

Aus der
Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

**Das peritoneale lymphatische System in gesundem vs.
tumorösem Gewebe: eine morphologische und funktionelle
ex-vivo Studie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Graf, Caroline Christina**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Königsrainer

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

Tag der Disputation: 28.02.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	11
1.1 Peritonealmetastasen.....	11
1.1.1 Kolonkarzinom	11
1.1.2 Therapiemöglichkeiten von PM.....	12
1.2 Omentum majus.....	14
1.3 Milky Spots.....	16
1.4 Angeborene und adaptive Immunabwehr.....	19
1.4.1 M1-Makrophagen.....	20
1.4.2 M2-Makrophagen.....	21
1.4.3 Regulatorische T-Zellen (Treg).....	21
1.5 Chemokine	22
1.6 Zielsetzung.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3 Reagenzien und Puffer	29
2.1.4 ELISA-Kits	30
2.1.5 Antikörper	31
2.1.6 Software	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Studiendesign.....	33
2.2.2 Ethischer Hintergrund.....	33
2.2.3 Probenauswahl.....	33
2.2.4 Lokalisierung von MS	34
2.2.5 Immunhistochemie (IHC).....	35

2.2.5.1	Probenaufarbeitung.....	35
2.2.5.2	Immunhistochemische Färbung	36
2.2.5.3	Immunhistochemische Analyse.....	36
2.2.6	Gewebe-basierter ELISA.....	37
2.2.6.1	Probenaufarbeitung.....	37
2.2.6.2	Chemokinbestimmung mittels ELISA.....	38
2.2.7	Durchflusszytometrie	38
2.2.7.1	Antikörpertitration	39
2.2.7.2	Probenaufarbeitung.....	42
2.2.7.3	Präparation der Zellen für das Durchflusszytometer	43
2.2.7.4	Herstellung Fluorescence Minus One Controls (FMO).....	44
2.2.7.5	Messungen am Durchflusszytometer	45
2.2.7.6	Analyse der Proben mittels ‚Gating Strategie‘	45
2.2.8	Multiplex- Fluoreszenzmikroskopie (MacSima).....	48
2.2.8.1	Probenaufarbeitung.....	48
2.2.8.2	Messungen am MacSima.....	48
2.2.9	Statistische Auswertung	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Immunhistochemische Ergebnisse.....	50
3.2	Multiplex fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse	59
3.3	Durchflusszytometrische Ergebnisse	62
3.4	Chemokinbestimmung aus dem Omentalgewebe.....	67
3.5	Korrelation zwischen Chemokinen und Immunzellen.....	70
4	Diskussion	72
5	Zusammenfassung	83
5.1	Deutsche Zusammenfassung.....	83
5.2	Englische Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis.....	87

7	Erklärung zum Eigenanteil.....	96
8	Veröffentlichungen.....	97
9	Danksagung	98
10	Anhang	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Lagebeziehung des Omentums in der Peritonealhöhle	14
Abbildung 2: Interaktion der Immunzellen zwischen der Peritonealhöhle und dem Omentum mit den MS.....	18
Abbildung 3: Schemazeichnung der Struktur eines MS im Omentum	19
Abbildung 4: Verkettete („Concatenated“) Rohdaten für den Marker CD45 nach der Antikörper-Titration.....	41
Abbildung 5: „Gating Strategie“ der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen im Omentalgewebe	47
Abbildung 6: Semiquantitative Analyse der IHC-Objektträger, die die positiv gefärbte Fläche in Prozent zur Gesamtoberfläche des untersuchten menschlichen Omentalgewebes von drei unterschiedlichen Patientengruppen mit drei verschiedenen Markern wiedergibt.....	51
Abbildung 7: Semiquantitative Analyse der IHC-Objektträger, die die positiv gefärbte Fläche der Subpopulationen in Prozent zur Gesamtoberfläche des untersuchten menschlichen Omentalgewebes von drei unterschiedlichen Patientengruppen mit drei verschiedenen Markern wiedergibt.....	53
Abbildung 8: Gesamtmenge der Immunzellen in einem einzelnen MS	55
Abbildung 9: Verteilung der verschiedenen getesteten Immunzellen (CD3, CD20, CD68, CD163, phosStat1, CD25) innerhalb der MS	55
Abbildung 10: Immunzellpopulationen in einem einzelnen identischen MS eines Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM	58
Abbildung 11: Lymphozytenpopulation im gesunden Omentalgewebe (links) und im PM erkrankten Gewebe (rechts).....	60
Abbildung 12: Makrophagenpopulation im gesunden Omentalgewebe (links) und im PM erkrankten Gewebe (rechts)	60

Abbildung 13: Anteil aller Zellen im menschlichen Omentum, die mittels FACS in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen gemessen werden konnten	62
Abbildung 14: Anteil der CD45+-Leukozyten von allen Zellen im Omentum, die mittels FACS in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen gemessen werden konnten.....	63
Abbildung 15: Häufigkeit der Makrophagen-Subpopulationen aus den CD45+-Leukozyten in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen, gemessen mittels FACS.....	64
Abbildung 16: Veranschaulicht links (a) die im Omentalgewebe mittels FACS gemessenen CD4+-Lymphozyten und rechts (b) das Verhältnis der CD4+CD25+-Zellen von allen CD4+-Lymphozyten in den drei Gewebegruppen.....	65
Abbildung 17: Tumorfördernde und tumorhemmende Chemokine im Omentum im Zusammenhang mit der Progression von PM (Gesund, Kolonkarzinom, PM), die mittels ELISA gemessen werden konnten.	68
Abbildung 18: Durch ELISA ermittelte VEGF-A-Konzentration im Omentum in den drei untersuchten Gewebegruppen	70
Abbildung 19: Heatmap für die Korrelation zwischen den verschiedenen untersuchten Chemokinen und Immunzellen	71
Abbildung 20: Verkettete („Concatenated“) Rohdaten der Antikörpertitrationen für die verschiedenen verwendeten Marker.....	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte	26
Tabelle 2: Materialübersicht	27
Tabelle 3: Übersicht über die hergestellten bzw. verwendeten Reagenzien und Puffer.....	29
Tabelle 4: Liste der nach Herstellerangaben verwendeten ELISA-Kits	30
Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper für die immunhistochemische und durchflusszytometrische Analyse	31
Tabelle 6: Softwareübersicht.....	32
Tabelle 7: Übersicht über die resezierten menschlichen Omentum majus Proben von drei unterschiedlichen Patientengruppen	34
Tabelle 8: Aus der Titration gewonnene optimale Verdünnung der Antikörper	41
Tabelle 9: Mastermixzusammensetzung für unterschiedliche Volumina (50 µl, 100 µl und 250 µl) der verwendeten vorverdünnten Antikörper.....	44
Tabelle 10: Größenzunahme von MS in Zusammenhang mit der Tumorprogression anhand des Markers CD163.....	56

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serum Albumin
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD	Cluster of Differentiation
CRS	Cytoreductive Surgery/ Zytoreduktive Chirurgie
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I
DP	Doppelt Positiv
EDPR	Europäische Datenschutzverordnung
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting/ Durchflusszytometrie
FCF	FACS Core Facility
FMO	Fluorescence Minus One Control
FSC	Forward Scatter/ Vorwärtsstreuung
HEV	Hochendothelvenole
HIPEC	Hypertherme IntraPERitoneale Chemotherapie
IHC	Immunhistochemie/immunhistochemisch
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MS	Milky Spots
NCPP	National Center for Pleura and Peritoneum
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
OD	Optical Density
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell/ mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphat-gepufferte Salzlösung

PFA	Paraformaldehyd
PIPAC	Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy/ Intraperitoneale Druck-Aerosol-Chemotherapie
PM	Peritoneal metastasis/Peritonealmetastase
ROI	Region Of Interest
rpm	revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SP	Single Positiv
SSC	Side Scatter/Seitwärtsstreuung
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
Treg	regulatorische T-Zellen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

1.1 Peritonealmetastasen

Peritonealmetastasen (PM) werden als sekundäre Tumorabsiedlungen am Peritoneum definiert. Dabei geht die Tumorerkrankung nur selten vom Peritoneum aus. Deren Ursprung liegt überwiegend in einer anderen, fortgeschrittenen Krebserkrankung eines im Abdomen gelegenen Organs. So streuen beispielsweise gastrointestinale und gynäkologische Krebserkrankungen gehäuft ins Peritoneum. Hierbei entwickeln ca. 15-20 % aller Patienten mit kolorektalem Karzinom peritoneale Metastasen, 10-15 % mit Magenkarzinom und sogar 60-80 % leiden beim High-grade serösen Ovarialkarzinom bereits bei der ersten Diagnose an PM (Gesundheitsindustrie BW, 2017). In den meisten Fällen wird die PM erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert, was die Therapie deutlich erschwert. Infolgedessen beträgt die Überlebenszeit nach der Diagnosestellung der betroffenen Patienten im Durchschnitt nur wenige Monate (van Gestel et al., 2014). Zudem besitzen die Patienten infolge ihrer Krebserkrankung eine deutlich herabgesetzte Lebensqualität.

1.1.1 Kolonkarzinom

Jedes Jahr sterben weltweit am kolorektalen Karzinom ca. 700 000 Menschen, was diese Erkrankung zur vierthäufigsten krebsbedingten Todesursache in der Welt macht (Brody, 2015). Ein limitierender Faktor in Bezug auf die Behandlung von kolorektalen PM ist das häufige Auftreten von PM. Ca. 15-20 % aller Patienten mit einem Kolonkarzinom entwickeln Metastasen im Peritoneum, was eine schlechte Prognose nach sich zieht. Ohne Therapie haben diese Patienten nur eine mediane Überlebenszeit von sechs Monaten nach Diagnosestellung (van Gestel et al., 2014). Die Lebensqualität der Erkrankten ist zunehmend eingeschränkt. Ebenso haben sie aufgrund der verminderten Darmtätigkeit mit Problemen wie Bauchschmerzen und (Sub-)Okklusion zu kämpfen, die zur Anorexie, Kachexie und schlussendlich zum Ableben der Patienten führt (Piso and Arnold, 2011).

1.1.2 Therapiemöglichkeiten von PM

Es stehen mehrere Therapien für die Behandlung von PM zur Verfügung. Im Vordergrund steht die systemische Chemotherapie, bei der zytotoxische Medikamente in den Blutkreislauf verabreicht werden. Die Überlebensprognose bleibt dabei aber schlecht: das mediane Gesamtüberleben unter systemischer Chemotherapie beträgt beim kolorektalen Karzinom mit PM lediglich 15,2 Monate (Lemoine et al., 2016). Auch mit dem Einsatz gezielter moderner Chemotherapien, wie z.B. mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab, konnte bei kolorektalen PM das mediane Überleben nicht über 20 Monate verlängert werden (van Oudheusden et al., 2015). Die Ursache für die verminderte Wirksamkeit einer systemischen Chemotherapie wird darin gesehen, dass die Chemotherapeutika aufgrund der Peritoneum-Körperschranke und der unzureichenden Durchblutung nicht in ausreichender Konzentration im Peritonealknoten ankommen (Griffiths et al., 2011).

Die einzige kurative Option der PM-Therapie besteht in der zytoreduktiven Chirurgie (CRS), die in Kombination mit der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) eingesetzt werden kann. Hierbei erfolgt im ersten Schritt die operative Entfernung aller makroskopisch sichtbaren Tumorherde mittels Peritonektomie (Sugarbaker, 1995). Im zweiten optionalen Schritt wird direkt der Bauchraum über eine intraabdominelle Drainage mit einer 42-43 °C aufgeheizten Zytostatikallösung gespült, um nach der Resektion die verbliebenen mikroskopischen Tumorzellknoten abzutöten (Aoyagi et al., 2014, Arjona-Sánchez et al., 2014). Mehrere Studien (Elias et al., 2001, Verwaal et al., 2003, Verwaal et al., 2008, Franko et al., 2010) haben bisher aufgezeigt, dass die kombinierte Therapie aus CRS und HIPEC bei ausgewählten Patienten mit kolorektaler Peritonealmetastase bessere Überlebensraten aufzeigen als die alleinige systemische Chemotherapie. Jedoch konnte ein zusätzlicher Vorteil der HIPEC gegenüber der alleinigen CRS nicht bewiesen werden (Quénet et al., 2021).

Eine neue, palliative Behandlungsmethode der PM stellt die intraperitoneale Druck-Aerosol-Chemotherapie (PIPAC) dar, bei der die Zytostatika (wie z.B. Cisplatin und Doxorubicin) über einen laparoskopischen Zugang unter Druck als

Aerosol direkt in die Bauchhöhle appliziert werden (Reymond et al., 2000). Vorteil dieser Methode ist, dass durch den intraabdominellen Druck von 12-15 mmHg eine bessere Eindringtiefe in das krebsbefallene Peritoneum erreicht wird (Solass et al., 2014). So können niedrigere Dosen der Chemotherapeutika eingesetzt werden, ohne dabei an Wirksamkeit gegen den Tumor einzubüßen (Solass et al., 2014). Durch die Vernebelung kommt es zu einer verbesserten Verteilung der Medikamente im Abdomen, im Vergleich zur intraperitonealen Chemotherapie mit flüssigen Lösungen (Solass et al., 2012). Weitere Vorteile der PIPAC gegenüber der HIPEC bestehen darin, dass sie auch bei Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsbild angewendet werden kann, da sie ein minimal-invasives Verfahren darstellt und wiederholt werden kann. Demtröder hat gezeigt, dass eine objektive Tumorregression in einer Mehrheit der Patienten mit fortgeschrittener PM aus kolorektalem Ursprung histologisch zu belegen war (Demtröder et al., 2016). Auch unter Einsatz von Oxaliplatin kam es nach wiederholten PIPAC-Zyklen zu einer Tumorregression bei Patienten mit fortgeschrittenem PM ausgehend von einem kolorektalen Karzinom (Ellebæk et al., 2020).

Die Effizienz all dieser therapeutischen Behandlungsansätze bleibt jedoch begrenzt, weshalb innovative Ansätze für die Zukunft benötigt werden. Eine neue Art der Therapie stellt die Anwendung der Immuntherapie zur Behandlung der PM dar (Ströhlein et al., 2016, Thadi et al., 2018), denn das Peritoneum weist eine robuste angeborene und adaptive Immunität auf (Isaza-Restrepo et al., 2018). So wurde das tierische Peritoneum zur industriellen Generierung von monoklonalen Antikörpern durch Aszites-Produktion mittels Hybridom-Technik genutzt (Leenaars and Hendriksen, 2005). Trotz dieser starken Rationalen ist die Forschung zur peritonealen Immuntherapie jedoch noch im Anfangsstadium (Tripodo, 2019).

1.2 Omentum majus

Das Omentum majus, auch großes Netz genannt, ist eine fettgewebsreiche Duplikatur des Peritoneums, welches von der großen Krümmung des Magens und Colon transversum ausgeht und wie eine Schürze im vorderen Abdomen herabhängt. Dabei umhüllt das Omentum majus die Dünndarmschlingen (Abbildung 1). Es zeigt damit eine beträchtliche Größe von ca. 50 x 30 cm, was einer Gesamtfläche von 1500 cm² entspricht (Platell et al., 2000). Aus histologischer Sicht besteht das Omentum majus überwiegend aus zwei Zellarten: den Adipozyten und den Mesothelzellen. Allerdings besitzt es auch einzigartige Ansammlungen von lymphatischem Gewebe, die sogenannten Milky Spots (MS) (Recklinghausen, 1863), die hauptsächlich aus Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen bestehen (Shimotsuma et al., 1991). Wie auch das Peritoneum weist das Omentum majus Fenestrationen in der Mesothelzellschicht und der Basalmembran auf, die als lymphatische Stomata bezeichnet werden. Eine hohe Dichte dieser lymphatischen Spaltöffnungen finden sich im Omentum majus, im Diaphragma, der parietalen Pleura, dem Ligamentum falciforme hepatis, auf der Oberfläche der Eierstöcke, dem Peritoneum im Becken und im Dünndarm-Mesenterium (Michailova and Usunoff, 2006).

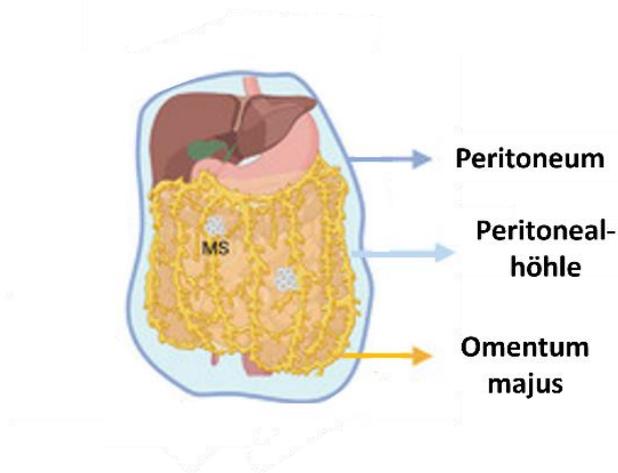


Abbildung 1: Anatomische Lagebeziehung des Omentums in der Peritonealhöhle

Die gelbe Struktur stellt das Omentum dar, das die MS enthält und schürzenartig vom Magen und Colon transversum herabhängt. Es ist eine fettgewebsreiche Duplikatur des Peritoneums.

Das Peritoneum (hier in dunklerem blau dargestellt) kleidet mit seinem viszeralem und parietalem Blatt die Peritonealhöhle (hellblau) aus und ermöglicht somit unter anderem die Verschieblichkeit der Organe gegeneinander. (nach Liu et al., 2021)

Drei wichtige Funktionen des Omentum majus wurden charakterisiert. Zum einen trägt es zur Immunabwehr bei, indem es sich bei Entzündungen, Infektionen, Ischämien oder Darmperforationen ausdehnt, an die betroffenen Bereiche legt und diese abdichtet. So wird beispielsweise bei perforierter Appendizitis, Kolondivertikulitis, Stichverletzungen oder Anastomoseninsuffizienzen das Ausmaß einer Peritonitis zumindest begrenzt. Aufgrund dieser Fähigkeit hat der Chirurg Rutherford Morrison das Omentum schon 1910 als „policeman of the abdomen“ bezeichnet (Morison, 1906). Infolge seiner ausgedehnten Oberfläche spielt das Omentum majus eine wichtige Rolle in der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes durch die Aufnahme und Abgabe von Peritonealflüssigkeit. Zusätzlich dient das Omentum aufgrund seines hohen Fettanteils auch als viszeraler Fettspeicher.

Aufgrund der guten Durchblutung des Omentums und seiner antientzündlichen Wirkung wird es seit langem als Gewebeersatz in der abdominalen, thorakalen und plastischen Chirurgie eingesetzt. Zum Beispiel wird es zum Verschließen von abdominalen Perforationen bei Geschwüren verwendet sowie zur Rekonstruktion der Bauchdecke nach größeren Operationen (Maiwald et al., 1999). Sogar außerhalb des Abdomens macht man sich das Omentum bereits für Gewebereparaturen zu Nutze. Dabei wird das Omentum zu einem langen Stiel präpariert und seine gut durchblutete Extremität an das verletzte Organ genäht. Dieses Verfahren, das auch als „Omentale Transposition“ bezeichnet wird, wird zum Ersatz oder zur Deckung von großen traumatischen Weichteildefekten eingesetzt. Außerdem ist die intrathorakale Transposition des Omentums bei schweren Infektionen des Pleuraraums eine etablierte chirurgische Technik (Botianu, 2019, Guerrero et al., 2021). Die omentale Transposition wurde sogar vorgeschlagen, um den zerebralen Blutfluss bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankungen zu erhöhen (Goldsmith et al., 2003, Shankle et al., 2008, Goldsmith, 2014).

