver Tumorzellen entsprechende Immuncheckpointinhibitoren für das Pankreaskarzinoms in Betracht. Da unser CDK5-Knock-Out (KPCC-Mauspopulation) mit einer verringerten PD-L1-Expression einherging, bildet auch CDK5 ein Angriffsziel mit Blick auf eine Immuncheckpointmodulation. Insbesondere die Inhibition von CDK5 böte beim Pankreaskarzinom aufgrund der bekannten Ras-CDK5-Ral-Signalachse sowie dem hohen Anteil aktivierender Kras-Mutationen zusätzliche antitumorale Eigenschaften. Gegenwärtige Literatur zeigt häufig eine Überlegenheit von Kombinationstherapien beim duktalen Adenokarzinom des Pankreas. Somit erscheinen Kombinationstherapien bestehend aus Inhibitoren von CDK5 sowie des PD-L1-Signalweges untereinander oder mit anderen antitumoralen Wirkstoffen zukünftig besonders vielversprechend.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Inzidenz, Mortalität und Mortalität/Inzidenz-Verhältnis bösartiger gastrointestinaler Tumoren weltweit nach Ferlay et al. (2015)	16
	04
Abb. 2: CDK5-abhangige Expression des Programmed Cell Death Ligand 1	21
nach Dorand et al. (2016)	
Abb. 3: Absorptionsmessung der BSA-Standards	35
Abb. 4: Schematische Darstellung der Analysefeldauswahl innerhalb der	57
Präparate	
Abb. 5: Exemplarische Darstellung der erzeugten Serienschnitte, PDAC- Gewebe aus Primärtumoren	58
Abb. 6: Exemplarische Darstellung der erzeugten Serienschnitte. PDAC-	59
Gewebe einer Lebermetastase	
Abb. 7: Intensitätsstufen der vierstufigen manuellen Klassifikation	61
Abb. 8: PD-L1-Expressionsprofil der PDAC-Zelllinien im Western Blot	73
Abb. 9: CDK5-Expressionsprofil der HPNE- sowie PDAC-Zelllinien im	74
Western Blot	
Abb. 10: Relative Expression von CDK5- und PD-L1 im Western Blot	75
Abb. 11: Korrelation der Expression von CDK5- und PD-L1 im Western Blot	76
Abb. 12: PD-L1-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität	77
im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation	
Abb. 13: CDK5-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität	78
im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation	
Abb. 14: PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität	79
im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation	
Abb. 15: CDK5-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität	80
im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation	

Abb. 16: PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität 81 im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation Abb. 17: CDK5-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität 82 im Primärtumor, vierstufige manuelle Klassifikation Abb. 18: PD-L1-Expression der Lebermetastasen, vierstufige manuelle 83 Klassifikation Abb. 19: CDK5-Expression der Lebermetastasen, vierstufige manuelle 84 Klassifikation Abb. 20: PD-L1-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität 85 im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 21: CDK5-Expression der Präparatbereiche zufälliger PD-L1-Intensität 86 im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 22: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche 87 zufälliger PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 23: PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität 88 im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 24: CDK5-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität 89 im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 25: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche 90 maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 26: PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität 91 im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 27: CDK5-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität 92 im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation Abb. 28: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche 93 minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige manuelle Klassifikation

Abb. 29: PD-L1-Expression der Lebermetastasen, zweistufige manuelle	94
Klassifikation	
Abb. 30: CDK5-Expression der Lebermetastasen, zweistufige manuelle	95
Klassifikation	
Abb. 31: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Lebermetastasen,	96
zweistufige manuelle Klassifikation	
Abb. 32: PD-L1-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität	97
im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation	
Abb. 33: CDK5-Expression der Präparatbereiche maximaler PD-L1-Intensität	98
im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation	
Abb. 34: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche	99
maximaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle	
Klassifikation	
Abb. 35: PD-L1-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität	100
im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation	
Abb. 36: CDK5-Expression der Präparatbereiche minimaler PD-L1-Intensität	101
im Primärtumor, zweistufige maschinelle Klassifikation	
Abb. 37: Korrelation von CDK5- und PD-L1-Expression der Präparatbereiche	102
minimaler PD-L1-Intensität im Primärtumor, zweistufige maschinelle	
Klassifikation	

