

- Zusammenfassung -

Eva-Maria Kamionka

Dr. sc. hum.

Charakterisierung der Kollagenorganisation und ihr potentieller Einfluss auf die T-Zell-Infiltration im Stroma des humanen Pankreaskarzinoms

Fach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Organisation von Kollagenfasern und deren Einfluss auf die Verteilung von T-Zellen im humanen, normalen Pankreasgewebe, im Gewebe der chronischen Pankreatitis, des duktales Adenokarzinoms, in Azinuszellkarzinomen und neuroendokrinen Pankreastumoren. Hierbei wurden auch die Unterschiede im Kollagennetzwerk zwischen individuellen peritumoralen und tumorfernen Stromaregionen des duktales Pankreas-Adenokarzinoms analysiert.

Ergebnisse

Die Kollagenfasern in den verschiedenen Geweben wiesen eine große Diversität hinsichtlich der morphologischen Organisationsformen im Stroma auf. Für den Kollagenparameter Geradlinigkeit wurde eine homogene Verteilung in allen biopsierten Geweben detektiert, während die Parameter Ausrichtung, Dichte, Durchmesser und Länge eine heterogene Verteilung aufwiesen. T-Zellen wurden ubiquitär, aber heterogen in sämtlichen Pankreasgeweben detektiert.

In dieser Arbeit wurde erfolgreich eine neue, semiautomatisierte Methode zur hierarchischen Analyse der Kollagenorganisation und T-Zell-Verteilung in multiphotonenmikroskopischen Aufnahmen im humanen Gewebe von duktales Adenokarzinomen des Pankreas entwickelt. Die hier gezeigte Änderung der Kollagenorientierung in Abhängigkeit zur Tumorentfernung, definiert erstmals eindeutig und individuell peritumorale und tumorferne Stromaregionen in Tumorbiopsien. Das Ausmaß dieser individuellen Stromaregionen ist heterogen und scheint zudem unabhängig vom Tumorgrading. Das neue Verfahren ermöglicht eine Tiefenanalyse zur Kollagenorganisation und T-Zell-Verteilung in beiden definierten stromalen Tumorregionen. Innerhalb der beiden individuellen Stromaregionen wurden keine Unterschiede hinsichtlich der T-Zell-Infiltration beobachtet. In detaillierten Analysen von Mikroregionen innerhalb der beiden Stromaregionen konnte gezeigt werden, dass der Kollagenparameter Geradlinigkeit ein sehr homogenes Muster aufweist, während die Parameter Ausrichtung, Dichte, Durchmesser und Länge sich heterogen darstellt, aber unabhängig vom Ausmaß der peritumoralen Stromaregionen als auch vom Tumorgrading zu sein scheinen. Es konnte gezeigt

werden, dass T-Zellen in den Mikroregionen zwar heterogen verteilt waren, aber keine Korrelation zwischen den fünf Kollagenparametern und der T-Zell-Dichte in den Mikroregionen beider Stromaregionen bestand.

Es wurde erfolgreich ein *in vitro* Kollagen-Modell etabliert, mit Hilfe dessen unterschiedliche Organisationszustände der extrazellulären Matrix simuliert werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass die Kollagenfaserausrichtung sowie die Chemokine Stromal Cell-Derived Factor 1 α , Interferon-gamma induced Protein 10 kD und Macrophage Inflammatory Protein 1 β keinen Einfluss auf die Migrationsrichtung und die Migrationsgeschwindigkeit von aktivierten T-Zellen *in vitro* haben.

Diskussion

Für die semiautomatisierten, computergestützten, individuellen Tiefenanalysen wurden insgesamt 12 Tumore analysiert, womit die Größe des untersuchten Patientenkollektivs im Vergleich zu anderen Studien vergleichsweise klein ausfällt. Zur Verifizierung und um ausreichend robuste Daten zum Einfluss der Kollagenorganisation auf die Infiltration von T-Zellen im Tumorstroma zu generieren, sollten weitere Biopsien untersucht werden. Bei einer größeren Patientenkohorte könnten auch weitere morphologische Tumorsubtypen identifiziert und analysiert werden. Korrelationsanalysen mit Patientendaten wie bspw. Alter, Geschlecht und Tumorgrad könnten die translationale Relevanz der generierten Daten unterstreichen. Darüber hinaus könnte zukünftig die semiautomatisierte, computergestützte *in vivo* Multiphotonen-Mikroskopie in verschiedenen Tumor-Mausmodellen miteinbezogen werden, um die Rolle der Kollagenorganisation auf die T-Zell-Infiltration *in vivo* zu analysieren.

Die im *in vitro* Modell zu Einsatz gekommenen aus PBMC angereicherten T-Zellen wurden mit Interleukin 2 und Concanavalin A aktiviert. Eine Untersuchung mit mittels Durchflusszytometrie oder magnetischer Beads isolierter T-Zellpopulationen wie CD4⁺ T-Helferzellen, CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen oder auch CD4⁺ CD25⁺ regulatorischer T-Zellen könnte genauere Einblicke auf den Einfluss des Kollagennetzwerkes aufzeigen.

Schlussfolgerung

Es wurde eine computergestützte Methode etabliert, mit Hilfe derer es erstmals gelungen ist, an Hand der Winkelverteilung von Kollagenfasern zwei individuelle Regionen im humanen Stroma duktaler Pankreas-Adenokarzinome zu identifizieren. Die neue Methode bildet die Basis zur Erhebung individueller Daten zur Organisation des Kollagen Typ I-Netzwerkes und der T-Zell-Verteilung in multiphotonenmikroskopischen Aufnahmen des Tumormikromilieus. Zusammenfassend legen die hier vorgestellten Daten nahe, dass das Kollagen Typ I-Netzwerk vermutlich nicht als stromale Barriere angesehen werden kann und daher auch keinen negativen Einfluss auf die Infiltration und Verteilung von T-Zellen im Tumorstroma hat. Die potenzielle Anwendung der detaillierten Tiefenanalyse von

Kollagen Typ I und T-Zellen geht dabei über das duktales Adenokarzinom des Pankreas hinaus und könnte von Interesse für die Analyse weiterer Zellpopulationen im Stroma verschiedener Tumorarten sein.