Das Omentum majus ist auch an pathologischen Reaktionen beteiligt. Es spielt eine bedeutende Rolle als Implantationsort für Tumormetastasen, insbesondere von ovarial und gastro-intestinalen Tumoren. Dies liegt unter anderem an der anatomischen Lageabhängigkeit des Omentums von abdominalen

Primärtumoren. Mehrere Studien haben gezeigt, dass speziell das Omentum mit seinen MS von Metastasen besiedelt wird (Hagiwara et al., 1993, Krist et al., 1998, Gerber et al., 2006, Oosterling et al., 2006). Aufgrund seines häufigen Befalls wird das Omentum bei Tumoroperationen teilweise oder komplett reseziert. Auch im Rahmen der CRS bei kolorektalen PM wird eine vollständige Omentektomie durchgeführt.

Jedoch zeigte eine Tierstudie, dass eine prophylaktische Omentektomie beim Ovarialkarzinom mit einem schlechteren Überleben verbunden war (Yokoyama et al., 2012). Obwohl das Omentum und seine MS viele Immunzellen aufweisen, ist ihre Anti-Tumor-Aktivität ungenügend, um peritoneale Tumore am Wachstum zu hindern (Oosterling et al., 2006). So kann das Omentum einerseits hilfreich sein, weil es Tumorzellen auffängt, andererseits ist es ebenso schädlich, weil es den präferierten Ort für Tumorzellen aus der Peritonealhöhle darstellt. Die Rolle des Omentums und der MS ist im Fall der peritonealen Metastasierung nicht ausreichend geklärt.

1.3 Milky Spots

Milky Spots (MS) sind einzigartige lymphatische Strukturen, die hauptsächlich aus einer Ansammlung von Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen bestehen (Shimotsuma et al., 1991, Krist et al., 1995, Liu et al., 2015). Am häufigsten sind MS im Omentum aufzufinden. MS kommen jedoch auch in anderen serösen Membranen wie der Pleura, dem Perikard, den Mesenterien und dem Beckenboden vor. Erstmals wurden MS 1863 von Recklinghausen als weiße Flecken inmitten von gelbem Fettgewebe im Omentum von jungen Kaninchen beschrieben (Recklinghausen, 1863). Seifert war der Erste, der diese Strukturen im menschlichen Omentum majus nachgewiesen hat (Seifert, 1921).

Verschiedene morphologische Studien haben aufgezeigt, dass MS ganz unterschiedliche Formen aufweisen können (Liu et al., 2015, Havrlentova et al., 2017). Hauptsächlich reichen sie von rund, zu oval bis hin zu unregelmäßigem Aussehen. Aus mikroskopischer Sicht befinden sich MS direkt unterhalb der Mesothelzellschicht an den Eingängen der Stomata (Meza-Perez and Randall,

2017). Aufgrund dieser optimalen Lokalisation ist es ihnen möglich, mit der Peritonealhöhle zu kommunizieren und an immunologischen Prozessen teilzuhaben. Durch die Fenestrationsen gelangen Partikel und Antigene aus der Bauchhöhle direkt in die MS (Gerber et al., 2006, Meza-Perez and Randall, 2017).

Liegt eine Entzündung in der Peritonealhöhle vor, so führt dies dazu, dass vermehrt Makrophagen aus der Peritonealhöhle in das Omentum einwandern und die MS an Größe zunehmen. Shimotsu zeigte auf, dass sich bei einer bakteriellen Entzündung im Omentum Makrophagen aus der Peritonealhöhle ansiedeln und es zu einer Zunahme der Größe und Zellzahl der MS kommt (Shimotsu et al., 1992). Veranlasst wird die Zellzahlzunahme nicht nur durch den peritonealen Zustrom, sondern auch durch die Rekrutierung der Zellen aus dem Blut über Hochendothelialvenolen (HEV).

Mehrere Studien (Gerber et al., 2006, Liu et al., 2015) haben aufgezeigt, dass MS vor allem an Netzwerken von Blutgefäßen vorzufinden sind. MS werden von retroperitonealen Kapillaren versorgt, die eine Doppelfunktion haben. Einerseits versorgen die subperitonealen Kapillaren die Immunzellen sowie die Entzündungszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Weiterhin transportieren die subperitonealen Kapillargefäße während der peritonealen Progression Entzündungszellen, die dann die MS besiedeln, woraufhin sie an Größe zunehmen (Van Vugt et al., 1996). Alternativ werden Entzündungszellen auch direkt durch Chemotaxis aus der Peritonealhöhle in das Entzündungsgeschehen rekrutiert.

Die Interaktionen der Immunzellen zwischen der Peritonealhöhle und dem Omentum sowie die Rekrutierung der Zellen aus den Blutgefäßen in das lymphatische Gewebe der MS werden in Abbildung 2 veranschaulicht.

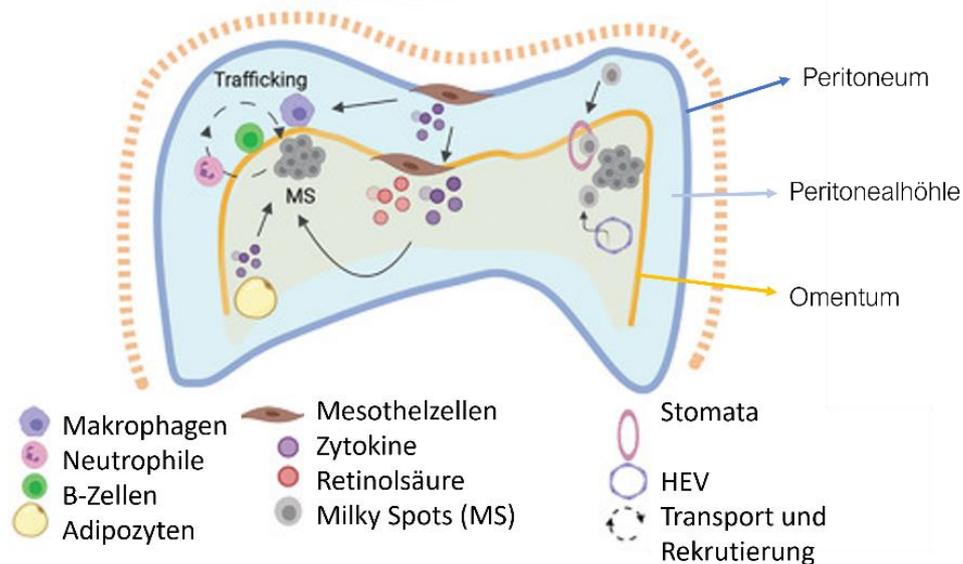


Abbildung 2: Interaktion der Immunzellen zwischen der Peritonealhöhle und dem Omentum mit den MS (nach Liu et al., 2021)

Weiterhin ist erwiesen, dass MS die Lokalisationen sind, an denen sich bevorzugt Tumorzellen ansammeln, die von der Peritonealhöhle eingewandert sind (Hagiwara et al., 1993, Tsujimoto et al., 1995, Krist et al., 1998). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die MS auch eine wesentliche Rolle als erste Verteidigungslinie in der frühen Phase der peritonealen Metastasierung spielen, da sie Tumorzellen, Antigene und kleine Partikel aus der Peritonealhöhle rekrutieren. Diese Anhäufung erfolgt zum Einen passiv mittels eines Flüssigkeitsflusses durch die in der Mesothelzellschicht liegenden Stomata in die Lymphgefäße (Meza-Perez and Randall, 2017) und zum Anderen aktiv durch Makrophagen (Krist et al., 1995).

Neben ihrer Rolle bei der frühen anti-tumoralen Immunabwehr liefern MS ebenso eine strukturelle und metabolische Grundlage, die die spätere Entwicklung und das Fortschreiten der PM fördert. Die MS ermöglichen das Überleben der Tumorzellen, die aus der Peritonealhöhle in die MS migriert sind. So entwickeln MS eine stark vaskuläre Mikroumgebung, die die Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen aus den subperitonealen Kapillaren versorgt (Gerber et al., 2006, Liu et al., 2015). Damit bieten MS eine geeignete Mikroumgebung für peritoneal abgelöste Krebszellen (Abbildung 3).

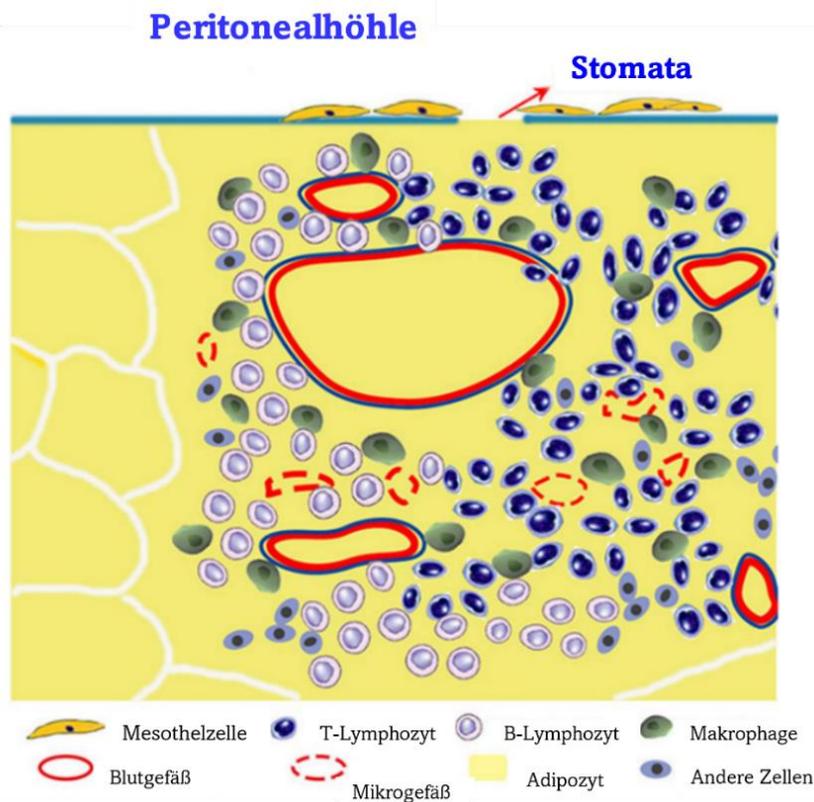


Abbildung 3: Schemazeichnung der Struktur eines MS im Omentum.

MS sind Leukozytenansammlungen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen), die zwischen den Adipozyten (gelb) direkt unterhalb der diskontinuierlichen Mesothelzellschicht (dunkelgelb) und Basalmembran (türkis) an den Stomata lokalisiert sind und so optimal zur Kommunikation mit der Peritonealhöhle befähigt sind; MS sind hauptsächlich um Kapillaren (rote Kreise) des Omentums angeordnet. (nach Liu et al., 2015)

Hinzu kommt, dass spezifische peritoneale Immunzellen in die Tumorumgebung durch Chemokine rekrutiert werden, die das Tumormilieu auf unterschiedliche Weise beeinflussen. So fördern beispielsweise gewebeansässige Makrophagen im Omentum die metastatische Ausbreitung von Eierstockkrebs (Etzerodt et al., 2020). Daher spielen MS eine zweideutige Rolle bei der Progression von PM, was als "Milky Spots Paradoxon" bezeichnet werden kann.

1.4 Angeborene und adaptive Immunabwehr

Das menschliche Immunsystem ist ein hochkomplexes Abwehrsystem, das den Menschen vor eindringenden Pathogenen und körperfremden Stoffen schützt. An

diesem Abwehrsystem sind zahlreiche Leukozyten aus der Blutbahn, den Lymphwegen und dem Gewebe beteiligt. Das menschliche Immunsystem besteht aus zwei Komponenten, die in ihrer Arbeitsweise eng miteinander vernetzt sind und sich gegenseitig unterstützen: die angeborene und die adaptive Abwehr. Das angeborene (unspezifische) Immunsystem ist von Geburt an die erste Verteidigungslinie gegen Fremdstoffe aller Art. Es reagiert schnell und arbeitet vor allem mit Immunzellen wie den Makrophagen und den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Das angeborene Immunsystem kann jedoch nicht ausreichend spezifisch auf Erreger reagieren.

Beim adaptiven (spezifischen) Immunsystem erfolgt die Immunabwehr gezielt gegen bestimmte Erreger durch die Bildung von Antikörpern. Zudem besitzt es die Fähigkeit ein Immungedächtnis auszubilden, um bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Erreger schneller reagieren zu können. Die Funktionen des adaptiven Immunsystems werden durch die antigen-spezifisch arbeitenden B- und T-Lymphozyten und die Bildung von Antikörpern ausgeführt.

Das menschliche angeborene und adaptive Immunsystem ist in der Lage, Tumorzellen als krankhaft veränderte Zellen zu erkennen und diese zum Teil auch zu vernichten (Vesely et al., 2011). Die Kenntnis über das Immunsystem, seine Komponenten und deren Interaktionen mit der Tumorumgebung eröffnet eine Vielzahl neuer Möglichkeiten an Therapieansätzen für die Immuntherapie.

1.4.1 M1-Makrophagen

Makrophagen sind weiße Blutkörperchen, die eine bedeutende Rolle im zellulären Immunsystem einnehmen. Ihre Funktionen bestehen unter anderem in der Phagozytose von Fremdzellen sowie abgestorbener Zellen, der Zerstörung von Tumorzellen, der Regulation von Abwehrreaktionen, der Antigenpräsentation zur Identifizierung körpereigener/fremder Zellen und der Wundheilung.

In Abhängigkeit von der Mikroumgebung können Makrophagen eine spezifische Differenzierung durchlaufen und zwei verschiedene Polarisierungszustände annehmen, weshalb man zwischen Makrophagen vom Typ M1 (M1) und Makrophagen vom Typ M2 (M2) unterscheidet (Mantovani et al., 2002, Tamura et al., 2018).

M1-Makrophagen exprimieren eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-12, IL-23 und schützen so den Körper vor viralen und bakteriellen Infektionen, da sie zur Abwehr von Pathogenen beitragen (Mosser and Edwards, 2008, Martinez et al., 2009). Betrachtet man die M1-Makrophagen in Bezug auf ihre Tumorstimmung, so zeigt sich, dass sie vor allem einen Anti-Tumor-Effekt aufweisen, indem sie in der Lage sind Tumorzellen abzutöten (Pan et al., 2020).

1.4.2 M2-Makrophagen

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) entsprechen überwiegend dem Phänotyp der M2-Makrophagen (Mantovani and Sica, 2010). Allerdings können TAM sowohl den M1- als auch den M2-Phänotyp annehmen, jedoch macht in vielen Tumoren der überwiegende Anteil M2-polarisierte Makrophagen aus (Solinas et al., 2009). Im Gegensatz zu den M1-Makrophagen bestehen ihre Aufgaben in der Immunsuppression, woraufhin sie das Tumorstimmung sowie die Tumorausbreitung fördern (Mantovani et al., 2002, Solinas et al., 2009). Weiterhin tragen sie zur Metastasierung und Angiogenese bei (Hao et al., 2012). M2-Makrophagen exprimieren vor allem entzündungshemmende Moleküle wie IL-10 und VEGF (Solinas et al., 2009).

Neue Studien haben aufgezeigt, dass sich der Makrophagenphänotyp durch verschiedene Stimuli, wie beispielsweise das Tumorstimmung, von M1-Makrophagen zu M2-Makrophagen ändern kann. Diese Transdifferenzierung möchte man sich zu Nutze machen, indem man den einen Makrophagentyp in den anderen umprogrammiert, um so alternative Wege für die Krebsbehandlung zu finden (Tamura et al., 2018).

1.4.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische T-Zellen steuern die Selbsttoleranz des Immunsystems und senken somit das Risiko für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Ebenso sind Treg immunsuppressive Zellen, die gehäuft in der Tumormikroumgebung vorkommen (Li et al., 2020). Da sie die anti-tumorale Immunantwort hemmen, begünstigen sie die Tumorentwicklung und -progression (Ohue and Nishikawa, 2019). Eine hohe Infiltration an Treg ist mit einer schlechten Überlebensprognose in vielen Tumorentitäten verbunden

(Mougiakakos, 2011). Umso notwendiger ist es Strategien zu finden, um die Anzahl der Treg im Gewebe zu senken.

1.5 Chemokine

Chemokine sind kleine Signalproteine, die zur großen Gruppe der Zytokine gehören. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Migration und Aktivierung von Leukozyten (Moser and Loetscher, 2001). Damit fungieren sie als interzelluläre Botenstoffe bei Entzündungsreaktionen, Immunreaktionen und ebenso bei Pathologien, wie allergischen Reaktionen, Autoimmunerkrankungen oder dem Tumorwachstum (Moser et al., 2004, Raman et al., 2011). Hierbei erfolgt der Mechanismus über ein Konzentrationsgefälle (Balkwill, 2004). An jeder Oberfläche von Immunzellen befinden sich spezifische G-gekoppelte Rezeptoren, an denen die Chemokine andocken können, wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird und es zu einer Wanderungsbewegung der Immunzellen in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration kommt (Müller et al., 2001). Einige Chemokine binden nur an einen Rezeptor, andere an mehrere und umgekehrt werden einige G-gekoppelten Rezeptoren lediglich durch ein Chemokin und andere durch eine Reihe dieser Liganden aktiviert, wodurch verschiedene Wirkungen hervorgerufen werden (Griffith et al., 2014).

Strukturell bestehen Chemokine aus ca. 75-125 Aminosäuren und weisen eine Molmasse von 8-14 kDa auf (Zlotnik and Yoshie, 2000). Charakteristisch für die Chemokine sind eine Gruppe von Cysteinresten, die zusammen mit den Disulfidbrücken für die Ausbildung der Tertiärstruktur der Chemokine verantwortlich sind (Miller and Mayo, 2017). Bisher konnten im Menschen 50 verschiedene Chemokine identifiziert werden, die von den Immunzellen, auf die sie später eine chemotaxische Wirkung haben, selbst produziert werden (Balkwill, 2004). Ebenso finden sich funktionelle Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen und einigen Tumorzellen (Balkwill, 2004). Je nach Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus werden vier Gruppen unterschieden, nach denen sich auch die Nomenklatur der einzelnen Chemokine richtet: CC-Chemokine, CXC-Chemokine, CX3C-Chemokine, C-Chemokine.

Hinzu kommt der Buchstabe L für die Bezeichnung des Liganden (CCL, CXCL, CX3CL bzw. XCL) sowie eine fortlaufende Nummerierung der verschiedenen Chemokine (Zlotnik and Yoshie, 2000). Entsprechend ihrer Funktion können die Chemokine auch in homöostatische und inflammatorische Chemokine eingeteilt werden. Dabei sind die häufigeren die inflammatorischen Chemokine, die bei Verletzungen, Entzündungen oder Infektionen produziert werden. Die homöostatischen Chemokine hingegen werden dauerhaft erzeugt und sind damit an der Überwachung des gesunden Gewebes beteiligt (Palomino and Marti, 2015).

Inzwischen sind zu den Chemokinen 20 humane Chemokinrezeptoren bekannt, die sich von den Liganden ableiten, mit denen sie interagieren. Sie werden ebenfalls in vier Gruppen eingeteilt: CCR, CXCR, CX3CR, XCR (Murphy et al., 2000).

Für das Fortschreiten von Krebs ist die interzelluläre Kommunikation zwischen den Krebs- und Nicht-Krebszellen von entscheidender Bedeutung, an der die Chemokine maßgeblich beteiligt sind. Indem sie die Infiltration verschiedener Zellen des Immunsystems in die Mikroumgebung des Tumors regulieren, beeinflussen sie das Tumormilieu auf unterschiedliche Weise erheblich. Bestimmte Untergruppen von Immunzellen wandern in die Mikroumgebung des Tumors ein und regulieren die Immunreaktion in Abhängigkeit des jeweiligen Chemokins. So können Chemokine durch die Rekrutierung verschiedener Immunzellen entweder die Tumorprogression fördern oder das Tumorstadium hemmen (Nagarsheth et al., 2017, Korbecki et al., 2020). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass Chemokine einen hemmenden bzw. fördernden Einfluss auf die Angiogenese sowie Metastasierung haben (Balkwill, 2004).