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: PDAC-Zelllinien (adaptiert nach Schütte, 2015).	26-27
Tab. 2: Nicht-karzinomatöse Zelllinie des Pankreas (adaptiert nach Schütte,	28
2015).	
Tab. 3: Zellkulturreagenzien.	28-29
Tab. 4: Komplettes DMEM Zellkulturmedium.	29
Tab. 5: Reagenzien und Material für den BCA-Assay.	32
Tab. 6: RIPA Plus für Proteinkonzentrationsmessung.	33
Tab. 7: BCA-Lösung für Proteinkonzentrationsmessung.	33
Tab. 8: Reagenzien und Material für den Western Blot.	36-38
Tab. 9: Puffer und Lösungen für den Western Blot.	39-40
Tab. 10: Gele für den Western Blot.	41
Tab. 11: Reagenzien und Material für die Einbettung in Paraffin.	50
Tab. 12: Reagenzien und Material zur Erzeugung von Serienschnitten mittels	51
Mikrotom.	
Tab. 13: Reagenzien für die Immunhistochemie.	52-53
Tab. 14: Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie.	54
Tab. 15: Material für die Fotodokumentation der Präparate.	56
Tab. 16: Material für die zweistufige maschinelle Klassifikation.	62
Tab. 17: Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT)	103-104
unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).	
Tab. 18: Vergleich der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT)	105
unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHC	
Profiler (vgl. 2.5.4).	
Tab. 19: Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT)	106-107

unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

Tab. 20: Vergleich der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT)108unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHCProfiler (vgl. 2.5.4).

Tab. 21: Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl)109-110unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

Tab. 22: Vergleich der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl)111unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHCProfiler (vgl. 2.5.4).

Tab. 23: Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) 112-113 unter Anwendung der zweistufigen manuellen Klassifikation (vgl. 2.5.3).

Tab. 24: Vergleich der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl)114unter Anwendung der zweistufigen maschinellen Klassifikation mittels IHCProfiler (vgl. 2.5.4).

Tab.25:Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der115zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der PD-L1-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

Tab.26:Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der116zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der PD-L1-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

Tab. 27: Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der117zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der CDK5-Expression der KPC-Testgruppen (CDK5 WT) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

Tab. 28: Vergleich der zweistufigen manuellen Klassifikation mit der118zweistufigen maschinellen Klassifikation (IHC Profiler) anhand der CDK5-Expression der KPCC-Testgruppen (CDK5 fl/fl) (vgl. 2.5.3 und 2.5.4).

8. Literaturverzeichnis

Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, Bonaventure A, Valkov M, Johnson CJ, Estève J, Ogunbiyi OJ, Azevedo E Silva G, Chen WQ, Eser S, Engholm G, Stiller CA, Monnereau A, Woods RR, Visser O, Lim GH, Aitken J, Weir HK, Coleman MP; CONCORD Working Group. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. The Lancet. 2018;391(10125):1023-1075. doi:10.1016/S0140-6736(17)33326-3. [PubMed: 29395269]

American Cancer Society, 2019 a: Cancer Facts & Figures 2019. https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-andstatistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf (Zugriffsdatum: 14.08.2019)

American Cancer Society, 2019 b: Pancreatic Cancer Risk Factors. https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/causes-risks-prevention/riskfactors.html (Zugriffsdatum: 15.08.2019)

American Cancer Society, 2019 c: Targeted Therapy for Pancreatic Cancer. https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/treating/targeted-therapy.html (Zugriffsdatum: 14.08.2019)

Biorbyt, 2019: PDL1 antibody orb158130, Product Datasheet. https://www.biorbyt.com/override/product/printdatasheet/product_id/307423/ (Zugriffsdatum: 14.05.2019)

Birnbaum DJ, Finetti P, Lopresti A, Gilabert M, Poizat F, Turrini O, Raoul JL, Delpero JR, Moutardier V, Birnbaum D, Mamessier E, Bertucci F. Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer. Oncotarget. 2016;7(44):71198-71210. doi:10.18632/oncotarget.11685. [PubMed: 27589570]

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, Stankevich E, Pons A, Salay TM, McMiller TL, Gilson MM, Wang C, Selby M, Taube JM, Anders R,