Aus diesem Grund kann die Expression ausgewählter Chemokine im Gewebe sowohl mit physiologischen, eben aber auch mit pathologischen Prozessen, wie der Tumorentwicklung und -progression in Verbindung gebracht werden. Mitunter einen entscheidenden Faktor hierfür stellt die Tumorentität dar, an der der Patient erkrankt ist. Dies hat einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebensprognose des Patienten (Korbecki et al., 2020).

Das Wissen über verschiedene Chemokine im Gewebe sowie ihre Rolle bei der Krebsentstehung bietet die Möglichkeit neuer Ansätze in der Immuntherapie für Patienten mit Krebs und Metastasen (Homey et al., 2002). So hat die Nutzung eines monoklonalen Antikörpers gegen CCL2 bereits aufgezeigt, dass es bei Patienten mit soliden Tumoren durch eine i.v. Injektion von mehreren Dosen Carlumab zu einer vorläufigen Anti-Tumor-Aktivität kam (Sandhu et al., 2013). Außerdem zeigte die Studie von Fang et. al, 2016, dass durch eine Blockade der CCL2-Expression in vivo das Primärtumorwachstum sowie die Metastasierung von Brustkrebs gehemmt wird (Fang et al., 2016). Dies legt dar, dass Chemokine und ihre Rezeptoren wirksame Angriffspunkte für die Krebsimmuntherapie darstellen und das Wissen über ihre Rolle und Mechanismen bei der Tumorentstehung für die Entwicklung neuer Medikamente zur Krebsbehandlung von entscheidender Bedeutung sein können. Bisher konnte festgestellt werden, dass die meisten Krebsarten reich an Chemokin-Liganden sind, jedoch ist noch nicht in ausreichendem Maße geklärt worden, inwieweit diese Chemokine einen prognostischen Marker für die verschiedenen Krebsarten darstellen (Sun et al., 2010, Di Caro et al., 2016, Zhuo et al., 2018, Do et al., 2020).

Im Zusammenhang mit dem Kolonkarzinom ist bewiesen, dass Patienten, die daran erkrankt sind, eine erhöhte Expression mehrerer Chemokine im Gewebe zeigen. So machen bisher einige Studien deutlich, dass beispielsweise CXCL12, ein Chemokin, das vor allem an der Krebsmetastasierung beteiligt ist, ein deutlich höheres Expressionslevel in bösartig verändertem Gewebe aufweist als im Vergleich zu Geweben mit gutartigen Veränderungen (Paćzek et al., 2020). Ebenso zeigt das Chemokin CCL2, das die Rekrutierung von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) vermittelt, ein erhöhtes Level bei Kolonkarzinomen (De la Fuente López et al., 2018).

1.6 Zielsetzung

Während die zelluläre Zusammensetzung von MS schon vor Jahrzehnten aufgeklärt wurde, konnten subtile strukturelle und metabolische Veränderungen bei MS während des Fortschreitens der PM noch nicht beobachtet werden. Dies liegt daran, dass heutzutage fortschrittlichere bildgebende Verfahren zur Untersuchung herangezogen werden können. Nach einer eingehenden Literaturrecherche konnten keine Beschreibungen über die phänotypischen Veränderungen der Zellpopulationen in den MS während der verschiedenen Stadien des Fortschreitens der PM gefunden werden. Daher soll in dieser Arbeit die unterschiedliche Zusammensetzung von Immunzellen, von denen ausgegangen wird, dass sie eine wichtige Rolle bei der Immunantwort im Entzündungs- bzw. Tumorgeschehen spielen, im Gewebe von drei Patientengruppen untersucht werden. Diese drei Gruppen unterscheiden sich durch das Stadium ihrer Erkrankung: gesundes Gewebe, Gewebe mit primärem Tumor, Gewebe mit Tumor und PM. Dieser Nachweis soll unter anderem unter Verwendung bildgebender sowie quantitativer Techniken erfolgen. Da Chemokine das Umfeld der Tumorumgebung maßgeblich beeinflussen können, soll in dieser Studie zudem betrachtet werden, in welchem Ausmaß die Chemokine, die für die Rekrutierung der Immunzellen verantwortlich sind, in den unterschiedlichen Stadien der Tumorentwicklung im Omentum vorzufinden sind. Dies soll Aufschluss über die vielfältige Rolle des Chemokinsystems während der Tumorentwicklung geben. Weiterhin soll daraus geschlussfolgert werden, wie die untersuchten Immunzellen mit den dazugehörigen Chemokinen bei der Progression von PM zusammenhängen. Ziel der Arbeit ist es daher, neue Erkenntnisse über die MS-Subpopulationen, sowie die Verteilung der Immunzellen und die damit verbundenen Chemokinlevel im Omentalgewebe in verschiedenen Stadien der Tumorprogression zu gewinnen, in der Hoffnung, den Weg für neue Ansätze in der Immuntherapie von PM zu ebnet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerätetyp	Hersteller
Akku-betriebene Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
BD FACS Canto™ II	BD Biosciences, San José, CA, USA
Gefrierschrank -80°C	GFL, Burgwedel, Deutschland
Homogenisator TissueLyser LT	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Kaltlichtquelle KL 200	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kryostat CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop DM IL LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
MacSima	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer RH basic 2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mehrfachpipette 300 µl Eppendorf references plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Miccra D-9 Homogenisator	MICCRA GmbH, Heitersheim, Deutschland
NanoQuant Infinite M200 Pro Mikroplattenlesegerät	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Neubauer Zählkammer Improved	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Pipetten Eppendorf references 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Rotationsmikrotom RM 2035	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Schüttelwasserbad Julabo SW-20C	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VENTANA BenchMark ULTRA	Roche, Basel, Schweiz
Ventana DP200 slide scanner	Roche, Basel, Schweiz
Vortex-Mixer 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Waage R180D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad für Paraffinschnitte HI 1210	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge GS-6R	Beckman Coulter, Brea, CA, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Materialübersicht

Materialtyp	Details	Hersteller
Aluminiumdosen Rotilabo®	2 + 10 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cutfix Chirurgische Einmalskalpelle		B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Einwegpipette (Kunststoff)	3 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß	2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen Falcon	5 ml	Corning Science, Industrial del Norte, Reynosa, Tamaulipas, Mexiko
Faltenfilter Rotilabo®	100 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gewebeeinbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound		Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland

Glaspipetten/Pasteur capillary pipettes	150 mm	WU Mainz, Bamberg, Deutschland
Kassetten für Paraffineinbettung		Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Kryo-Aufbewahrungsbox	133 x 133 x 55 mm	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
MACSwell™ Four Imaging Frame		Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Microplate, 96well, PS, U-bottom		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger Superfrost® Plus		R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl 200 µl 300 µl 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Power Bead Tubes, Metal		QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Serologische Pipetten Falcon		Corning Science, Industrial del Norte, Reynosa, Tamaulipas, Mexiko
Thermo Scientific™ Nunc™ Kryoröhrchen	1 ml	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Trypanblau		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellheber		Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zellsieb Falcon	70 µM	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen Cellstar	15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Zentrifugenröhrchen Falcon	50 ml	Corning Science, Industrial del Norte, Reynosa, Tamaulipas, Mexiko
-------------------------------	-------	--

2.1.3 Reagenzien und Puffer

Table 3: Übersicht über die hergestellten bzw. verwendeten Reagenzien und Puffer

Reagenzientyp	Details	Hersteller
Aluminium-Hämatoxylin-Lösung (nach Schurink et. al., 2019)	in 1 L destilliertem Wasser: 1 g Hämatoxylin, 50 g Aluminiumammoniumsulfat, 0,2 g Natriumiodid, 1 g Zitronensäure, 50 g Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Assay-Pufferlösung		MCP-1 Human ELISA Kit
Bambanker	Serum-free cell freezing medium	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	pH=7.0	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Desoxyribonuklease I	Rinderpankreas	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)		Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FACS-Puffer	PBS + 0.5 % BSA	Cynthia Weigel et. al., 2015
Fc-Blocker (Human TrueStain FcX)		BioLegend, San Diego, CA, USA
Ficoll	Bio Coll Trennlösung	Bio & Sell GmbH, Feucht, Deutschland

Formaldehyd 4.5 %	gepuffert, neutral	Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)		Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
UltraComp eBeads™ Plus Compensation Beads		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.1.4 ELISA-Kits

Table 4: Liste der nach Herstellerangaben verwendeten ELISA-Kits

ELISA-Kit	Hersteller
Human MDC/CCL22 ELISA Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MCP-1 Human ELISA Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MIP-3 beta/CCL19 Human ELISA Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SDF-1 alpha/CXCL12 Human ELISA Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
VEGF-A Human ELISA Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten Antikörper für die immunhistochemische und durchflusszytometrische Analyse

Antikörper IHC	Klon, Hersteller
CD3	2FGV6, Roche, Basel, Schweiz
CD20	L26, Dako, Santa Clara, USA
CD25	4C9, Novocastra/Leica, Wetzlar, Deutschland
CD68	KP1, Dako, Santa Clara, USA
Anti-STAT1	phospho S727, Abcam, Cambridge, UK
CD163	MRQ-26, Medac, Wedel, Deutschland

Antikörper FACS (Klasse, Typus, Klon, Konjugat)	Hersteller
CD25 monoclonal antibody (CD25-4E3), anti-human, APC, eBioscience	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD4 monoclonal antibody (OKT4), anti-human, FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD80 (B7-1) monoclonal antibody (2D10.4), anti-human, PE, eBioscience	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD163 monoclonal antibody (eBioGHI/61 (GHI/61), anti-human, PE-Cyanine7, eBioscience	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CD45 monoclonal antibody (HI30), anti-human, PerCP-Cyanine5.5, eBioscience	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, CA, USA

2.1.6 Software

Tabelle 6: Softwareübersicht

Software	Hersteller
QuPath 0.3.0	Bankhead, P. et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. Scientific Reports (2017)
QiTissue-Software	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
FlowJo v.9	BD Biosciences, San José, CA, USA
SPSS-Software v.28 für Windows	IBM Corp., Armonk, NY, USA

2.2 Methoden

Der experimentelle Teil dieser Dissertationsarbeit wurde in den National Center for Pleura and Peritoneum (NCP) Forschungslaboren der Abteilung für Allgemeine-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen sowie im Pathologie-Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

2.2.1 Studiendesign

In dieser Arbeit wurden humane Peritonealproben ex-vivo untersucht. Hierbei handelte es sich genauer gesagt um die fettgewebsreiche Duplikatur des Peritoneums, das Omentum, das bei verschiedenen Krebsoperationen im Abdomen entnommen wurde. Die chirurgischen Eingriffe sind in der Abteilung für Allgemeine-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt worden.

2.2.2 Ethischer Hintergrund

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen hat diese Studie genehmigt (Ref. Nr. 696/2016BO2 und 117/2020BO1). Alle Patienten wurden im Vorfeld aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Gewebeproben wurden den Patienten im Rahmen ihrer geplanten Operation entfernt. Somit hatte diese Studie keinerlei Einfluss auf die Behandlung der Patienten, da keine zusätzlichen Proben speziell für diese Studie entnommen werden mussten. Die klinischen Angaben (demografische Standarddaten, Krebshistologie, Ausmaß der Peritonealmetastasen, Diagnosen) wurden anonymisiert, um die Anforderungen der Europäischen Datenschutzverordnung (EDPR) und des deutschen Rechts zu erfüllen. Die gesammelten anonymisierten Daten wurden in einem separaten abgeschlossenen Schrank aufbewahrt.

2.2.3 Probenauswahl

Proben des menschlichen Omentums wurden bei Kolonkarzinomoperationen und zytoreduktiven Operationen zur Behandlung von Peritonealmetastasen entnommen. Bei der Auswahl des Gewebestücks wurde jedoch darauf geachtet, dass es keine direkte makroskopische Beteiligung von Peritonealmetastasen zeigte, um sicher zu stellen, dass die zu untersuchenden Strukturen im Omentum

nicht komplett metastasiert waren. Zur Kontrolle wurde gesundes Gewebe des Omentums verwendet, das bei Schlauchmagenoperationen zur Behandlung von morbiden Adipositaspatienten oder bei der Reparatur von Hernien entnommen wurde. Zur besseren Übersicht sind die verschiedenen untersuchten Gewebegruppen und die dazugehörigen Operationen, aus denen das Gewebe erhalten wurde, nochmals in Tabelle 7 aufgelistet. Unmittelbar nach der Gewebeentnahme sind die Proben auf Eis zur diagnostischen Auswertung in das Pathologielabor transportiert worden. Dieser Ablauf geschah unter Aufsicht eines zertifizierten Pathologen. Proben, die eine längere Ischämiezeit als 15 Minuten aufwiesen, wurden unmittelbar entsorgt. Im Labor wurde das Gewebe entweder direkt frisch aufgearbeitet, um daraus eine Zellsuspension zu gewinnen oder es wurde in Aluminiumdosen der entsprechenden Größe in einem Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff zwischenzeitlich asserviert. Nach einer halben Stunde wurden die Aluminiumdosen aus dem Dewargefäß entfernt und in eine Kryobehahrungsbox gegeben. Diese Proben wurden dann bis zur nächsten Analyse in einer Gefriertruhe mit -80 °C gelagert.

Tabelle 7: Übersicht über die resezierten menschlichen Omentum majus Proben von drei unterschiedlichen Patientengruppen

Gewebegruppen	Operationen
- Patientengewebe mit Kolonkarzinom und Peritonealmetastasen	- zytoreduktive Chirurgie
- Patientengewebe mit Kolonkarzinom	- Hemikolektomie
- Normales/Gesundes Kontrollgewebe	- Schlauchmagenoperationen - Hernienoperationen

2.2.4 Lokalisierung von MS

Da es sich bei MS um sehr kleine Immunzellansammlungen handelt, die direkt unterhalb der Mesothelzellschicht liegen, sind sie im menschlichen Gewebe nicht ohne Weiteres nachweisbar. Um jedoch die Lokalisierung der MS in größeren Gewebeproben zu vereinfachen, wurde für diese Studie eine präanalytische Probenvorbereitung von B. Schurink et al., 2019 (Schurink et al., 2019), herangezogen. Hierbei handelte es sich um eine schnelle und einfache

Färbemethode, die es ermöglicht, MS in größeren Omentumproben zu identifizieren. Dies erleichterte die Arbeit für weitere Untersuchungen von MS. Nach Schurink et. al., 2019, wurden hierfür Proben vom menschlichem Omentum majus genutzt, die zuvor in einer Formalinlösung mit 4.5 % Formaldehydgehalt, pH 7.4, fixiert worden waren. Diese Gewebeproben wurden 7 Minuten lang in eine spezielle Aluminium-Hämatoxylin-Lösung gegeben, die wie folgt im Vorfeld hergestellt wurde: in 1 l destilliertem Wasser sind 1 g Hämatoxylin, 50 g Aluminiumammoniumsulfat, 0,2 g Natriumiodid, 1 g Zitronensäure und 50 g Chloralhydrat gelöst worden. Alles zusammen wurde auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur (RT) für 2 Stunden gerührt. Vor jeder Nutzung musste diese Lösung filtriert werden. Nachdem das Omentum in diese Lösung getaucht wurde, ist es 10 Minuten lang bei fließendem Leitungswasser gespült worden. Anschließend konnten die MS mit einem Lichtmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und zusätzlicher Lichtquelle (Kaltlichtquelle KL200) einfach identifiziert werden. Bis zur weiteren Bildgebung wurden die Gewebeproben mit den enthaltenen MS in 4.5 % Formaldehyd (pH=7.4) aufbewahrt.

2.2.5 Immunhistochemie (IHC)

2.2.5.1 Probenaufarbeitung

Nachdem die fixierten Gewebeproben mit der speziellen Hämatoxylin-Lösung (s. oben) gefärbt worden waren und damit Gewebebereiche, die MS enthalten, ausgewählt werden konnten, sind diese in die für die Paraffineinbettung notwendigen Kassetten gelegt worden. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Omentumproben in einer Ethanol-Reihe mit aufsteigender Konzentration. Über die Inkubation in Xylol wurde das Gewebe dann in Paraffin eingebettet. Die Probenblöcke wurden vor dem Schneiden 30 Minuten lang auf Eis gekühlt, um eine härtere Oberfläche zu erlangen, was dazu beitrug, bessere Schnitte herstellen zu können. Zum Anfertigen der Paraffinschnitte wurde ein Rotationsmikrotom genutzt (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland). Hiermit konnten 5 µm Schnitte des eingebetteten Omentums hergestellt werden, die in ein vorgewärmtes Wasserbad (37 °C) zum Strecken

der Schnitte gegeben wurden, um sie nachfolgend glatt auf Objektträger aufziehen zu können (Superfrost® Plus, R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland). Zum Trocknen wurden die Objektträger über Nacht bei RT in einen Objektträgerständer gestellt, woraufhin sie am nächsten Tag für die weiteren histologischen Untersuchungen verwendet werden konnten.

2.2.5.2 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit dem vollautomatisierten Färbesystem von VENTANA BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Schweiz). Die Paraffinschnitte sind mit den folgenden Antikörpern gefärbt worden: CD3 (2FGV6, Roche, Basel, Schweiz), CD20 (L26, Dako, Santa Clara, USA), CD68 (KP1, Dako, Santa Clara, USA), Anti-STAT1 (phospho S727, Abcam, Cambridge, UK), CD163 (MRQ-26, Medac, Wedel, Deutschland), CD25 (4C9, Novocastra/Leica, Wetzlar, Deutschland).

2.2.5.3 Immunhistochemische Analyse

Nach der immunhistochemischen Färbung mit den Antikörpern (s. Tabelle 5) wurden die Objektträger zuerst mit einem Lichtmikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) analysiert. Für eine gute quantitative Analyse der Objektträger erfolgte die Digitalisierung mit Hilfe eines hochauflösenden Slide Scanners (Ventana DP200, Roche, Basel, Schweiz) im pathologischen Institut der Universität Tübingen. Der Hochgeschwindigkeits-Hellfeld-Scanner Ventana DP200 ermöglicht es sechs Objektträger gleichzeitig mit einer hervorragenden Bildqualität zu scannen. Die anschließende quantitative Auswertung der IHC-Objektträger wurde mit der Pathologie- und Bioimage-Analyse-Software QuPath 3.0 vorgenommen. Diese Software ermöglichte mit kompletten Objektträgerbildern („whole slide imaging“) zu arbeiten. So konnte die Quantifizierung von angefärbten Bereichen in den eingebetteten Omentumflächen sowie Zellzählungen definierter Gebiete erfolgen.

2.2.6 Gewebe-basierter ELISA

2.2.6.1 Probenaufarbeitung

Um das Vorhandensein unterschiedlicher Chemokine im Omentum nachzuweisen, machte man sich verschiedene humane ELISA-Kits (s. Tabelle 4) zu Nutze. Da für diese Standardaufbereitung normalerweise Plasma, Serum oder ein Überstand eingesetzt wird, musste ein neues Protokoll entwickelt werden, mit dem es möglich war, Chemokine aus dem fettreichen Omentalgewebe zu gewinnen. Mit Hilfe der neuen Aufarbeitung konnten die Chemokine aus dem Omentum aus einer wässrigen Zwischenschicht gewonnen werden, die dann mittels ELISA-Kits gemäß Herstellerangaben gemessen werden konnten.

Zu Beginn der Gewebeaufarbeitung wurden die entsprechenden gefrorenen Proben aus der -80 °C Gefriertruhe (in Kapitel 2.2.3 beschrieben) geholt und langsam bei RT aufgetaut. Zur Normalisierung wurden die gefrorenen Omentumproben auf einer Präzisionswaage (R180D; Sartorius, Göttingen, Deutschland) gewogen und mit dem Skalpell in entsprechend gleich große Stücke geschnitten. Die Gewebestücke wurden dann in 2 ml Röhrchen inklusive 4 Metallkugeln (Metal Bead Tubes Kit; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) platziert und es wurde jeweils 500 µl Assay-Pufferlösung zugegeben. Anschließend wurden alle Röhrchen für 20 Sekunden auf einem Vortex-Mixer gemischt. Für die Homogenisierung des Gewebes wurde ein automatischer Homogenisator (TissueLyser LT; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) genutzt, bei dem das Gewebe jeweils dreimal für 15 Minuten in vertikaler Position (50 Hz/s, 3000 Schwingungen/min) zerkleinert wurde. Um eine noch effizientere Homogenisierung zu erreichen, wurden die Proben zusätzlich jeweils dreimal 15 Minuten lang in horizontaler Position (1400 rpm) bei RT homogenisiert (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurden die Röhrchen für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (9000 rpm; 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Schließlich wurde die so entstandene wässrige Phase unterhalb der Lipidschicht mit einer dünnen Glaspipette abpipettiert, in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C asserviert.

2.2.6.2 Chemokinbestimmung mittels ELISA

Für die Chemokinbestimmung wurden Omentumbiopsien von Patienten mit PM, mit primärem Kolonkarzinom und Kontrollen (gesundes Gewebe) mit der oben beschriebenen Methode für die Analyse vorbereitet. Die folgenden Chemokine wurden für das Profiling der Tumormikroumgebung ausgewählt:

- Tumorfördernde Chemokine: CCL2, CCL22 und CXCL12
- Tumورهemmendes Chemokin: CCL19
- Angiogenese-förderndes Chemokin: VEGF-A

Es wurden Kits verwendet, die in Tabelle 4 aufgelistet sind und gemäß des beigefügten Protokolls durchgeführt wurden. Die Absorption aller ELISA's wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 450 nm mit dem NanoQuant Infinite M200 Pro Mikroplattenlesegerät (Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) bestimmt.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Um verschiedene Zellpopulationen im Omentum zu bestimmen, wurde in diesem Projekt die Methode der Durchflusszytometrie gewählt. Dieses Verfahren dient der Analyse von Einzelzellsuspensionen. Durch das Erzeugen eines kontrollierten linearen Stroms (hydrodynamische Fokussierung) kann eine Probe in einzelne Zellen getrennt werden. Unter Nutzung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften ist es möglich, Aufschluss über die Eigenschaften eines Partikels zu bekommen. Dabei gibt die Lichtstreuung, die in Vorwärtsrichtung (FSC) von einem Laser erfasst wird, Auskunft über die Zellgröße, wobei größere Partikel mehr Licht brechen als kleinere Partikel. Seitlich gestreutes Licht (SSC) wird von einem Sensor erfasst, der im rechten Winkel zum einfallenden Lichtweg verläuft und kann so Informationen über die Granularität liefern. Je größer dabei der SSC ist, desto größer ist auch die Granularität des Partikels. Um eine noch genauere Phänotypisierung der einzelnen Zellen zu erhalten, ist eine Fluoreszenzmarkierung erforderlich. Hierbei werden durch Laser verschiedener Wellenlängen die Fluorophore angeregt und das emittierte Licht von entsprechenden Detektoren gemessen. Für die optimale Messung ist die richtige Auswahl der Fluorophore zu den entsprechenden vorhandenen Wellenlängen

der Laser sowie der zu untersuchenden Zellpopulationen von enormer Bedeutung. Die ausgewählten fluoreszenzmarkierten Antikörper für dieses Experiment sind in Tabelle 5 aufgelistet. Ebenso kann durch eine vorherige Kompensation die spektrale Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe vermindert werden, wie dies im Vorfeld bei dieser Arbeit auch durchgeführt wurde.

2.2.7.1 Antikörpertitration

Die Antikörpertitration dient zur Optimierung der Färbung in der Durchflusszytometrie. Dabei geht es darum, die richtige Antikörperkonzentration für eine spezifische Probe, die im Experiment genutzt wird, zu bestimmen. Besitzt man einen Überschuss an Antikörpern, hat das zur Folge, dass diese auch an Ziele mit niedriger Affinität auf Zellen binden, was zum Anstieg der Hintergrundfluoreszenz führt. Zudem kann bei einer zu hohen Antikörperkonzentration auch ein falsch negativer Prozoneneffekt hervorgerufen werden. Ebenso von Nachteil ist es, wenn man zu wenige Antikörper einsetzt. Dann kommt es zu einer Abnahme des positiven Signals, was wiederum die Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung herabsetzt. Somit ist es empfehlenswert, eine Titration der Antikörper zur Bestimmung der richtigen Konzentration durchzuführen, um die beste Färbung mit dem geringsten Hintergrund zu erhalten sowie zuverlässige Ergebnisse zu erzielen.

Bei der Titration werden Verdünnungen des Antikörpers hergestellt. Dabei sollte die gleiche Anzahl von Zellen im gleichen Volumen gefärbt werden. Normalerweise sollte dies immer unter denselben Versuchsbedingungen wie das eigentliche Experiment stattfinden. Da in dieser Arbeit jedoch humane Proben zum Einsatz kamen und diese nur in begrenztem Umfang zur Verfügung standen, sind diese Proben für das eigentliche Experiment aufgehoben worden. Deshalb wurden zur Titration der Antikörper Zellen verwendet, die denen aus dem Omentum am nächsten kamen. Es wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) genutzt.

Nach dem Waschen und Zählen der Zellen wurde eine definierte Zellzahl von 1×10^6 festgelegt. Anschließend wurden die Zellen mit einer seriellen Verdünnungsreihe der Antikörper in einem Volumen von 100 μ l in einer 96-Well-

U-bottom-Platte angefärbt. Im Folgenden soll der Ablauf zur Herstellung der Verdünnungen kurz erläutert werden: In die erste Vertiefung wurde jeweils 5 µl eines Antikörpers zu 15 µl FACS-Puffer gegeben und alles gut vermischt. In die Vertiefungen 2-7 wurden 10 µl FACS-Puffer vorgelegt. Nun folgte das Pipettieren von 10 µl aus der Vertiefung 1 in die Vertiefung 2 und alles wurde gemischt. Anschließend wurden 10 µl von Vertiefung 2 in Vertiefung 3 pipettiert und gemixt. Dies wurde so lange auf dieselbe Weise durchgeführt, bis Vertiefung 7 erreicht wurde. Anschließend wurden 10 µl entfernt, damit sich zum Schluss in jeder Vertiefung 10 µl Lösung der jeweiligen Antikörperkonzentration befand. Zu den Antikörperkonzentrationen in den 7 Vertiefungen wurde nun 90 µl der vorbereiteten Zellsuspension hinzugegeben und alles resuspendiert. Die Platte wurde für 20 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank platziert. Nach dem Waschen der Suspension mit 120 µl FACS-Puffer wurde die Platte bei 1450 rpm 10 Minuten lang bei 4 °C zentrifugiert (GS-6R-Zentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Nachdem der Überstand abgenommen wurde, sind die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und in 5 ml FACS-Röhrchen überführt worden.

Die Herstellung der Verdünnungen wurde in den NCPP-Forschungslaboren vorbereitet, während die Messungen am Durchflusszytometer in den Räumlichkeiten der FACS Core Facility (FCF) der Universität Tübingen durchgeführt wurden. Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, San José, CA, USA). Die Daten wurden mittels „Concatenating“ in der FlowJo Software analysiert und so die optimale Antikörperkonzentration ausgewählt. Beispielhaft sind im Folgenden (Abbildung 4) für den Antikörper CD45 die „concatenated“ Rohdaten und die ausgewählte Antikörperkonzentration aus dem Antikörper-Titrations-Experiment dargestellt. Die Rohdaten für die restlichen Antikörper nach der Titration sind dem Anhang zu entnehmen.

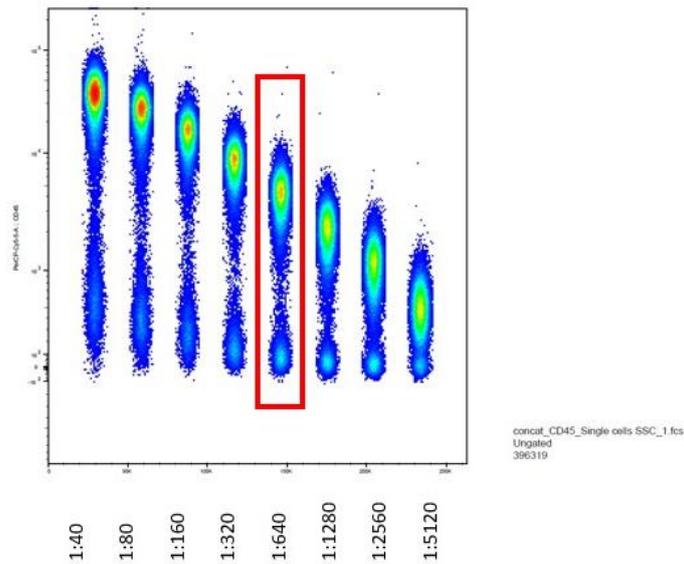


Abbildung 4: Verkettete („Concatenated“) Rohdaten für den Marker CD45 nach der Antikörper-Titration

Auf diese Art und Weise sind die optimalen Konzentrationen aller verwendeten Antikörper bestimmt und in Tabelle 8 aufgelistet worden. Zur Erleichterung des Pipettierens dieser kleinen Antikörpermengen wurden für jeden Antikörper im Vorfeld entsprechende Vorverdünnungen hergestellt, damit für den Mastermix je Antikörper nur noch 5 µl auf 100 µl Färbervolumen hinzugegeben werden musste. Diese Vorverdünnungen sind ebenfalls in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Aus der Titration gewonnene optimale Verdünnung der Antikörper sowie die daraus hergestellten Vorverdünnungen für eine finale Pipettierung von 5 µl Antikörper/100 µl Färbervolumen (1:20)

	Optimale Verdünnung für ein Färbervolumen von 100 µl	Vorverdünnungen
CD80-PE	1:100	1:5
CD163-PE-Cy7	1:200	1:10
CD25-APC	1:40	1:20
Zombie Aqua	1:2000	1:100
CD4-FITC	1:500	1:25
CD45-PerCP-Cy5.5	1:600	1:30

2.2.7.2 Probenaufarbeitung

Da das Omentum ein sehr fettreiches Gewebe ist, gab es im Vorfeld keine Aufbereitung für die Durchflusszytometrie auf diese Art und Weise. Um aus dem Omentum eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde ein neu entwickeltes Protokoll angewandt, das im kommenden Abschnitt näher erläutert wird. Für die Aufbereitung waren frische Omentum majus Proben von einer durchschnittlichen Größe von 5-10 cm und einem Gewicht von 20-60 g nötig. Die resezierten Proben aus dem Operationssaal oder der Pathologie sind mit dem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in mehreren Röhrchen platziert worden. Zu diesen wurde mit einer Pipette 2,5 ml PBS/0,5 % BSA/2 mM EDTA dazugegeben. Nach dem Mixen der Röhrchen mit einem Vortex-Mixer (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland) für 30 Sekunden wurden die Gewebestücke mit einem Micra D-9 Homogenisator (MICCRA GmbH, Heitersheim, Deutschland) zerkleinert. Diese Gewebesuspension wurde für die weitere mechanische Zerkleinerung mit Hilfe eines Zellschabers durch einen 70 µm Zellsieb in 3-4 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, je nach Größe des Gewebes. Die Gewebesuspensionen in den 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden nachfolgend in einem Volumen von 30 ml mit PBS/0,5 % BSA/2mM EDTA resuspendiert. Nach kurzem Ruhen der Röhrchen konnte man das Fett, das sich oben abgesetzt hatte, mit einer 3 ml Einwegpipette entfernen. Störendes Material für die Durchflusszytometrie konnte so auf einfache Art und Weise entfernt werden. In die mit 15 ml Ficoll vorbereiteten 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde dann die Gewebesuspension mit 25 ml Pipetten vorsichtig auf Ficoll geschichtet. Die Röhrchen wurden 30 Minuten lang bei RT ohne Bremse zentrifugiert (2000 rpm; GS-6R-Zentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Anschließend konnten die mononukleären Zellen in der Interphase vorsichtig abgenommen und in neue 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Zellen wurden nun mittels Pufferlösung (PBS) zweimal gewaschen und je zweimal 10 Minuten lang bei RT mit Bremse zentrifugiert (1500 rpm). Nach dem Resuspendieren mit PBS und Poolen der Zellen wurde das Röhrchen 10 Minuten lang bei RT mit 1300 rpm zentrifugiert. Am Ende wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert und die Zellen mit einem Hämocytozometer unter Verwendung von

Trypanblau gezählt. Nach erneuter Zentrifugation der Zellsuspension (1200 rpm) wurde diese mit einem speziellen, an Lymphozyten angepasstem Einfriermedium (Bambanker, Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland) ohne Dimethylsulfoxid (DMSO) im entsprechenden Volumen resuspendiert und in 1 ml Kryogefäße aliquotiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Insgesamt konnten in Abhängigkeit der Gewebegröße und der Erkrankung zwischen 3×10^5 und 3×10^6 Zellen aus dem Omentum gewonnen werden.

2.2.7.3 Präparation der Zellen für das Durchflusszytometer

Am Tag der Messung mit dem Durchflusszytometer wurden die eingefrorenen Zellen in den Kryogefäßen im Wasserbad bei 37 °C für ca. 2-4 Minuten aufgetaut. In dieser Zeit wurde 10 ml FACS-Puffer (PBS/0,5 % BSA) mit 76,4 µl Desoxyribonuklease I (DNase I) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die DNase I dient dazu Zellverklumpungen zu reduzieren. Die Zellen aus den Kryoröhrchen wurden dann in den vorbereiteten FACS-Puffer mit DNase I gegeben, gut gemischt und bei 1450 rpm für 8 Minuten bei RT zentrifugiert (GS-6R-Zentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Zum Ermitteln der Zellzahl mittels Trypanblau wurde das Zellpellet zuvor in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und um Trümmer und Abfall aus der Zellsuspension zu entfernen, zusätzlich durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert. Mit dem Hämozytometer wurde die Zellzahl in der gesamten Suspension bestimmt. Zur Analyse der Zellpopulationen im Omentum mit Hilfe des Durchflusszytometers wurde eine Zellzahl von ca. 1×10^5 Zellen/50 µl Zellsuspension festgelegt. In die entsprechenden Vertiefungen einer 96-Well-U-bottom-Platte wurde schließlich jeweils 50 µl der vorbereiteten Zellsuspension pipettiert. Um unspezifische oder falsch-positive Antikörperfärbungen von Zellen zu vermeiden, wurden mit Hilfe eines Fc-Blockers diese unerwünschten Bindungen an Fc-Rezeptoren, die vor allem Makrophagen und Monozyten auf ihrer Oberfläche exprimieren, geblockt. Dazu wurde 5 µl Fc-Block (Human TrueStain FcX, BioLegend, San Diego, CA, USA) zu jeder Probe dazugegeben und gut resuspendiert. Diesen ließ man für 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubieren. Im Vorfeld wurde ein Mastermix aus den vorverdünnten Antikörpern in entsprechender Menge (s. Tabelle 9) vorbereitet.

Hiervon sind der Zellsuspension nun 50 µl hinzugegeben worden, damit sich ein Gesamtfärbevolumen von 100 µl ergab. Um tote Zellen aus der Analyse ausschließen zu können, wurde dem Antikörpermix der Lebend/Tot-Farbstoff ZombieAqua (BioLegend, San Diego, CA, USA) zugefügt.

Tabelle 9: Mastermixzusammensetzung für unterschiedliche Volumina (50 µl, 100 µl und 250 µl) der verwendeten vorverdünnten Antikörper

	1x <i>(in µl)</i>	2x <i>(in µl)</i>	5x <i>(in µl)</i>
CD80-PE	5	10	25
CD163-PE-Cy7	5	10	25
CD25-APC	5	10	25
Zombie Aqua	5	10	25
CD4-FITC	5	10	25
CD45-PerCP-Cy5.5	5	10	25
FACS-Puffer	20	40	100
Total	50	100	250

Nach Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde die Zellsuspension 30 Minuten lang bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die verwendeten Antikörper für dieses Experiment sind in Tabelle 5 aufgelistet. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 120 µl FACS-Puffer gewaschen und bei 1450 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (GS-6R-Zentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Nach dem Dekantieren wurden die Zellen in 200 µl eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert und in 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Bis zum Analysezeitpunkt sollten die Zellen im Dunkeln auf Eis oder bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, sind die vorbereiteten Zellen immer innerhalb einer halben Stunde am Durchflusszytometer gemessen worden.

2.2.7.4 Herstellung Fluorescence Minus One Controls (FMO)

Bei Mehrfarben-Durchflusszytometrie-Panels, wie sie in dieser Arbeit genutzt wurden, bietet es sich an FMO-Kontrollen zu verwenden. Sie dienen zur Bestimmung der Fluoreszenzverstärkung und helfen bei der Positionierung der Gates. Die FMO-Kontrollen enthielten alle fluoreszenzmarkierten Antikörper bis

auf einen, der jeweils weggelassen wurde. Für dieses Experiment wurden zusätzlich zu den vollgefärbten Proben, sofern die Zellzahl dies zugelassen hat, FMO-Kontrollen für die Antikörper CD25-APC, CD80-PE und CD163-PE-Cy7 hergestellt. Diese wurden entsprechend des Protokolls für vollgefärbte Proben angefertigt (s. Kapitel 2.2.7.3). Anstatt des Mastermix, der alle Antikörper beinhaltet, wurden den Zellen, die zur Kontrolle dienten, jeweils der FMO-Mix zugegeben, bei dem der entsprechende Antikörper weggelassen wurde.

2.2.7.5 Messungen am Durchflusszytometer

Die vollgefärbten Proben und die dazugehörigen Kontrollen wurden ebenfalls in den NCPP-Forschungslaboren vorbereitet, während die Messungen am Durchflusszytometer BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, San José, CA, USA) in den Räumlichkeiten der FCF der Universität Tübingen stattgefunden haben. In dieser Arbeit wurden verschiedene Immunzellsubtypen aus dem Omentalgewebe von den drei unterschiedlichen Patientengruppen (s. Tabelle 7) charakterisiert. Es schloss sich eine Auswertung und Analyse der Daten mittels FlowJo Software v.9 an.

2.2.7.6 Analyse der Proben mittels ‚Gating Strategie‘

Die Datenanalyse in der Durchflusszytometrie basiert auf dem Prinzip des ‚Gatings‘. Durch die Eigenschaften von Vorwärtsstreuung, Seitenstreuung und Fluoreszenz können Zellpopulationen von Interesse durch das Setzen spezifischer Gates untersucht und quantifiziert werden. Im Folgenden soll anhand eines Beispiel-Analyseblatts (Abbildung 5) die ‚Gating-Strategie‘ für die Leukozyten-Subpopulation, die für alle omentalen Gewebeproben verwendet wurde, dargestellt werden. FSC und SSC wurden verwendet, um alle Zellen im Gewebe anhand der relativen Größe und Morphologie der Zellen zu identifizieren und gleichzeitig Trümmer und tote Zellen zu entfernen. Doppelzellen wurden von Einzelzellen durch das Auftragen der FCS-Höhe gegen die FCS-Fläche unterschieden, da Doubletten die doppelte Fläche von Einzelzellen aufweisen, während die Höhe ähnlich bleibt. Durch die Verwendung eines Tot-/Lebend-Antikörpers wurde sichergestellt, dass alle toten Zellen, die unspezifisch Antikörper aufnehmen können, aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Alle

Leukozyten des Gewebes wurden mit dem CD45-Marker und alle T-Lymphozyten mit dem CD4-Marker dargestellt. Ausgehend von diesen Punktdiagrammen wurden die einzelnen Subpopulationen durch Auftragen von CD80 gegen CD163 oder CD4 gegen CD25 identifiziert.