Chen L, Korman AJ, Pardoll DM, Lowy I, Topalian SL. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. J Clin Oncol. 2010;28(19):3167-3175. doi:10.1200/JCO.2009.26.7609. [PubMed: 20516446]

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthy S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2455-2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694. [PubMed: 22658128]

Carpelan-Holmström M, Nordling S, Pukkala E, Sankila R, Lüttges J, Klöppel G, Haglund C. Does anyone survive pancreatic ductal adenocarcinoma? A nationwide study re-evaluating the data of the Finnish Cancer Registry. Gut. 2005;54(3):385-387. doi:10.1136/gut.2004.047191. [PubMed: 15710987]

Cell Signaling Technology, 2014: #2118 GAPDH (14C10) Rabbit mAb. https://media.cellsignal.com/pdf/2118.pdf (Zugriffsdatum: 14.05.2019)

Cell Signaling Technology, 2015: #7074 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody. https://media.cellsignal.com/pdf/7074.pdf (Zugriffsdatum: 14.05.2019)

Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, Shimano T, Penetrante R, Sanders WH, Berjian R, Douglass HO, Martin EW, Chu TM. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. In Vitro. 1982;18:24–34. doi.org/10.1007/BF02796382. [PubMed: 7182348]

Chen Y, Sun J, Zhao H, Zhu D, Zhi Q, Song S, Zhang L, He S, Kuang Y, Zhang Z, Li D. The coexpression and clinical significance of costimulatory molecules B7-H1, B7-H3, and B7-H4 in human pancreatic cancer. Onco Targets Ther. 2014;7:1465-1472. doi:10.2147/OTT.S66809. eCollection 2014. [PubMed: 25170273]

Childs KS, Goodbourn S. Identification of novel co-repressor molecules for Interferon Regulatory Factor-2. Nucleic Acids Res. 2003;31:3016–3026. doi:10.1093/nar/gkg431. [PubMed: 12799427]

Cimino-Mathews A, Thompson E, Taube JM, Ye X, Lu Y, Meeker A, Xu H, Sharma R, Lecksell K, Cornish TC, Cuka N, Argani P, Emens LA. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas. Hum Pathol. 2016;47(1):52-63. doi:10.1016/j.humpath.2015.09.003. [PubMed: 26527522]

Conroy JM, Pabla S, Nesline MK, Glenn ST, Papanicolau-Sengos A, Burgher B, Andreas J, Giamo V, Wang Y, Lenzo FL, Bshara W, Khalil M, Dy GK, Madden KG, Shirai K, Dragnev K, Tafe LJ, Zhu J, Labriola M, Marin D, McCall SJ, Clarke J, George DJ, Zhang T, Zibelman M, Ghatalia P, Araujo-Fernandez I, de la Cruz-Merino L, Singavi A, George B, MacKinnon AC, Thompson J, Singh R, Jacob R, Kasuganti D, Shah N, Day R, Galluzzi L, Gardner M, Morrison C. Next generation sequencing of PD-L1 for predicting response to immune checkpoint inhibitors. J Immunother Cancer. 2019;7(1):18. doi:10.1186/s40425-018-0489-5. [PubMed: 30678715]

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med. 2011;364(19):1817-1825. doi:10.1056/NEJMoa1011923. [PubMed: 21561347]

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, Choné L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, Lecomte T, Assenat E, Faroux R, Ychou M, Volet J, Sauvanet A, Breysacher G, Di Fiore F, Cripps C, Kavan P, Texereau P, Bouhier-Leporrier K, Khemissa-Akouz F, Legoux JL, Juzyna B, Gourgou S, O'Callaghan CJ, Jouffroy-Zeller C, Rat P, Malka D, Castan F, Bachet JB; Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI–PRODIGE Group. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. N Engl J Med. 2018;379(25): 2395–2406. doi:10.1056/NEJMoa1809775. [PubMed: 30575490] Deng H, Tan S, Gao X, Zou C, Xu C, Tu K, Song Q, Fan F, Huang W, Zhang Z. Cdk5 knocking out mediated by CRISPR-Cas9 genome editing for PD-L1 attenuation and enhanced antitumor immunity. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2019. doi.org/10.1016/j.apsb.2019.07.004

Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(26):15623-8. doi:10.1073/pnas.95.26.15623. [PubMed: 9861020]

Dorand RD, Nthale J, Myers JT, Barkauskas DS, Avril S, Chirieleison SM, Pareek TK, Abbott DW, Stearns DS, Letterio JJ, Huang AY, Petrosiute A. Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity. Science. 2016;353(6297):399-403. doi:10.1126/science.aae0477. [PubMed: 27463676]

Drucker BJ, Marincola FM, Siao DY, Donlon TA, Bangs CD, Holder WD Jr. A new human pancreatic carcinoma cell line developed for adoptive immunotherapy studies with lymphokine-activated killer cells in nude mice. In Vitro Cell Dev Biol. 1988; 24(12):1179-1187. doi.org/10.1007/BF02624187

Eatrides JM, Coppola D, Diffalha SA, Kim RD, Springett GM, Mahipal A. Microsatellite instability in pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2016;34 (Suppl. 15), e15753. doi:10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.e15753

Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJ, Deonarine A, Chan DS, Connell CM, Roberts EW, Zhao Q, Caballero OL, Teichmann SA, Janowitz T, Jodrell DI, Tuveson DA, Fearon DT. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(50):20212-20217. doi:10.1073/pnas.1320318110. [PubMed: 24277834]

Feldmann G, Mishra A, Bisht S, Karikari C, Garrido-Laguna I, Rasheed Z, Ottenhof NA, Dadon T, Alvarez H, Fendrich V, Rajeshkumar NV, Matsui W, Brossart P, Hidalgo M, Bannerji R, Maitra A, Nelkin BD. Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft
models. Cancer Biology & Therapy. 2011;12(7):598-609. doi:10.4161/cbt.12.7.16475. [PubMed: 21768779]

Feldmann G, Mishra A, Hong SM, Bisht S, Strock CJ, Ball DW, Goggins M, Maitra A, Nelkin BD. Inhibiting the cyclin-dependent kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. Cancer Res. 2010;70(11):4460-4469. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1107. [PubMed: 20484029]

Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, Slater EP, Maitra A, Bartsch DK. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. Gut. 2010;59(5):630-637. doi:10.1136/gut.2009.188961. [PubMed: 19880966]

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359-386. doi:10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9. [PubMed: 25220842]

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst. 1977; 59:221-226. [PubMed: 327080]

Gaule P, Smithy JW, Toki M, Rehman J, Patell-Socha F, Cougot D, Collin P, Morrill P, Neumeister V, Rimm DL. A Quantitative Comparison of Antibodies to Programmed Cell Death 1 Ligand 1. JAMA Oncol. 2017;3(2):256-259. doi:10.1001/jamaoncol.2016.3015. [PubMed: 27541827]

Geng L, Huang D, Liu J, Qian Y, Deng J, Li D, Hu Z, Zhang J, Jiang G, Zheng S. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. J Cancer Res Clin Oncol. 2008;134(9):1021-1027. doi:10.1007/s0S432-008-0364-8. Epub 2008 Mar 18. [PubMed: 18347814]

Guo S, Contratto M, Miller G, Leichman L, Wu J. Immunotherapy in pancreatic cancer: Unleash its potential through novel combinations. World J Clin Oncol. 2017;8(3):230-240. doi:10.5306/wjco.v8.i3.230. [PubMed: 28638792]

Habbe N, Shi G, Meguid RA, Fendrich V, Esni F, Chen H, Feldmann G, Stoffers DA, Konieczny SF, Leach SD, Maitra A. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(48):18913-18918. doi:10.1073/pnas.0810097105. [PubMed: 19028870]

Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. Cell. 1989;58:729–739. doi:10.1016/0092-8674(89)90107-4. [PubMed: 2475256]

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. Cancer Cell. 2003;4(6):437-450. doi:10.1016/S1535-6108(03)00309-X.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Cancer Cell. 2005;7(5):469-483. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.023. [PubMed: 15894267]

Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, Richardson W, Towne P, Hanks D, Vennapusa B, Mistry A, Kalamegham R, Averbuch S, Novotny J, Rubin E, Emancipator K, McCaffery I, Williams JA, Walker J, Longshore J, Tsao MS, Kerr KM. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. J Thorac Oncol. 2017;12(2):208-222. doi:10.1016/j.jtho.2016.11.2228. [PubMed: 27913228]

Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2000 Aug;6(8):2969-2972. [PubMed: 10955772]

146

Hu C, Dadon T, Chenna V, Yabuuchi S, Bannerji R, Booher R, Strack P, Azad N, Nelkin BD, Maitra A. Combined Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases (Dinaciclib) and AKT (MK-2206) Blocks Pancreatic Tumor Growth and Metastases in Patient-Derived Xenograft Models. Mol Cancer Ther. 2015;14(7):1532-1539. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0028. [PubMed: 25931518]

Hu ZI, Shia J, Stadler ZK, Varghese AM, Capanu M, Salo-Mullen E, Lowery MA, Diaz LA Jr, Mandelker D, Yu KH, Zervoudakis A, Kelsen DP, Iacobuzio-Donahue CA, Klimstra DS, Saltz LB, Sahin IH, O'Reilly EM. Evaluating Mismatch Repair Deficiency in Pancreatic Adenocarcinoma: Challenges and Recommendations. Clin Cancer Res. 2018;24(6):1326-1336. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3099. [PubMed: 29367431]

Ilie M, Falk AT, Butori C, Chamorey E, Bonnetaud C, Long E, Lassalle S, Zahaf K, Vénissac N, Mouroux J, Cohen C, Brambilla E, Marquette CH, Hofman V, Hofman P. PD-L1 expression in basaloid squamous cell lung carcinoma: Relationship to PD-1+ and CD8+ tumor-infiltrating T cells and outcome. Mod Pathol. 2016;29(12):1552-1564. doi:10.1038/modpathol.2016.149. [PubMed: 27562497]

Jaffee EM, Schutte M, Gossett J, Morsberger LA, Adler AJ, Thomas M, Greten TF, Hruban RH, Yeo CJ, Griffin CA. Development and characterization of a cytokine-secreting pancreatic adenocarcinoma vaccine from primary tumors for use in clinical trials. Cancer J Sci Am. 1998;4:194-203. [PubMed: 9612602]

Johansson H, Andersson R, Bauden M, Hammes S, Holdenrieder S, Ansari D. Immune checkpoint therapy for pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2016;22(43):9457-9476. doi:10.3748/wjg.v22.i43.9457. [PubMed: 27920468]

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealedby global genomic analyses. Science. 2008;321(5897):1801-1806. doi:10.1126/science.1164368. Epub 2008 Sep 4. [PubMed: 18772397]

Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, Koulmanda M, Freeman GJ, Sayegh MH, Sharpe AH.Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. J Exp Med. 2006;203(4):883-895. doi:10.1084/jem.20051776. [PubMed: 16606670]

Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, Utsumi H, Kanda S, Horinouchi H, Nokihara H, Yamamoto N, Sasada S, Watanabe S, Asamura H, Tamura T, Ohe Y. Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2015;16(5):385-390. doi:10.1016/j.cllc.2015.03.008. [PubMed: 25937270]

Kyriazis AP, Kyriazis AA, Scarpelli DG, Fogh J, Rao MS, Lepera R. Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics. Am J Pathol. 1982;106(2):250-260. [PubMed: 6278935]

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Sznol M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med. 2015;373(1):23-34. doi:10.1056/NEJMoa1504030. [PubMed: 26027431]

Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ,Sharpe AH. PDL1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigenpresenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(29):10691-10696. doi:10.1073/pnas.0307252101. [PubMed: 15249675]

Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, Wong F, Azad NS, Rucki AA, Laheru D, Donehower R, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Greten TF, Duffy AG, Ciombor KK, Eyring AD, Lam

BH, Joe A, Kang SP, Holdhoff M, Danilova L, Cope L, Meyer C, Zhou S, Goldberg RM, Armstrong DK, Bever KM, Fader AN, Taube J, Housseau F, Spetzler D, Xiao N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Eshleman JR, Vogelstein B, Anders RA, Diaz LA Jr. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science. 2017;357(6349):409-413. doi:10.1126/science.aan6733. [PubMed: 28596308]

Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. Ν Engl J Med. 2015;372(26):2509-2520. doi:10.1056/NEJMoa1500596. [PubMed: 26028255]