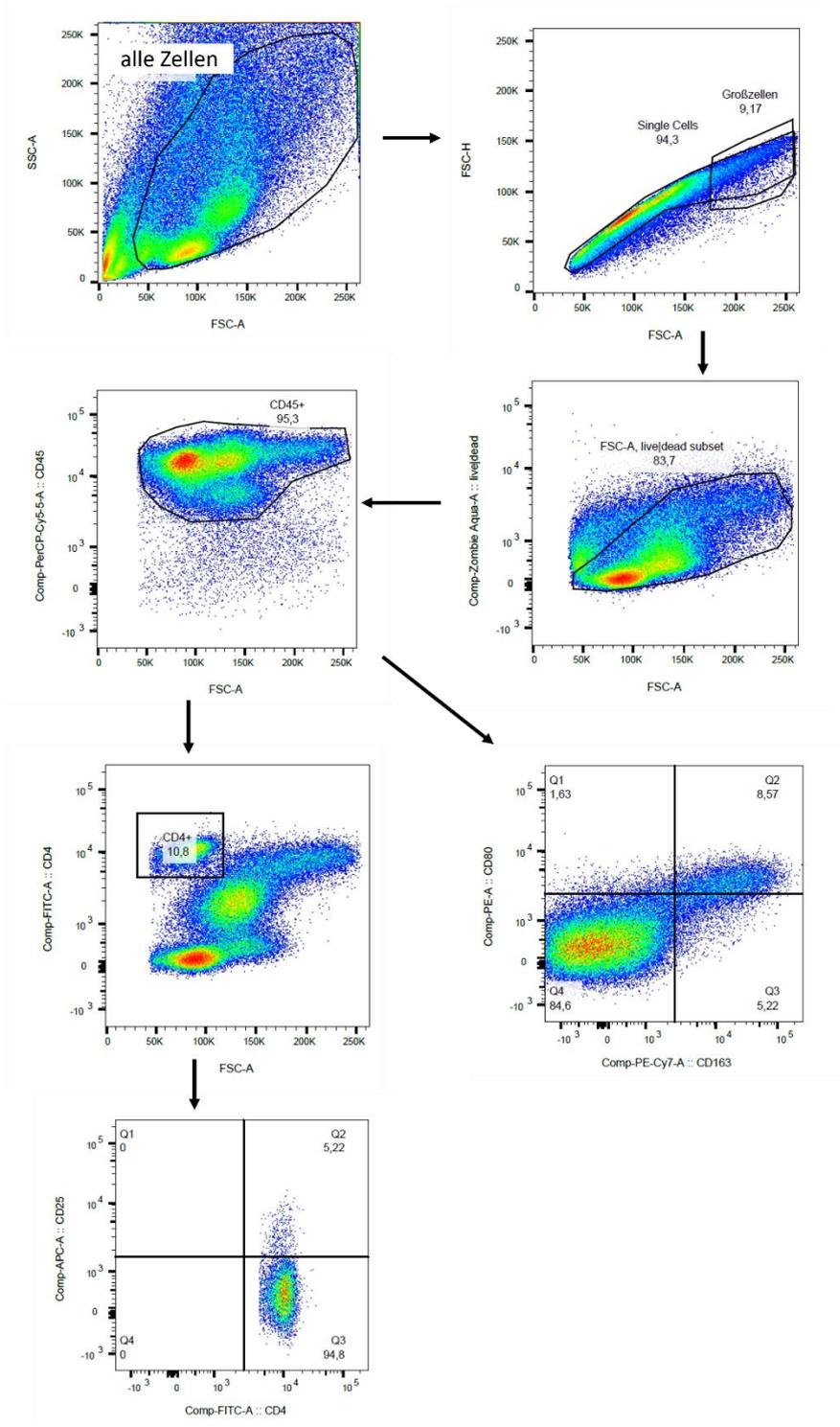


Abbildung 5: „Gating Strategie“ der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen im Omentalgewebe

2.2.8 Multiplex-Fluoreszenzmikroskopie (MacSima)

2.2.8.1 Probenaufarbeitung

Bei dieser Methode wurden Gewebeproben vom menschlichen Omentum, die in Aluminiumdosen bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert wurden (in Kapitel 2.2.3 beschrieben), langsam bei RT aufgetaut. Anschließend wurde das Gewebe mittels eines Gewebeeinbettmediums (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound) auf einen Halter aufgebracht. Das Gewebe der drei unterschiedlichen Patientengruppen (s. Tabelle 7) wurde nebeneinander auf einem Halter platziert und gemeinsam eingebettet. So hatte man in nur einem Schnitt alle drei Gewebegruppen auf dem Objektträger. Mit dem Kryostat (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) sind 5 µm Schnitte bei ca. -20 °C bis -30 °C angefertigt und auf SuperFrost® Plus Objektträger (L. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen worden. Für die spätere Messung im MacSima wurden im Vorfeld die Objektträger mittels einer Schablone so markiert, dass die entsprechenden Felder für ein MACSwell™ Four Imaging Frame darauf zu sehen waren. In diese vorgezeichneten Felder wurden jeweils 4 Schnitte, die immer alle 3 Gewebeproben beinhalteten, aufgezogen. Die fertigen Objektträger sind bis zur Weiterverarbeitung, die jedoch binnen einer Woche erfolgen sollte, bei -80 °C asserviert worden.

Nach dem Auftauen der Objektträger wurden die Schnitte in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in einen MACSwell™ Four Imaging Frame (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) montiert. Es erfolgte eine Färbung mit DAPI, bevor die Proben mit dem MACSima Imaging System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) analysiert wurden.

2.2.8.2 Messungen am MacSima

Die Multiplex-Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem MACSima-Gerät (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt, das sich in den Forschungslaboren der Kinderklinik befand und mit Hilfe der Arbeitsgruppe für das Projekt genutzt werden konnte. Das MACSima ist ein vollautomatisches Ultra-High-Imaging-System, das eine parallele Analyse von bis zu 100 extra- und intrazellulären Markern in ein und derselben Probe durch iterative zyklische

Photobleichung und Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht. Die Bilder werden dann digital verarbeitet. Für diese Studie wurde folgendes Antikörper-Panel verwendet: CD3, CD4, CD8, CD4/CD25, CD68, CD86, CD163, FoxP3. Die Antikörperlösungen sind in einer 96-Well-Platte vorbereitet worden. Nach der Fertigstellung sind die Probenplatte und die Antikörperplatte in das Gerät geladen worden. Die bevorzugten Bildgebungsbereiche (ROI) wurden manuell ausgewählt. Dann erfolgte der gesamte iterative Färbe-, Bildgebungs- und Lösprozess automatisiert über einen Zeitraum von 16 Stunden. Die Daten wurden mit der QiTissue-Software (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) ausgewertet.

2.2.9 Statistische Auswertung

Vor den Experimenten in dieser Arbeit wurde keine Stichprobengröße festgelegt. Die explorative Datenanalyse wurde mit Jupiter Notebook, Python, Pandas und Seaborn (Anaconda, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die deskriptiven Statistiken wurden als Mittelwert und Konfidenzintervalle von 95 % oder, wenn die Daten keine Normalverteilung aufwiesen, mit Median und Quartilen angegeben. Die Daten wurden graphisch als Boxplots, Säulendiagramme und Punktdiagramme dargestellt und dienten der Visualisierung sowie der Gegenüberstellung der Gruppen. Die komparative Statistiken umfassten nicht parametrische Tests zum Vergleich der Mittelwerte und wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics v.28 für Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistochemische Ergebnisse

Mit der immunhistochemischen Analyse konnten in dieser Arbeit die Leukozyten-Subpopulationen im Omentum visualisiert werden. Hierzu wurde eine immunhistochemische Standard-Technik herangezogen, bei der Gewebestücke vom Omentum von den drei unterschiedlichen Patientengruppen mit den in Tabelle 5 aufgeführten IHC-Antikörpern gefärbt wurden. Bei der immunhistochemischen Analyse wurde zum einen der Fokus auf die Immunzellenverteilung im gesamten Omentum und zum anderen speziell auf die einzigartigen lymphatischen Immunzellansammlungen, die MS, gelegt.

In dieser Arbeit wurde die gefärbte Fläche aller Immunzellen eines Markers im Verhältnis zur gesamten Oberfläche einer Omentumprobe in Prozent quantifiziert. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass sich MS hauptsächlich aus T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen zusammensetzen. Daher wurden diese Zellen mit ihren entsprechenden Oberflächenmarkern in einem Stück Omentum untersucht, um den Prozentsatz der Immunzellen im gesamten Omentalgewebe aufzuzeigen. Wie Abbildung 6 zeigt, waren Makrophagen (CD68⁺) deutlich häufiger im Gewebe vertreten als T- (CD3⁺) und B-Lymphozyten (CD20⁺), während B-Lymphozyten im gesamten Gewebe am wenigsten vorhanden waren. Die Population von CD3-positiven Zellen war im Gewebe von PM-Patienten (0,26 %) im Vergleich zum gesunden Gewebe (0,1 %) signifikant erhöht. CD20-positiv Zellen zeigten einen deutlich erhöhten Prozentsatz in PM-Geweben (0,08 %) im Vergleich zu Tumorgewebe ohne PM (0,03 %) oder gesundem Gewebe (0,02 %). Gleiches galt für die CD68-positiven Zellen (Standardmarker für Makrophagen) im Omentalgewebe der drei unterschiedlichen Patientengruppen (gesund: 0,2 % Krebs: 0,4 %, PM: 1,8 %).

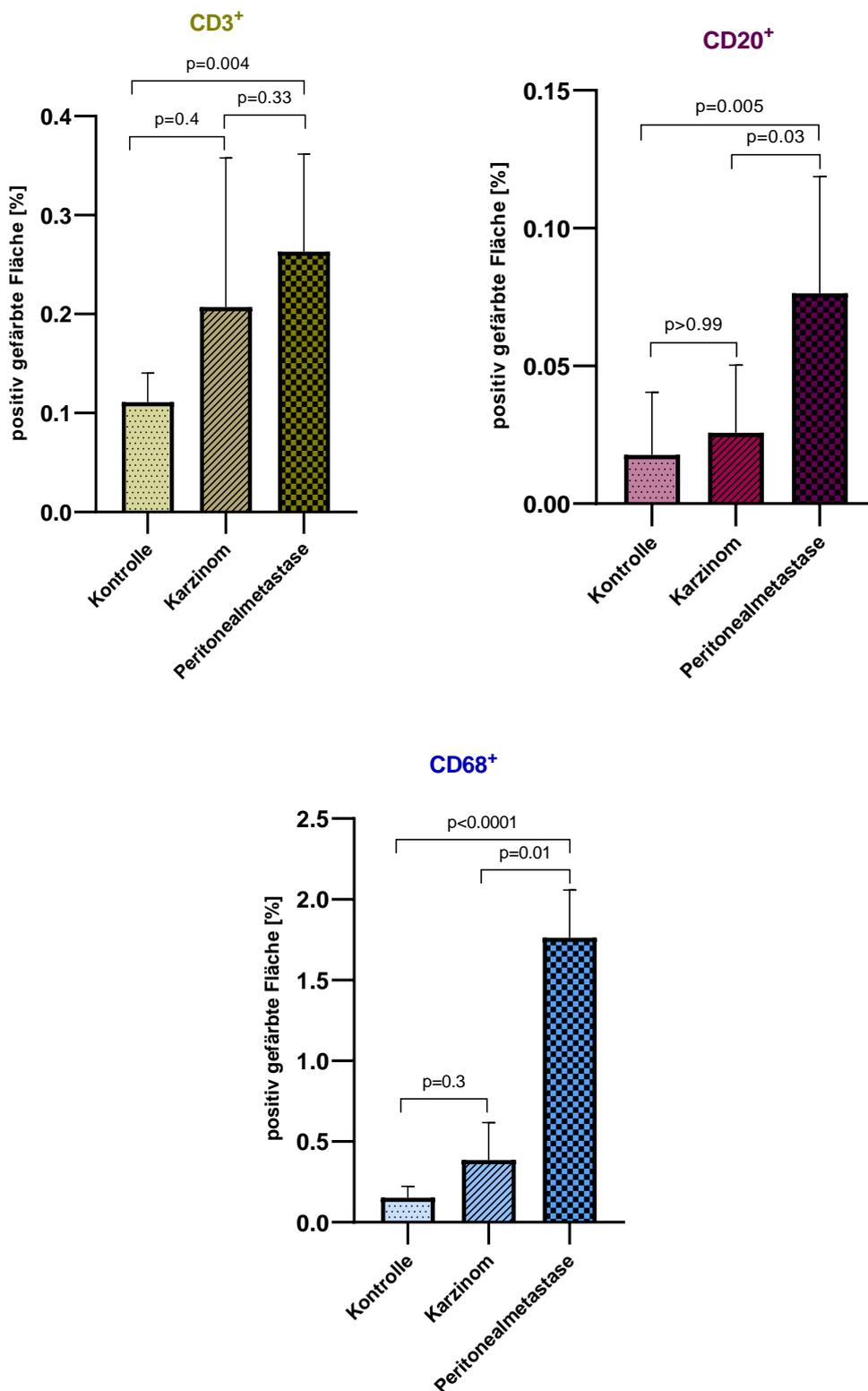
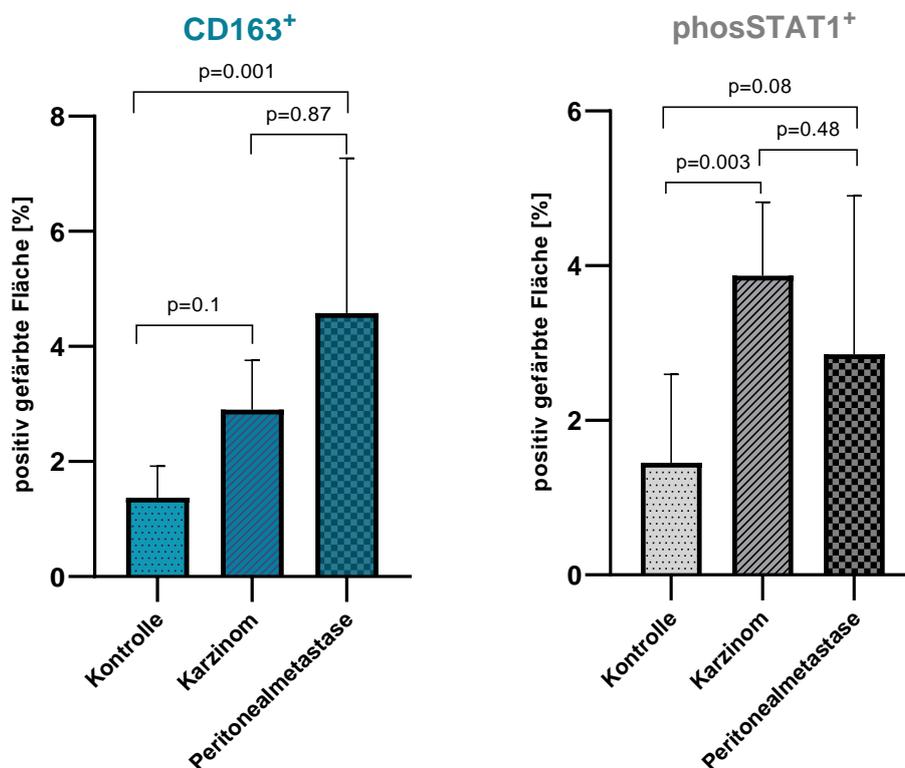


Abbildung 6: Semiquantitative Analyse der IHC-Objektträger,
 die die positiv gefärbte Fläche in Prozent zur Gesamtoberfläche des untersuchten
 menschlichen Omentalgewebes von drei unterschiedlichen Patientengruppen mit drei
 verschiedenen Markern wiedergibt

In Abbildung 7 wird aufgezeigt, wie sich die untersuchten Subpopulationen im Verhältnis zur Gesamtoberfläche des Omentums darstellen. Sowohl im gesunden als auch erkrankten Gewebe waren die häufigsten Subpopulationen der Immunzellen M1- und M2-Makrophagen, die mit den Markern phosSTAT1 bzw. CD163 nachgewiesen wurden. Die Gesamtheit der M2-Makrophagen nahm mit dem Fortschreiten der PM zu. Diese Population stieg von 1,4 % in den gesunden Kontrollgeweben auf 2,9 % in Geweben von Kolonkarzinompatienten ohne PM und auf 4,6 % in Gewebe von Patienten mit Kolonkarzinom und zusätzlicher PM. Verglichen mit dem normalen Gewebe (1,5 %) war die M1-Makrophagen-Population im Omentum von Kolonkarzinompatienten mit oder ohne PM überrepräsentiert (3,8 % bzw. 2,9 %). Die gefärbte Fläche der CD25-positiven T-Zellen war insgesamt in allen drei Patientengruppen sehr niedrig. Jedoch nahm auch hier im Verlauf der Peritonealmetastasierung die Anzahl der Zellen signifikant zu (gesundes Gewebe: 0,02 %, Kolonkarzinom: 0,07 %, PM: 0,10 %).



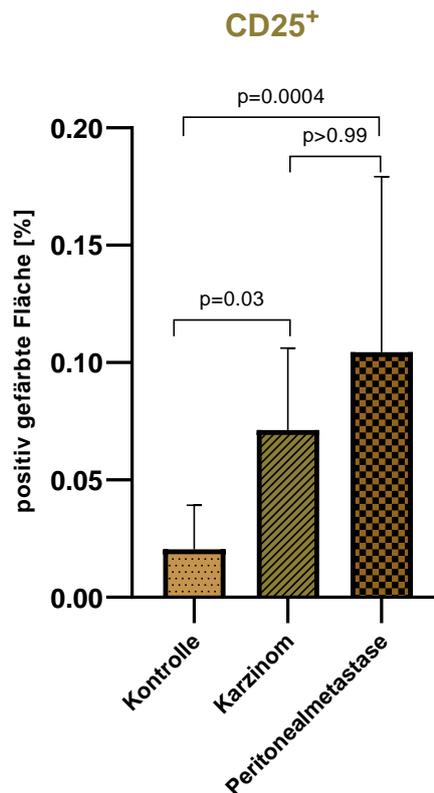


Abbildung 7: Semiquantitative Analyse der IHC-Objektträger,
 die die positiv gefärbte Fläche der Subpopulationen in Prozent zur Gesamtoberfläche des
 untersuchten menschlichen Omentalgewebes von drei unterschiedlichen Patientengruppen mit
 drei verschiedenen Markern wiedergibt

Die folgenden Ergebnisse fokussieren sich auf die semiquantitative Analyse der Immunzellsubpopulation speziell in einzelnen MS. Dabei wird hier die Leukozytenzusammensetzung der MS im Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Peritonealmetastasierung aufgezeigt.

Abbildung 8 zeigt, dass die durchschnittliche Zellzahl in einem MS während des Voranschreitens der PM zunahm. Besonders hoch erwiesen sie sich im Gewebe von PM-Patienten, wo die Zellzahl signifikant erhöht war gegenüber dem Gewebe mit Kolonkarzinom ohne PM ($p < 0.0001$) und dem Kontrollgewebe ($p < 0.0001$). Ebenso wurden Unterschiede in der Verteilung der Immunzellpopulationen festgestellt (Abbildung 9): im gesunden Gewebe war die Anzahl der verschiedenen Immunzellen jeweils geringer als bei den Tumorpatienten, mit Ausnahme der B-Lymphozyten. Hier wurden sowohl im Peritonealmetastasengewebe als auch im gesunden Gewebe gleich viele Zellen

nachgewiesen. Zudem ist aus der Graphik zu erkennen, dass während des Fortschreitens der PM die MS eine höhere Anzahl an T-Lymphozyten und Makrophagen erwarben. Bei den Makrophagen war insbesondere die Zahl der CD163⁺-Zellen in den MS der Peritonealmetastasengewebe überdurchschnittlich hoch vorhanden. Darüber hinaus stieg die Zahl der CD25⁺-Zellen zusammen mit der Tumorprogression bei MS erheblich an, auch wenn diese Zellen insgesamt von allen untersuchten Zellen die Minderheit darstellten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Analyse der IHC-Objektträger aufzeigte, dass vor allem die Anzahl der Makrophagen, unabhängig vom Subpopulationstyp (M1- oder M2-Makrophagen), innerhalb der MS zunahm. Zusätzlich fiel auf, dass mit steigender Tumorprogression die Makrophagen nicht nur innerhalb der MS zunahmen, sondern auch deutlich mehr Makrophagen außerhalb der MS im Gewebe verteilt lokalisiert waren, wie es anhand der Abbildung 7 bereits nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu sammelten sich die CD3-, CD20-, und CD25-positiven Zellen im Gewebe von PM-Patienten hauptsächlich nur in den MS und waren deutlich weniger außerhalb der MS im Gewebe verstreut.