Lee KM, Nguyen C, Ulrich AB, Pour PM, Ouellette MM. Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. Biochem Biophys Res Commun. 2003;21;301(4):1038-1044. doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00086-X. [PubMed: 12589817]

Lee SJ, Jang BC, Lee SW, Yang YI, Suh SI, Park YM, Oh S, Shin JG, Yao S, Chen L, Choi IH. Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). FEBS Lett. 2006;580:755–762. doi:10.1016/j.febslet.2005.12.093. Epub 2006 Jan 9. [PubMed: 16413538]

Lemery S, Keegan P, Pazdur R. First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a Biomarker Defines the Indication. N Engl J Med. 2017;377(15):1409-1412. doi:10.1056/NEJMp1709968. [PubMed: 29020592]

Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. Int J Cancer. 1975;15:741-747. doi:10.1002/ijc.2910150505. [PubMed: 1140870]

Lipson EJ, Forde PM, Hammers H-J, Emens LA, Taube JM, Topalian SL. Antagonists of PD-1 and PD-L1 in Cancer Treatment. Semin Oncol. 2015;42(4):587-600. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.05.013. [PubMed: 26320063]

Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM, Anders RA, Xu H, Yao S, Pons A, Chen L, Pardoll DM, Brahmer JR, Topalian SL. Durable cancer regression offtreatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. Clin Cancer Res. 2013 a;19(2):462-468. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2625. [PubMed: 23169436]

Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Luber BS, Wang H, Xu H, Nayar SK, Wang TS, Sidransky D, Anders RA, Topalian SL, Taube JM. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: Association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. Cancer Immunol Res. 2013 b;1(1):54-63. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0034. [PubMed: 24416729]

Liu CC, Zhang HL, Zhi LL, Jin P, Zhao L, Li T, Zhou XM, Sun DS, Cheng GH, Xin Q, Shi L, Xia M. CDK5 Regulates PD-L1 Expression and Cell Maturation in Dendritic Cells of CRSwNP. Inflammation. 2019;42(1):135-144. doi:10.1007/s10753-018-0879-3. [PubMed: 30187339]

Liu Q, Liao Q, Zhao Y. Chemotherapy and tumor microenvironment of pancreatic cancer. Cancer Cell Int. 2017:17:68. doi:10.1186/s12935-017-0437-3. eCollection 2017. [PubMed: 28694739]

Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, Laschinger M, W Büchler M, Friess H. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2008;268(1):98-109. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.056. Epub 2008 May 16. [PubMed: 18486325]

Macherla S, Laks S, Naqash AR, Bulumulle A, Zervos E, Muzaffar M. Emerging Role of Immune Checkpoint Blockade in Pancreatic Cancer. Int J Mol Sci. 2018;19(11). pii: E3505. doi:10.3390/ijms19113505. [PubMed: 30405053]

Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, Yearley JH, Kefford RF, Thompson JF, Long GV, Hersey P, Scolyer RA. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. Pigment Cell Melanoma Res. 2015;28(3):245-253. doi:10.1111/pcmr.12340. [PubMed: 25477049]

McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, Velcheti V, Herbst R, LoRusso P, Rimm DL. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. JAMA Oncol. 2016;2(1):46-54. doi:10.1001/jamaoncol.2015.3638. [PubMed: 26562159]

Miao L, Li J, Liu Q, Feng R, Das M, Lin CM, Goodwin TJ, Dorosheva O, Liu R, Huang L. Transient and Local Expression of Chemokine and Immune Checkpoint Traps to Treat Pancreatic Cancer. ACS Nano. 2017. doi:10.1021/acsnano.7b01786. [PubMed: 28809532]

Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. Ann Oncol. 1999;10 Suppl 4:82-84. [PubMed: 10436792]

NationalComprehensiveCancerNetwork,2017:NCCNFlashUpdate:PancreaticAdenocarcinoma.https://www.nccn.org/about/news/ebulletin/ebulletindetail.aspx?ebulletinid=1193(Zugriffsdatum: 20.08.2019)

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. Immunity. 1999;11(2):141-151. doi:10.1016/S1074-7613(00)80089-8. [PubMed: 10485649]

Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, Sasayama S, Mizoguchi A, Hiai H, Minato N, Honjo T. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science. 2001;291(5502):319-322. doi:10.1126/science.291.5502.319. [PubMed: 11209085]

Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, Nakamura S, Enomoto K, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2151-2157. [PubMed: 17404099]

Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. Trends Mol Med.