Zellzahl in MS

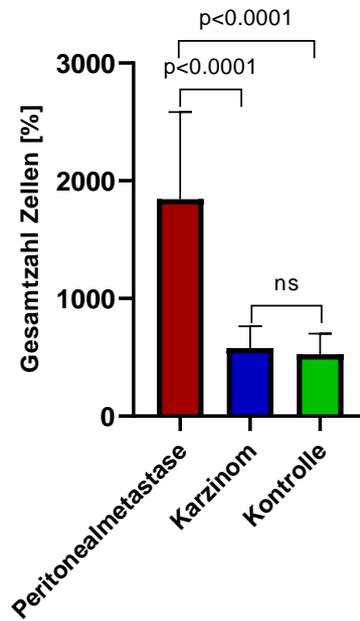


Abbildung 8: Gesamtmenge der Immunzellen in einem einzelnen MS in den drei unterschiedlichen Patientengewebegruppen

Zelluläre Zusammensetzung der MS

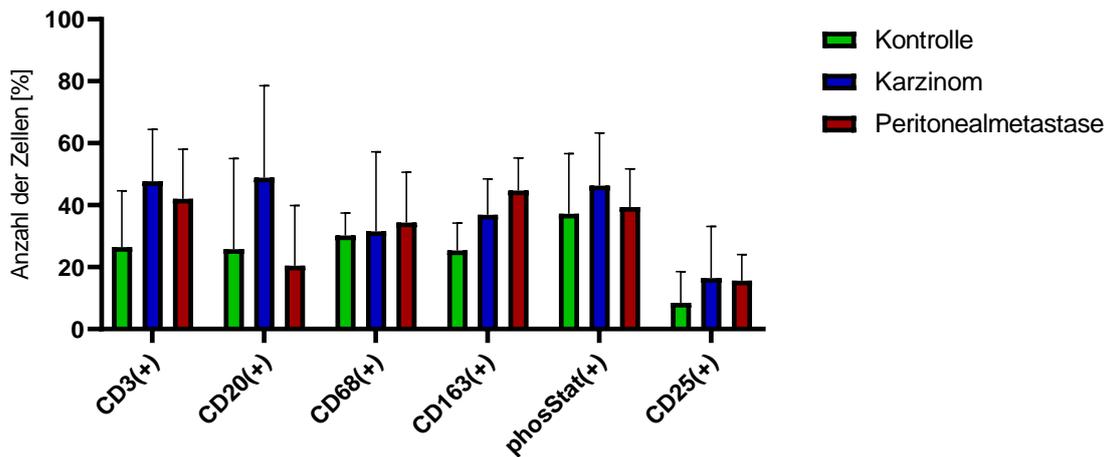
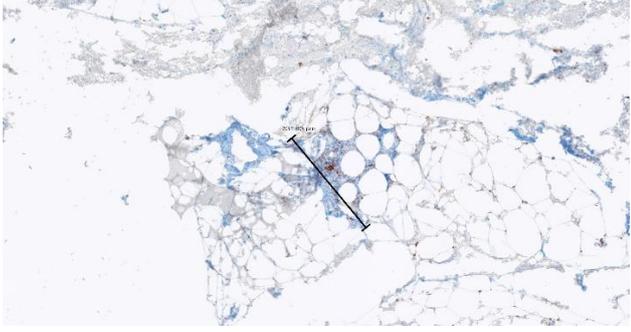
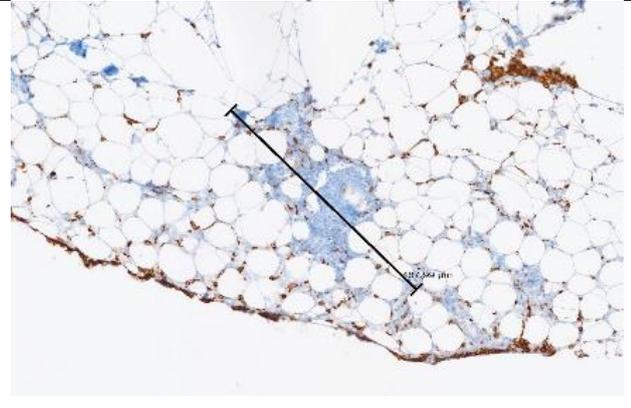
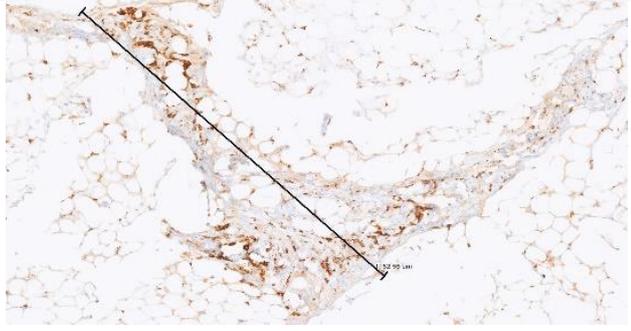


Abbildung 9: Verteilung der verschiedenen getesteten Immunzellen (CD3, CD20, CD68, CD163, phosStat1, CD25) innerhalb der MS in den drei unterschiedlichen Patientengewebegruppen

Wie die Abbildung 8 bereits statistisch aufzeigte, nahm die Anzahl der Zellen innerhalb der MS mit dem Schweregrad der Erkrankung zu. Anhand des Markers CD163 soll in den folgenden Abbildungen (Tabelle 10) illustriert werden, wie die MS im Omentum mit dem Fortschreiten der Erkrankung dadurch auch an Größe zunahm. Mit diesem Beispiel lässt sich deutlich veranschaulichen, dass der Umfang der MS in den Geweben, in denen der Tumor bereits metastasiert war, am größten war. In allen drei Bildern erkennt man die MS als isoliert gefärbte Stellen umgeben von omentalem Fettgewebe. Hinweis: alle Bilder wurden in derselben Vergrößerung aufgenommen (10x).

Tabelle 10: Größenzunahme von MS in Zusammenhang mit der Tumorprogression anhand des Markers CD163

<p>Gesundes Kontrollgewebe</p> <p>→ 332 μm</p>	
<p>Gewebe von Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM</p> <p>→ 488 μm</p>	
<p>Gewebe von Patienten mit Kolonkarzinom und PM</p> <p>→ 1153 μm</p>	

Mittels der immunhistochemischen Analyse konnte ebenfalls verdeutlicht werden, dass auch die Anzahl der MS in den untersuchten Gewebeproben, die im Durchschnitt eine Fläche von 2 mm² aufwiesen, während des Fortschreitens der Erkrankung zunahm: Normalgewebe = 1, Krebsgewebe = 2-3, metastatisches Gewebe > 4.

Um aufzuzeigen, dass es sich bei den Immunzellansammlungen wirklich um MS handelt, wurde Gewebe daraufhin untersucht, dass alle Zellen mit ihren unterschiedlichen Oberflächenmarkern an der gleichen Stelle im Gewebe lokalisiert waren. So konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den angefärbten Immunzellen auch um MS handelt. Abbildung 10 veranschaulicht ein typisches Bild der Immunzellpopulationen eines MS im Omentum. Bei diesen Bildern handelt es sich um Gewebe eines Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM. Dabei zeigen die Abbildungen den gleichen MS an identischer Stelle im Gewebe, der durch die sechs unterschiedlichen Marker (CD3, CD20, CD68, CD25, CD163, phosSTAT1) identifiziert wurde. Auch in diesem Beispiel sind alle Bilder in derselben Vergrößerung dargestellt (10x).

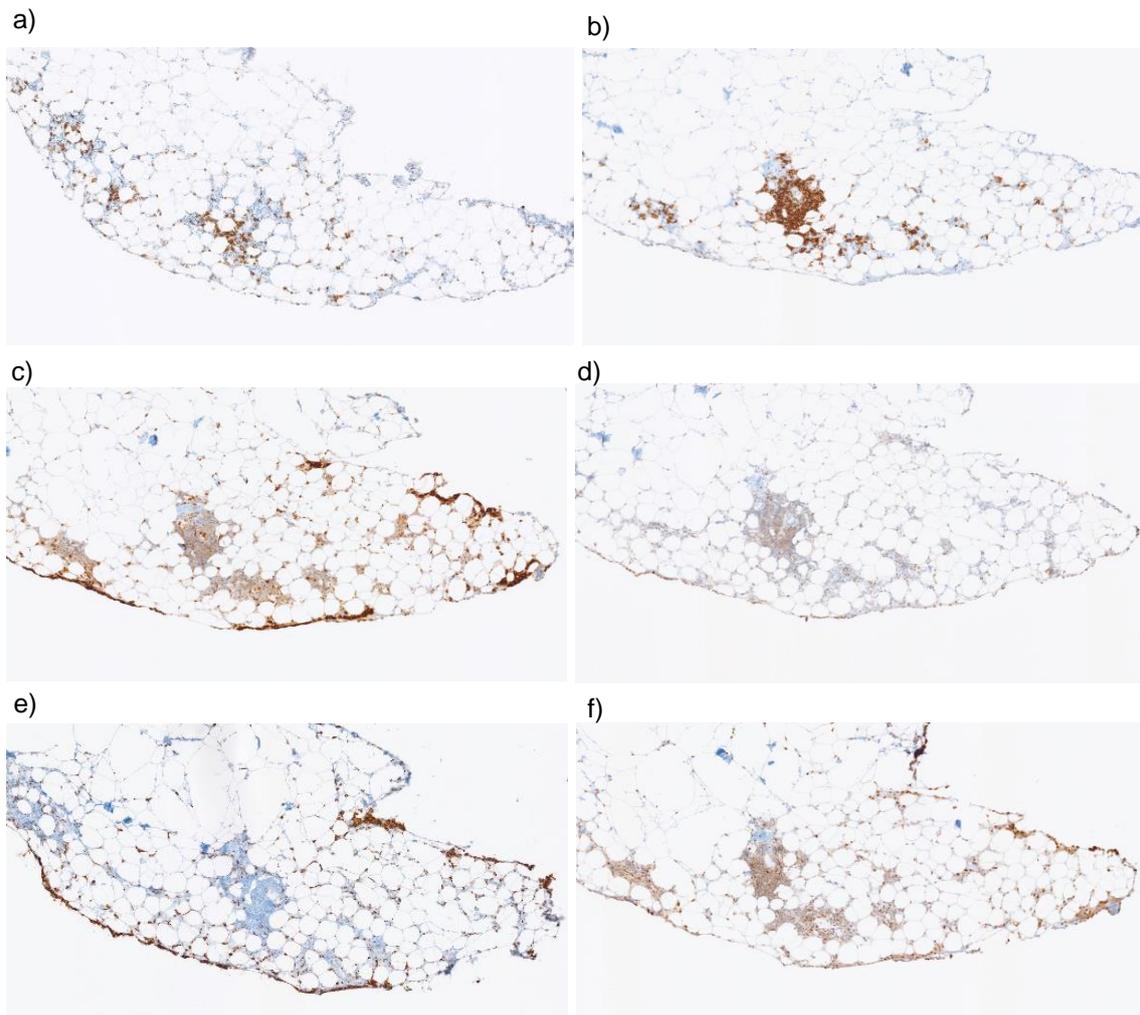


Abbildung 10: Immunzellpopulationen in einem einzelnen identischen MS eines Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM

a) CD3 b) CD20 c) CD68 d) CD25 e) CD163 f) phosSTAT1

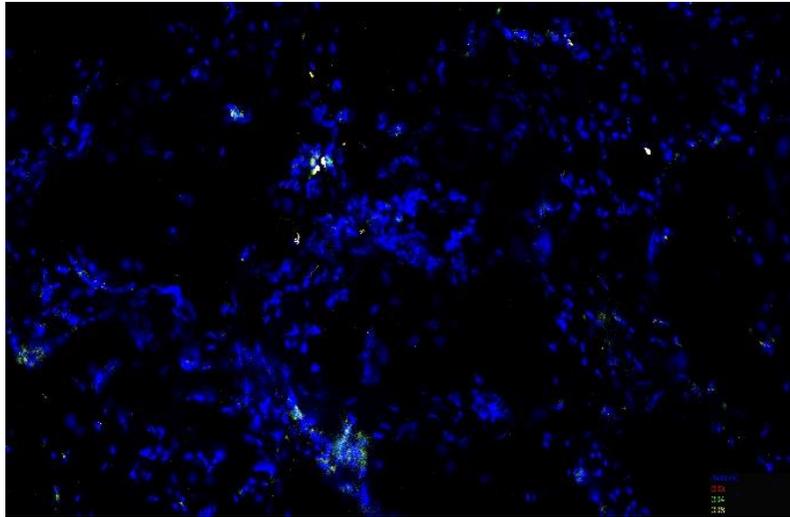
3.2 Multiplex fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse

In dieser Arbeit sollen die Immunzellen im Omentum näher charakterisiert werden. Mittels Immunhistochemie war es jedoch nur möglich, bestimmte Zellen mit einem Marker pro Objektträger anzufärben. Eine neuere Multiplex-Imaging-Technik (MacSima) ermöglichte es dahingegen, mehrere Immunzellpopulationen in einem Bild sichtbar zu machen. Die folgenden Antikörper wurden verwendet: CD3 (T-Lymphozyten), CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD4/CD25 (regulatorische T-Zellen), CD68 (allgemeiner Marker für Makrophagen), CD86 (M1-Makrophagen), CD163 (M2-Makrophagen), und FoxP3 (intrazellulärer Marker für regulatorische T-Zellen). Nach Digitalisierung der Schnitte und Auswertung der Daten mittels QiTissue-Software konnten die Immunzellsubpopulationen durch Fluoreszenzmarker mit unterschiedlichen Farben dargestellt werden. Der Vergleich der Bilder zwischen Kontrollen, primären kolorektalen Tumoren und Peritonealmetastasen ermöglichte es, Veränderungen in den komplexen Immunzell-Subpopulationen im Omentum mit der Tumorprogression sichtbar zu machen.

Zur besseren Übersicht wurden bei der Auswertung die Lymphozyten- sowie die Makrophagenpopulationen in getrennten Bildern visualisiert. In den Abbildungen 11 und 12 stellt jeweils das obere Bild die Lymphozytenpopulationen mit folgenden Farben dar: CD3 - rot, CD4 - grün, CD8 - gelb, CD25 - rosa, FoxP3 - türkis. Die unteren Bilder zeigen die Makrophagenpopulationen mit folgenden Markern und Farben: CD68 - rot, CD163 - grün, CD86 - orange. Die Zellkerne sind blau gegengefärbt (DAPI).

Die unten aufgeführten Abbildungen zeigten jeweils nur eine sehr kleine „Region Of Interest“ (ROI, ca. 9 mm²) vom untersuchten Omentum. Bei den kleinen Arealen, die untersucht werden konnten, gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM und dem gesunden Gewebe. Hingegen gab es eine Diskrepanz zwischen einerseits, gesundem Omentalgewebe und andererseits, Omentalgewebe von PM-Patienten mit Kolonkarzinom. Für die beiden Patientengruppen wurde jeweils sowohl eine Abbildung der Lymphozyten- als auch Makrophagenpopulationen erstellt.

Gesundes Omentalgewebe



Omentum von PM-Patienten

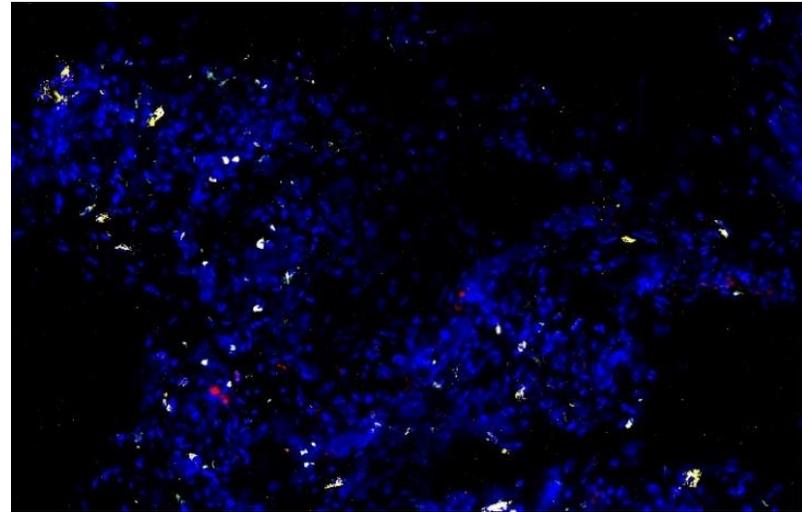


Abbildung 11: Lymphozytenpopulation im gesunden Omentalgewebe (links) und im PM erkrankten Gewebe (rechts) dargestellt mittels MacSima Software

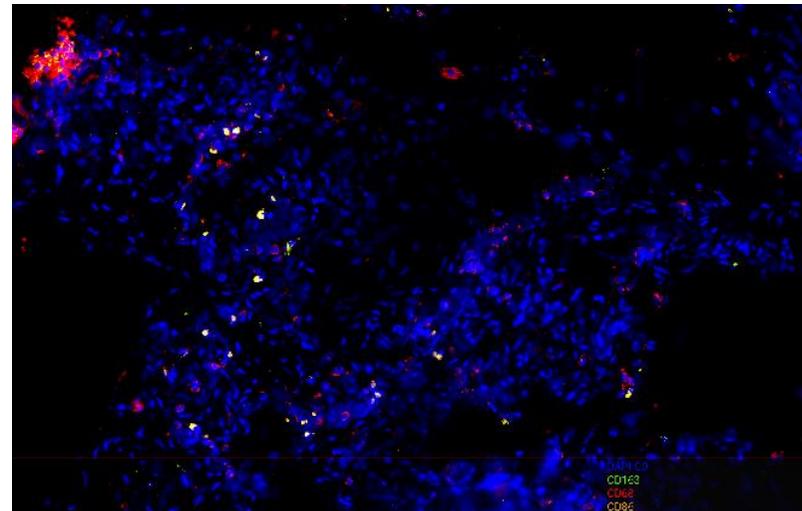
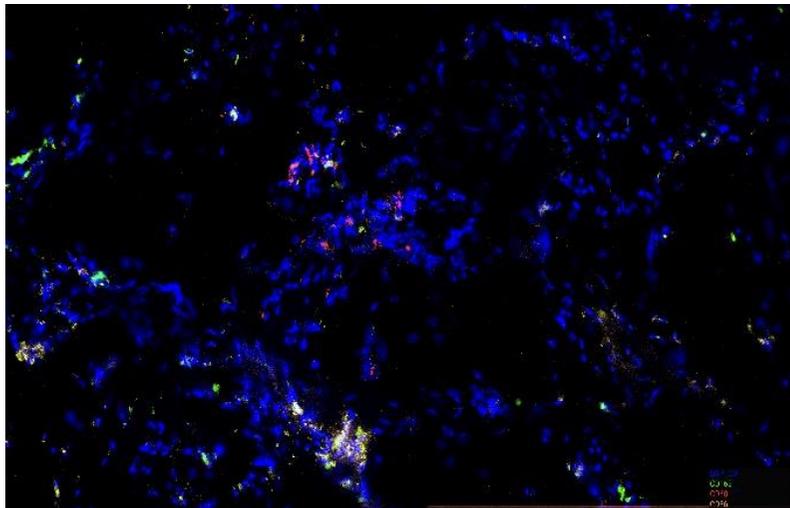


Abbildung 12: Makrophagenpopulation im gesunden Omentalgewebe (links) und im PM erkrankten Gewebe (rechts) dargestellt mittels MacSima Software

Die Abbildungen 11 und 12 heben auf den ersten Blick hervor, dass verschiedene Immunzellen im Omentum vorzufinden waren. Der Bildvergleich zeigt, dass im Gewebe von PM-Patienten mehr Lymphozyten (CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3) und auch Makrophagen (CD80, CD86, CD163) zu finden waren als im Gewebe von gesunden Patienten oder solchen, die nur an einem Primärtumor (Kolonkarzinom) litten (Abbildungen sind hier nicht dargestellt). Ebenso konnte mittels Multiplex-Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, dass alle Subpopulationen, die in dieser Arbeit näher betrachtet werden, in den untersuchten ROI im Gewebe von Patienten mit PM vorhanden waren: regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺), M1-Makrophagen (CD86⁺) und M2-Makrophagen (CD163⁺).