2015;21(1):24-33. doi:10.1016/j.molmed.2014.10.009. Epub 2014 Oct 30. [PubMed: 25440090]

Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. Science. 2009;324(5933):1457-1461. doi:10.1126/science.1171362. [PubMed:19460966]

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2012;12(4):252-264. doi:10.1038/nrc3239. [PubMed: 22437870]

Santa Cruz Biotechnology, Inc., 2019: Cdk5 (C-8): sc-173. https://datasheets.scbt.com/sc-173.pdf (Zugriffsdatum: 14.05.2019)

Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, Rimm DL. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. Clin Cancer Res. 2014;20(10):2773-2782. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2702. [PubMed: 24647569]

Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, Jöhrens K, Kirchner T, Reu S, Rüschoff J, Schildhaus HU, Schirmacher P, Tiemann M, Warth A, Weichert W, Fischer RN, Wolf J, Buettner R. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. Mod Pathol. 2016;29(10):1165-1172. doi:10.1038/modpathol.2016.117. [PubMed: 27389313]

Schütte UT. The role of the Hippo pathway in etiology and progression of pancreatobiliary tumors and clear cell renal cell carcinoma. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn. 2015: http://hss.ulb.unibonn.de/2016/4255/4255.pdf (Zugriffsdatum: 14.05.2019) Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. Sao Paulo Med J. 2009;127(1):46-51. doi.org/10.1590/S1516-31802009000100010. [PubMed: 19466295]

Song JH, Wang CX, Song DK, Wang P, Shuaib A, Hao C. Interferon γ Induces Neurite Outgrowth by Up-regulation of p35 Neuron-specific Cyclin-dependent Kinase 5 Activator via Activation of ERK1/2 Pathway. J Biol Chem. 2005;280:12896–12901. doi.org/10.1074/jbc.M412139200. [PubMed: 15695523]

Sunshine JC, Nguyen PL, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Berry S, Esandrio J, Xu H, Ogurtsova A, Bleich KB, Cornish TC, Lipson EJ, Anders RA, Taube JM. PD-L1 Expression in Melanoma: A Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison. Clin Cancer Res. 2017;23(16):4938-4944. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1821. [PubMed: 28428193]

Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, Pickren JW, Berjian R, Douglass HO Jr, Chu TM. Characterization of a New Primary Human Pancreatic Tumor Line. Cancer Investigation. 1986;4:1, 15-23.doi:10.3109/07357908609039823. [PubMed: 3754176]

Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. Sci Transl Med. 2012;4(127):127ra37. doi:10.1126/scitranslmed.3003689. [PubMed: 22461641]

The Jackson Laboratory, 2019: Mouse Strain Datasheet – 014156. https://www.jax.org/Strain/UrlAsPDF/014156 (Zugriffsdatum: 13.08.2019)

Thermo Fisher Scientific, 2012: TECH TIP #57 How to use a protein assay standard curve. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0057-Read-std-curves.pdf (Zugriffsdatum: 14.05.2019)

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L,

Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. N Engl J Med. 2012:366(26):2443-2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690. [PubMed: 22658127]

Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2016;16(5):275-287. doi:10.1038/nrc.2016.36. [PubMed: 27079802]

Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, Bubendorf L, Chirieac L, Chen G, Chou TY, Chung JH, Dacic S, Lantuejoul S, Mino-Kenudson M, Moreira AL, Nicholson AG, Noguchi M, Pelosi G, Poleri C, Russell PA, Sauter J, Thunnissen E, Wistuba I, Yu H, Wynes MW, Pintilie M, Yatabe Y, Hirsch FR. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. J Thorac Oncol. 2018;13(9):1302-1311. doi:10.1016/j.jtho.2018.05.013. [PubMed: 29800747]

U.S. Food and Drug Administration, 2017: FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication. https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-first-tissuesite-agnostic-indication (Zugriffsdatum: 20.08.2019)

Udall M, Rizzo M, Kenny J, Doherty J, Dahm S, Robbins P, Faulkner E. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. Diagn Pathol. 2018;13(1):12. doi:10.1186/s13000-018-0689-9. [PubMed: 29426340]

Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS One. 2014;9(5):e96801. doi:10.1371/journal.pone.0096801. eCollection 2014. [PubMed: 24802416]

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology. 1999;116(6):1453-1456. doi:10.1016/s0016-5085(99)70510-x. [PubMed: 10348829]

Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, Herbst RS, Gettinger SN, Chen L, Rimm DL. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. Lab Invest. 2014;94(1):107-116. doi:10.1038/labinvest.2013.130. [PubMed: 24217091]

Wang L, Ma Q, Chen X, Guo K, Li J, Zhang M. Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma. World J Surg. 2010;34(5):1059-1065. doi:10.1007/s00268-010-0448-x. [PubMed: 20145927]

Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. Onco Targets Ther. 2016;9:5023-39. doi:10.2147/OTT.S105862. eCollection 2016. [PubMed: 27574444]

Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. Int J Cancer. 1977;19:128-135. doi:10.1002/ijc.2910190118. [PubMed: 832918]

Zhang CM, Lv JF, Gong L, Yu LY, Chen XP, Zhou HH, Fan L. Role of Deficient Mismatch Repair in the Personalized Management of Colorectal Cancer. Int J Environ Res Public Health. 2016;13(9). pii: E892. doi:10.3390/ijerph13090892. [PubMed: 27618077]

Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. J Mol Diagn. 2008;10(4):301-307. doi:10.2353/jmoldx.2008.080062. [PubMed: 18556776]

Zheng L, Xue J, Jaffee EM, Habtezion A. Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. Gastroenterology. 2013;144(6):1230-1240. doi:10.1053/j.gastro.2012.12.042. [PubMed: 23622132]

155

9. Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn PD Dr. med. Georg Feldmann sowie Frau Dr. phil. Savita Bisht-Feldmann für die Vergabe des Forschungsprojektes danken. Die Arbeit in der AG Feldmann war eine wundervolle und lehrreiche Erfahrung und ich genoss die Zusammenarbeit sehr. Ein besonderer Dank gilt zudem meinem Kollegen Herrn Albaraa Azrak. Wir ergänzten uns hervorragend, lernten, auch unter schwierigen Umständen beständig zu arbeiten und unsere Ziele zu erreichen. Herr Albaraa Azrak wurde ein wahrer Freund und gemeinsam teilten wir einige der schönsten Momente während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Daneben spreche ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Brossart meinen besonderen Dank aus. Er ermöglichte mir, diese Dissertationsarbeit im Rahmen des BONFOR-Promotionsstipendiums zu verrichten, durch das ich zusätzliche Kompetenzen erwarb.

Desweiteren gilt ein herausragender Dank Frau Sandra Ferring-Schmitt sowie Frau Petra Alpmann, die mich im Rahmen der Erzeugung histologischer Schnittpräparate sowie der Akquirierung von Ausschnittsfotografien umfassend anleiteten und hilfreiche Tipps zur Behebung aufgetretener Probleme beisteuerten. Die Arbeit in den Laboren Frau Ferring-Schmitts bzw. Frau Alpmanns war zu jeder Zeit eine große Bereicherung und ich genoss die Arbeitsatmosphäre dort fortwährend.

Ein weiterer großer Dank gilt meinen Eltern Jutta und Jürgen für ihre wunderbare Liebe und Erziehung. Durch ihre Art bereiteten sie mich umfassend auf das Leben vor und prägten mich nachhaltig. Sie ermöglichten mir, jedwedem meiner Träume nachzugehen. Zugleich danke ich von Herzen meiner Partnerin Enikő, meinen Freunden und Verwandten, die mir jederzeit zur Seite stehen und meine Entwicklung ebenfalls positiv beeinflussten.

Meinen letzten Dank spreche ich der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für das Privileg der Absolvierung des Medizinstudiums aus. Ich blicke auf wundervolle Studienjahre inklusive eines traumhaften Auslandsaufenthalts in Budapest zurück. Ohne diese Grundvoraussetzung müsste ich viele wundervolle Erfahrungen missen, durch die ich derjenige wurde, der ich nun bin. Ich bin stolz darauf, Teil der Universität Bonn zu sein.