Im Gegensatz dazu zeigten sowohl das gesunde Omentum als auch das Omentum von Patienten mit Kolonkarzinom, dass in den untersuchten ROI keine regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺ oder FoxP3) vorzufinden waren. Hier konnten nur einige T-Lymphozyten (CD3⁺), T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) nachgewiesen werden. Bei den Makrophagen hingegen konnten im gesunden Kontrollgewebe, wie im Gewebe von PM-Patienten, sowohl M1-(CD86⁺) als auch M2-Makrophagen (CD163⁺) aufgezeigt werden, jedoch in deutlich geringerer Anzahl.

Es soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass im untersuchten Ausschnitt des Omentalgewebes nur wenige angefärbte Zellen zu finden waren. Dabei muss beachtet werden, dass das Omentum vor allem aus Fettgewebe und nur einigen Immunzellansammlungen (MS) besteht, die in der kleinen ROI „zufällig“ getroffen werden.

Bei der Multiplex-Immunfluoreszenz mussten teilweise andere Oberflächenmarker für die Charakterisierung der Zellen herangezogen werden. Dies lag daran, dass einige Oberflächenrezeptorantikörper für diese neue Methode noch nicht ausreichend etabliert sind und somit auf andere Oberflächenmarker zurückgegriffen werden musste. Jedoch binden diese Ersatzmarker an dieselben Oberflächenrezeptoren (CD).

3.3 Durchflusszytometrische Ergebnisse

Die aus dem menschlichen Omentum isolierten Immunzellen, wie in Kapitel 2.2.7.2 bereits erläutert, wurden mittels FACS charakterisiert. Die Zellproben sind dazu mit den FACS-Antikörpern aus Tabelle 5 gefärbt worden. Nach der Auswertung der gemessenen Proben konnten insgesamt 10 menschliche omentale Gewebeproben in die finale Analyse eingeschlossen werden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen sind in den folgenden Abbildungen 13 bis 16 anhand von Punktdiagrammen veranschaulicht.

Die Gesamtmenge an Zellen, die aus dem menschlichen Omentum isoliert werden konnte, zeigte vor allem einen deutlichen Trend in der Gruppe der PM-Patienten (Abbildung 13). Hier war die Anzahl aller Zellen im Gewebe gegenüber der beiden anderen Gruppen (Kolonkarzinom ohne PM und Normalgewebe) deutlich erhöht. Zwischen dem Kontrollgewebe und dem Gewebe der Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

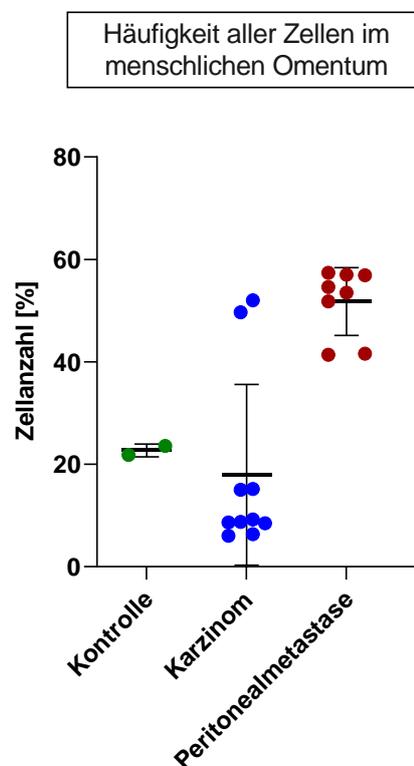


Abbildung 13: Anteil aller Zellen im menschlichen Omentum, die mittels FACS in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen gemessen werden konnten

Im Verhältnis zu allen Zellen im Omentum, die im ersten Schritt gemessen wurden, nahm die Anzahl der CD45⁺-Leukozyten aus der Gesamtheit aller Zellen in den drei Gewebegruppen stetig zu (dargestellt in Abbildung 14). Die kleinste Menge an CD45⁺-Zellen befand sich im gesunden Gewebe (61 %), daraufhin folgte das Gewebe von Kolonkarzinom Patienten ohne PM mit 75 % und erreichte einen Anteil von 90 % CD45⁺-Leukozyten im Gewebe von Kolonkarzinom Patienten mit PM.

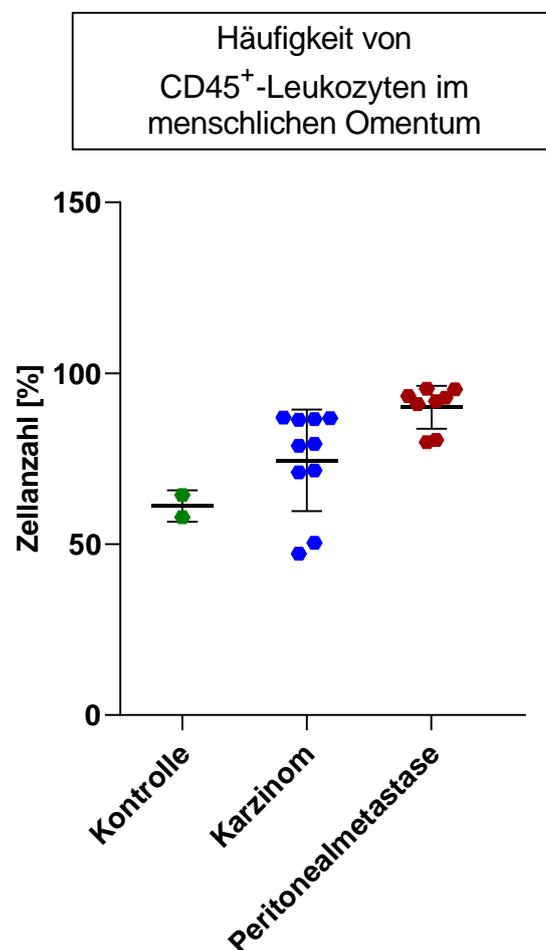


Abbildung 14: Anteil der CD45⁺-Leukozyten von allen Zellen im Omentum, die mittels FACS in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen gemessen werden konnten

Um die Makrophagen-Subpopulationen im Omentum darzustellen, wurden diese im Verhältnis zum Gate der CD45⁺-Leukozyten mit den Markern CD80 (M1-

Makrophagen) und CD163 (M2-Makrophagen) charakterisiert. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, waren sowohl die einfach positiven („single-positive“, SP) CD80-Zellen als auch die SP CD163-Zellen im Gewebe von PM-Patienten vermehrt vorhanden. Es zeigte sich bei beiden Makrophagen-Subpopulationen ausgehend vom PM-Gewebe eine absteigende Tendenz über das Gewebe mit Kolonkarzinom bis hin zum gesunden Kontrollgewebe. Einen deutlichen Unterschied gab es auch in der Verteilung der doppelt positiven (DP) CD80/CD163-Zellen. Diese waren im Vergleich zum Kontrollgewebe insbesondere im Gewebe von Kolonkarzinompatienten und ebenso im PM-Gewebe deutlich mehr vorhanden.

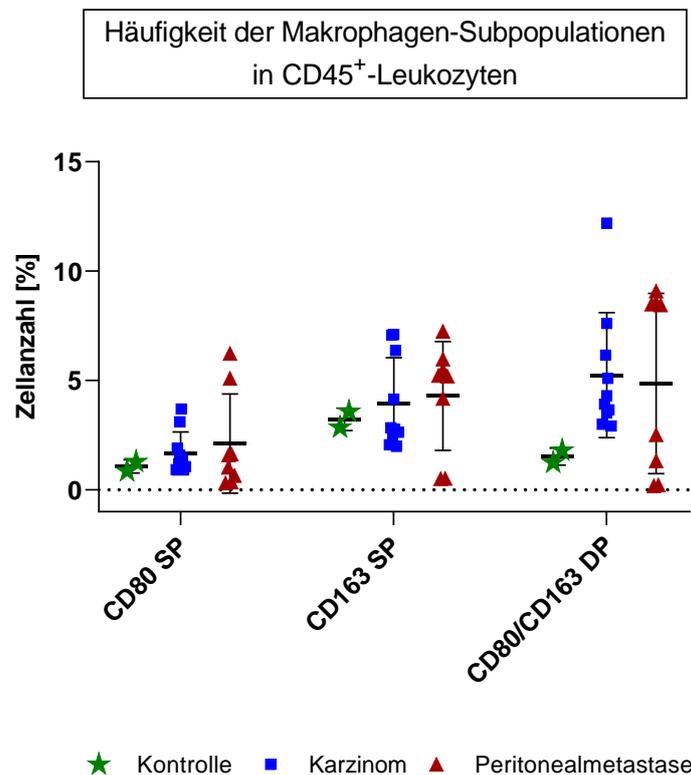


Abbildung 15: Häufigkeit der Makrophagen-Subpopulationen aus den CD45⁺-Leukozyten in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen, gemessen mittels FACS

Um die regulatorischen T-Zellen darzustellen, wurde zunächst der Anteil der T-Lymphozyten (CD4⁺) an der Gesamtmenge der Leukozyten (CD45⁺)

Gewebegruppen besteht darin, dass sich die Erkrankungen der Patienten sowohl mit PM als auch ohne PM in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Stadien befanden.

Diese Analysen zeigen eindeutige Tendenzen in den Immunzellpopulationen zwischen den einzelnen Gruppen auf. An dieser Stelle muss jedoch angemerkt werden, dass für die Statistiken lediglich eine einzige Kontrollprobe aus Normalgewebe zur Verfügung stand. Aufgrund der geringen Zellzahl in den MS gesunder Patienten bedurfte es für die Probenaufarbeitung besonders große Omentalgewebefragmente. Solch große benötigten Gewebefragmente gesunder Patienten waren in dem vorgegebenen Zeitraum im Rahmen des Ethikvotums kaum zu erhalten. Aus den anderen, kleineren Normalgewebeproben konnten zu wenige Zellen isoliert werden, um sie für die Analyse zu verwenden.

3.4 Chemokinbestimmung aus dem Omentalgewebe

Zur Bestimmung der Chemokinkonzentration wurden ebenfalls Omentalgewebeproben aus drei verschiedenen Patientengruppen (Kontrollpatienten ohne maligne Erkrankung, Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom ohne PM und Patienten mit PM) untersucht. Bei den Patienten, die an PM erkrankt waren, wurde darauf geachtet, dass das entnommene Omentum nicht direkt vom Tumor befallen war. Mit Hilfe der neu entwickelten präanalytischen Probenvorbereitungstechnik, die im Kapitel 2.2.6.1 bereits näher beschrieben wurde, wurden wässrige Überstände des Omentums erzeugt, die dann mittels ELISA gemessen werden konnten. Nach erfolgreicher Probenvorbereitung wurde sowohl die Expression tumorfördernder Chemokine (CCL2, CCL22, CXCL12) als auch tumorhemmender Chemokine (CCL19) analysiert.

Die Abbildung 17 fasst die Messergebnisse zusammen (s. nächste Seite).

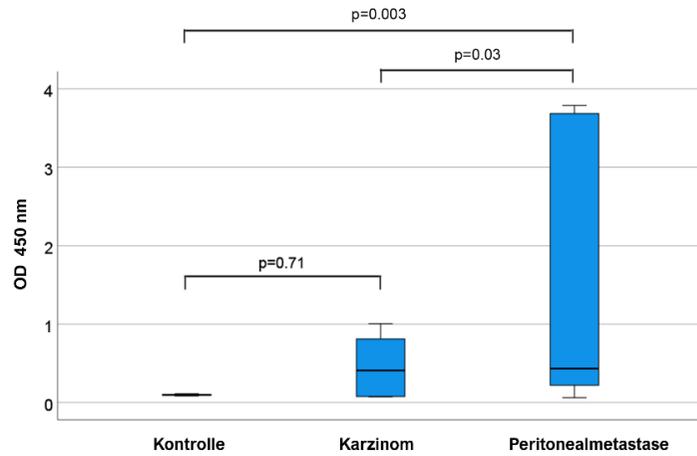
- CCL2

CCL2, auch bezeichnet als monocyte chemoattractant protein-1, zeigte eine abfallende Konzentration in den drei unterschiedlichen Gewebegruppen (Abbildung 17). Dabei war der CCL2 Gewebespiegel in Patienten mit Kolonkarzinom und PM am höchsten. Bei Patienten mit PM war CCL2 signifikant erhöht vs. Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM ($p = 0,03$) und ebenso vs. dem Kontrollgewebe ($p = 0,003$). Das niedrigste Level trat somit im Kontrollgewebe auf.

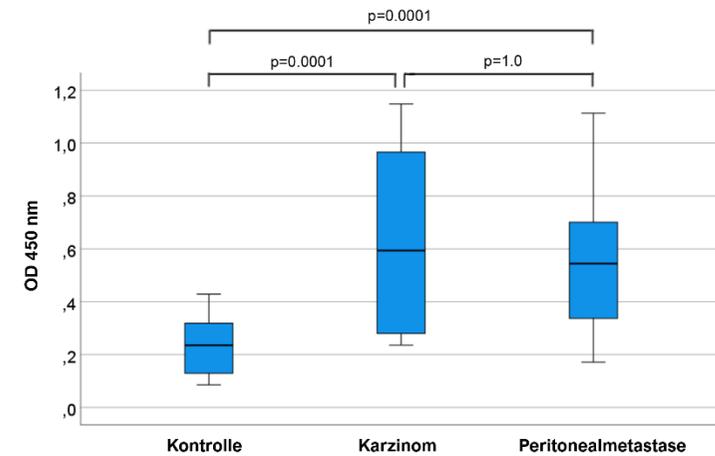
- CCL22

Die Expression des tumorfördernden Chemokin CCL22, das speziell in verschiedenen Krebsarten exprimiert wird und vor allem zur Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen innerhalb eines Tumors beiträgt, war im Gewebe von Patienten mit PM und bei den Patienten, die allein an Kolonkarzinom erkrankt waren, deutlich höher als beim Kontrollgewebe ($p = 0,0001$ für beide Vergleiche).

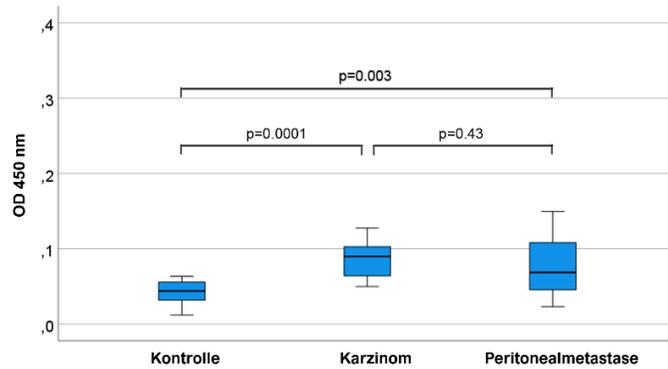
CCL2



CCL22



CXCL12



CCL19

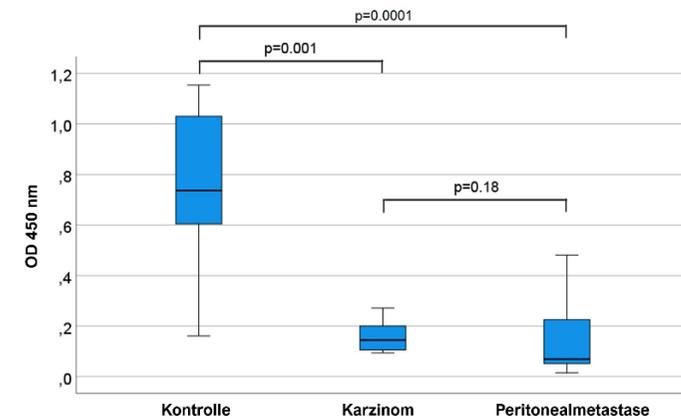


Abbildung 17: Tumorfördernde und tumorhemmende Chemokine im Omentum im Zusammenhang mit der Progression von PM (Gesund, Kolonkarzinom, PM), die mittels ELISA gemessen werden konnten.

Tumorfördernde Chemokine CCL2, CCL22, CXCL12; tumorhemmendes Chemokin CCL19

- CXCL12

Analog zu CCL22 verhielt sich das Chemokin CXCL12, welches eine starke chemotaktische Wirkung auf Lymphozyten im entzündeten Gewebe und auf Tumorzellen bei der metastatischen Streuung hat. Das Omentum von Patienten mit PM wies im Vergleich zum Gewebe von den Kontrollpatienten einen signifikant erhöhten CXCL12 Spiegel auf ($p = 0,003$), ebenso wie es bei Kolonkarzinompatienten ohne PM ($p = 0,0001$) der Fall war.

Somit war der Spiegel der tumorfördernden Chemokine im Omentum von Kolonkarzinom- und PM-Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe durchweg erhöht. Wohingegen es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Gewebe von Patienten mit PM und dem Patientengewebe mit Kolonkarzinom aber ohne PM gab.

- CCL19

Im Gegensatz zu den tumorfördernden Chemokinen sank das Level des tumorhemmenden Chemokin CCL19 im menschlichen Omentum bei Patienten mit Kolonkarzinom sowohl in Abwesenheit als auch bei Vorhandensein von PM deutlich. Im Vergleich zu Patienten mit PM ($p = 0,0001$) und Kolonkarzinompatienten ohne PM ($p = 0,001$) war die CCL19 Konzentration im Omentum von gesunden Patienten deutlich höher.

- VEGF-A

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Angiogenese, insbesondere in Geweben mit bösartigen Tumoren. Die MS werden von retroperitonealen Kapillaren versorgt, die einerseits die Immunzellen mit Nährstoffen versorgen und andererseits bei einer peritonealen Entzündung Immunzellen aus der Peritonealhöhle in die MS transportieren. Ob ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von PM im Gewebe und dem Wachstum von Blutgefäßendothelien (VEGF-A) besteht, soll ebenfalls mittels ELISA in den unterschiedlichen Gewebegruppen aufgezeigt werden. Wie aus Abbildung 18 zu erkennen ist, bestand ein allmählicher Anstieg der VEGF-A-Konzentration im menschlichen Omentalgewebe während des Fortschreitens von PM. Bei Kolonkarzinompatienten mit PM war VEGF-A

signifikant erhöht gegenüber dem Kontrollgewebe ($p = 0,0001$). Ebenso war das Level von VEGF-A bei Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM signifikant größer als im Kontrollgewebe ($p = 0,0001$).

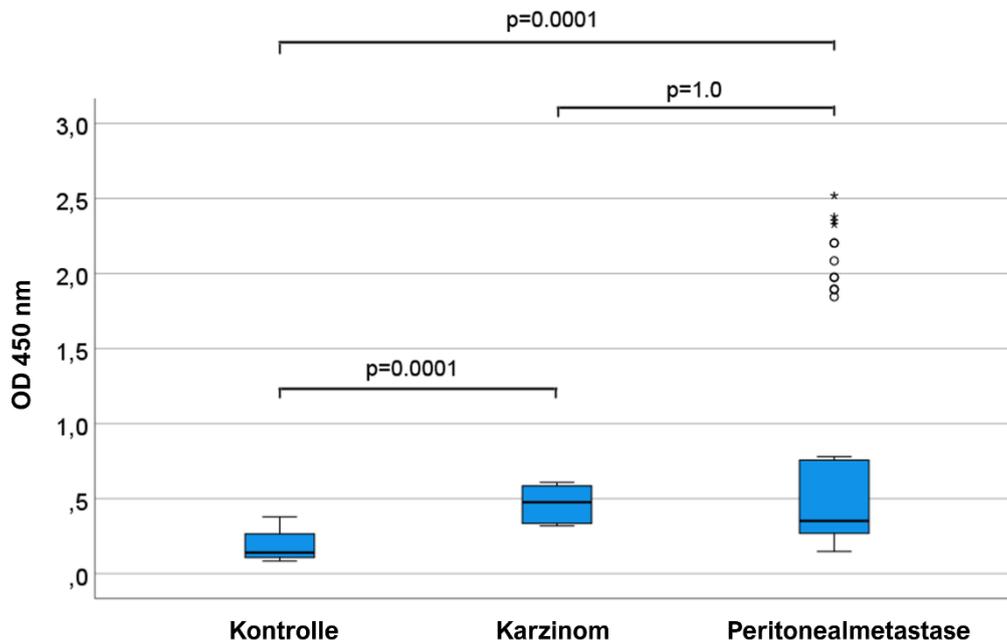


Abbildung 18: Durch ELISA ermittelte VEGF-A-Konzentration im Omentum in den drei untersuchten Gewebegruppen

3.5 Korrelation zwischen Chemokinen und Immunzellen

Mittels einer Heatmap wurde die Korrelation der untersuchten Chemokine sowie Immunzellen im menschlichen Omentum visualisiert (Abbildung 19). Hierbei sind die negativen Korrelationen in der Heatmap in Schwarz abgebildet. Die Populationen, die positiv korrelieren, sind in Gelb/Orange dargestellt. Je dunkler oder heller sich eine Farbe darstellt, desto stärker ist die Korrelation. Die maximale Korrelation wird mit 1,0 benotet, eine fehlende Korrelation mit 0.

➤ Positive Korrelationen

Die Analyse ergab eine starke positive Korrelation zwischen dem Chemokin CCL2 und dem Marker CD25 (0,70). Darüber hinaus zeigte der Marker CD25 ein

positives Verhältnis zu dem Chemokin CCL22 (0,48), ebenso wie zum Chemokin CXCL12 (0,60) und dem Wachstumsfaktor VEGF-A (0,68). Weiterhin zeigten auch der Wachstumsfaktor VEGF-A und das Chemokin CXCL12 eine positive Korrelation (0.55).

➤ Negative Korrelationen

Hingegen gehörte zu den Populationen mit einer negativen Beziehung das Chemokin CCL19 und die mit CD80 markierten Zellen (-0,65) sowie das Chemokin CCL2 und die mit CD163 markierten Zellen (-0,34).

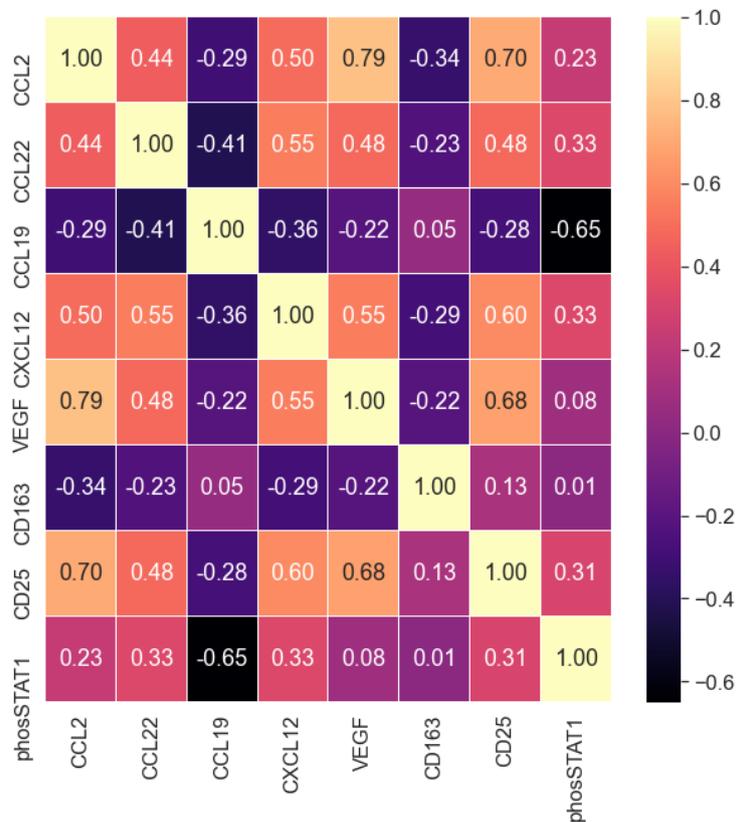


Abbildung 19: Heatmap für die Korrelation zwischen den verschiedenen untersuchten Chemokinen und Immunzellen

Die Farbe jeder Zelle stellt die Stärke und Richtung der Korrelation dar, wobei dunklere Farben eine negative Korrelation aufzeigen und hellere Farben eine positive Korrelation

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die MS-Subpopulationen sowie die Verteilung der Immunzellen und die damit verbundenen Chemokinlevel im Omentalgewebe in verschiedenen Stadien der Tumorprogression zu gewinnen, in der Hoffnung, den Weg für neue Ansätze in der Immuntherapie von PM zu ebnen.

➤ **Stand der Wissenschaft**

Bei den MS handelt es sich bekannterweise um mikroskopisch kleine sekundäre lymphatische Strukturen, die unmittelbar unterhalb der Mesothelzellschicht sitzen (Mironov et al., 1979) und sich am Eingang von sogenannten lymphatischen Stomata befinden. Diese sind kleine Fenestrations, die die schnelle Aufnahme von Zellen, Partikeln und der Peritonealflüssigkeit aus der Bauchhöhle in die MS ermöglichen (Shimotsuma et al., 1993, Wilkosz et al., 2005). Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der peritonealen Immunabwehr und der Entwicklung von Immuntoleranzen (Meza-Perez and Randall, 2017). Daten aus früheren Studien (Shimotsuma et al., 1991, Krist et al., 1995, Liu et al., 2015) zeigten, dass MS insbesondere aus Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Mastzellen bestehen. Diese Studien berichteten zudem über unterschiedliche zelluläre Zusammensetzungen der MS. Nach Shimotsuma et al., 1991 umfasste die Zusammensetzung der Immunzellen 67,9 % Makrophagen, 10,1 % B-Zellen und 10,2 % T-Zellen. Laut Liu et al., 2015 hingegen enthielten MS mehr Lymphozyten (46,1 %) als Makrophagen (12,4 %).

Mit ihrer starken angeborenen sowie adaptiven Immunität und ihrer idealen Lokalisation sind die MS die erste Verteidigungslinie gegen Tumorzellen, die in die Peritonealhöhle eingedrungen sind (Shimotsuma et al., 1993). Während des Voranschreitens der peritonealen Metastasierung kommt es jedoch zu einer Immuntoleranz der MS, was sogar dazu führen kann, dass sie das Tumorwachstum fördern (Krist et al., 1998, Gerber et al., 2006, Oosterling et al., 2006). Während die Zusammensetzung der MS bei einer Entzündung in Tiermodellen bereits aufgezeigt wurde (Van Vugt et al., 1996, Tsujimoto et al., 1996, Krist et al., 1998), blieben die Veränderungen dieser Zusammensetzung

im menschlichen Gewebe während der metastatischen Tumorprogression weitgehend unklar.

Die vorliegende Studie liefert den ersten experimentellen Beweis für die räumlichen und funktionellen Veränderungen der zellulären Subpopulationen im menschlichen Omentum während der peritonealen Metastasierung. Während der intraperitonealen Tumorprogression kommt es nicht nur zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellen im Omentum bzw. in den MS, sondern auch zur Expression verschiedener Chemokine. Diese Chemokine fungieren als interzelluläre Botenstoffe und rekrutieren Immunzellen aus der Peritonealhöhle und dem umgebenden Gewebe. Chemokine können damit einen erheblichen Einfluss auf die Entzündungsprozesse und die Tumorumgebung nehmen.

Dabei ist es davon abhängig, welche Art von Chemokinen vorzufinden sind. So können Chemokine durch die Rekrutierung verschiedener Immunzellen einerseits das Krebswachstum fördern, da sie mit den Tumorzellen interagieren und so die Tumordinvasion und das Krebswachstum fördern, andererseits aber auch das Tumorstadium hemmen, indem sie Immunzellen anlocken, die Krebszellen zerstören (Nagarsheth et al., 2017, Korbecki et al., 2020).

Bislang ist bezüglich des Omentums und den MS bekannt, dass das Chemokin CXCL13, das für die Rekrutierung von B-Zellen verantwortlich ist, in omentalen MS exprimiert wird (Ansel et al., 2002). Darüber hinaus berichteten einige Autoren, dass auch die Chemokine CXCL12 und VEGF im Omentum nachzuweisen sind (Zhang et al., 1997, Abe et al., 2009, Saqib et al., 2010). Jedoch wurde keine vergleichbare Studie gefunden, die das Level von verschiedenen Chemokinen im menschlichen Omentum auf die Progression von PM beleuchtet hat. Im Weiteren wurden die Zusammensetzung der Immunzellen und die mit ihnen verbundenen Chemokine im Omentum von gesunden Patienten, Kolonkarzinompatienten ohne PM und Kolonkarzinompatienten mit PM noch nicht im Detail untersucht.

➤ **Methodologische Herausforderungen**

Die Charakterisierung der zellulären Subpopulationen der MS im Omentum ist äußerst schwierig, da diese mit dem bloßen Auge nicht zu erkennen sind. Um MS vor der immunhistochemischen Analyse sichtbar zu machen, standen im Vorfeld präanalytische Methoden der Probenvorbereitung zur Verfügung, wohingegen es keine Standardprotokolle gab, die bei der Isolierung von Immunzellen aus dem Omentum für die durchflusszytometrischen Messungen ohne spezielle Geräte auskam. Zudem wurde ein Protokoll entwickelt, das es ermöglicht, wässrige Lösungen aus dem stark lipophilen Omentalgewebe zu generieren, um Chemokine mittels ELISA messen zu können. Um mehrere Marker gleichzeitig in einem einzigen Gewebestück sichtbar zu machen, wurde außerdem die Methode der Multiplex-Immunfluoreszenzmikroskopie (MacSima) eingesetzt.

➤ **Immunzellpopulationen im Omentum während der Tumorprogression**

Die Auswertung der IHC-Objektträger von MS zeigte, dass die Zellzahl und Größe von MS mit dem Fortschreiten der Erkrankung zunahm. Insbesondere das Gewebe von Patienten, die an Kolonkarzinom mit PM erkrankt waren, wies sowohl eine signifikant erhöhte MS-Größe als auch eine erhöhte Immunzellzahl auf. Was die zelluläre Zusammensetzung der MS betraf, so waren Makrophagen und T-Lymphozyten im Krebsgewebe mit und ohne PM häufiger vorhanden als in MS von gesundem Gewebe. Insbesondere bei der Betrachtung der Makrophagen-Subpopulationen innerhalb der MS waren die CD163⁺-Zellen (M2-Makrophagen) am häufigsten vertreten. Die phosSTAT1⁺-Zellanzahl (M1-Makrophagen) war hingegen im PM-Gewebe innerhalb der MS niedriger als im Kolonkarzinomgewebe ohne PM und ähnlich hoch wie im Kontrollgewebe. Je weiter die Krankheit des Patienten fortgeschritten war, desto mehr konnte beobachtet werden, dass die Makrophagen nicht nur speziell innerhalb der MS lokalisiert waren, sondern sich immer mehr im Gewebe verteilt hatten. Dieser Effekt wird durch die Tatsache unterstützt, dass Makrophagen als erste Verteidigungslinie den Ausbruch von Entzündungsreaktionen unterbinden wollen

und damit häufiger am Reaktionsgeschehen zu finden sind (Fujiwara and Kobayashi, 2005). Durch die Besiedlung von Tumoren in den MS werden Makrophagen dazu veranlasst aus der Peritonealhöhle rekrutiert zu werden, weshalb die MS an Größe und Zellzahl anwachsen (Shimotsuma et al., 1992).

Betrachtet man das Omentum im Ganzen wies es insgesamt eine sehr geringe Population von CD25⁺-Zellen (0.2 %-1 %) auf. Diese waren überwiegend innerhalb der MS lokalisiert. Beurteilt man zusätzlich die Anzahl der CD25⁺-Zellen während des Fortschreitens der Peritonealmetastasierung, so zeigte sich, dass sie bezogen auf das ganze Gewebe im Verlauf deutlich anstiegen und im Omentalgewebe von PM-Patienten signifikant erhöht waren vs. dem Kontrollgewebe. Ebenso nahmen die CD163⁺-Zellen im Verlauf der Peritonealmetastasierung im gesamten untersuchten Gewebe zu und waren damit ebenfalls signifikant erhöht vs. dem Kontrollgewebe. Die phosSTAT1⁺-Zellen hingegen waren am häufigsten im Gewebe von Kolonkarzinompatienten vertreten.

Die Charakterisierung von Immunzellen im menschlichen Omentum mittels FACS ergab, dass die Zahl aller Zellen, die im Omentalgewebe nachgewiesen werden konnten, bei PM-Patienten deutlich höher war als bei den Patienten, die an einem Kolonkarzinom als Primärtumor erkrankt waren und völlig Gesunder. Gleiches galt für die CD45⁺-Leukozyten im Omentum, die einen stetigen Anstieg der Zellzahl im Verlauf von gesundem Gewebe hin zu PM-Gewebe aufzeigten. Die Analyse der Subpopulationen ergab, dass die CD80⁺ M1-Makrophagen und CD163⁺ M2-Makrophagen ebenfalls im peritonealem Metastasengewebe vermehrt vorhanden waren. Betrachtet man die Lymphozyten aus allen CD45⁺-Leukozyten im Speziellen, konnte festgestellt werden, dass die CD4⁺ T-Zellen im Gewebe von Patienten mit PM vermehrt vorzufinden waren. Im Gegensatz dazu waren die CD4⁺CD25⁺-Zellen jedoch am meisten im Kontrollgewebe vertreten. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass in allen drei untersuchten Patienten-Gruppen insgesamt nur eine geringe Anzahl an Subpopulationen im Gewebe vorhanden waren (CD80⁺, M1-Makrophagen: 1 %-2 %; CD163⁺, M2-Makrophagen: 3 %-4 %; und CD4⁺CD25⁺, regulatorische T-Zellen: 1 %-3 %).

Beim Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse mit den FACS-Daten wurde deutlich, dass bei beiden Methoden nur wenige Zellsubpopulationen im gesamten Omentum zu finden waren (0,1 %- 5 %). Bei beiden Methoden kam man jedoch zur Schlussfolgerung, dass die höchste Anzahl an Zellen überwiegend im Gewebe von Patienten mit peritonealer Metastasierung nachzuweisen war. Dabei muss angemerkt werden, dass die FACS-Analyse ein genaueres Ergebnis hinsichtlich der regulatorischen T-Zellen zeigte, da diese hier als CD25⁺ und zusätzlich als CD4⁺ markiert wurden und somit genauer als regulatorische T-Zellen charakterisiert wurden. Weiterhin sollte für die Methoden in dieser Arbeit berücksichtigt werden, dass die verschiedenen Marker, die verwendet wurden, nicht nur eine spezifische Immunzelle markieren, sondern auch Koexpressionen aufweisen können. So ist es beispielsweise nicht vollständig korrekt bei dem Marker CD25 allein von regulatorischen T-Zellen zu sprechen.

➤ **Chemokine in der peritonealen Tumorprogression**

Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung verschiedener Immunzellen in der Tumorumgebung. Daher wurde in dieser Studie außerdem die im Omentum exprimierten Level verschiedener Chemokine analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse ließen erkennen, dass die Konzentrationen aller drei tumorfördernden Chemokine (CCL2, CCL22, CXCL12) im Zusammenhang mit dem Voranschreiten der Peritonealmetastasierung anstiegen. Im Gegensatz dazu nahm die Konzentration des tumorhemmenden Chemokins (CCL19) mit fortschreitender Metastasierung ab.

Da die Blutgefäßversorgungen eine wichtige Voraussetzung bei der Rekrutierung von Immunzellen aus der Peritonealhöhle spielen (Liu et al., 2016), wurde auch die Konzentration von VEGF-A untersucht, einem Wachstumsfaktor zur Regulierung der Angiogenese. Damit sollte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Zellzahl im Gewebe und einer verstärkten Bildung neuer Blutgefäße, vor allem im Gewebe von metastatisch erkranktem Gewebe hergestellt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass mit dem Vorhandensein von peritonealen Metastasen im Omentum die Zellzahl im Gewebe erhöht war,

ebenso wie das Level des Angiogenese fördernden Chemokins VEGF-A. Ein Grund hierfür kann die erhöhte Rekrutierung von Antikörpern und Immunzellen aus der Peritonealhöhle darstellen, um pathogene Prozesse, Entzündungen und tumoröse Prozesse besser bekämpfen zu können.

➤ **Zusammenspiel zwischen Immunzellen und Chemokinen während der peritonealen Tumorprogression**

Bei der Betrachtung des Zusammenspiels zwischen Chemokinen und Zellen konnte Folgendes festgestellt werden: Aus verschiedenen Literaturstellen ist bekannt, dass CCL2 erwiesenermaßen vorwiegend M2-Makrophagen anlockt, die mit tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) gleichzusetzen sind. Ihr Vorkommen im Gewebe ist mit einer schlechten Prognose verbunden, da sie die Immunantwort des Wirts unterdrücken und damit die Tumorprogression vorantreiben (Nagarsheth et al., 2017, Do et al., 2020).

Unsere Studie zeigte, dass sich die Infiltration von TAMs/M2-Makrophagen im Omentum im Vergleich zum Tumorgewebe vs. gesundem Gewebe wesentlich unterschieden. Sowohl die CCL2-Konzentration im Omentalgewebe als auch die Zahl der M2-Makrophagen nahmen zum einen in den MS als auch in der gesamten untersuchten Gewebefläche des Omentums im Verlauf der PM-Progression deutlich zu.

Regulatorische T-Zellen (Treg) werden als Reaktion auf das Chemokin CCL22 in die Tumorumgebung rekrutiert (Curiel et al., 2004). Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit anhand der entsprechend erstellten Heatmap (Abbildung 19) bestätigt werden. Die Wirkung von Tregs bei Tumorpatienten beruht auf einem immunsuppressiven Effekt, indem sie die adaptive Anti-Tumor-Antwort behindern (Ohue and Nishikawa, 2019). Somit können Tregs ebenfalls an der Tumorprogression beteiligt sein. Die Analyse der IHC zeigte, dass die Treg-Zellen im gesamten Gewebe von PM-Patienten ebenfalls erhöht waren. Mit der FACS-Analyse konnte hingegen im Kontrollgewebe am meisten Treg-Zellen nachgewiesen werden, gefolgt vom PM-Gewebe. Der hohe Nachweis an Treg-Zellen im Kontrollgewebe lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass nur ein gesundes Gewebe zur Messung zur Verfügung stand.

Eine hohe Konzentration des Chemokins CCL22 steht für ein schlechtes Behandlungsergebnis bei Patienten, die an verschiedenen Primärtumorentitäten erkrankt sind (Mougiakakos, 2011, Ohue and Nishikawa, 2019). Mittels ELISA konnte in dieser Arbeit eine höhere Konzentration vom Chemokin CCL22 vor allem in den Geweben von Patienten mit Kolonkarzinom ohne PM und ebenso, auch wenn etwas geringer, im Gewebe von Patienten mit PM nachgewiesen werden vs. dem Kontrollgewebe.

Laut der Studie von Xuan et al., 2015, veranlasst CCL19 spezifisch die Chemotaxis von M1-Makrophagen (Xuan et al., 2015). Diese Korrelation konnte auch in dieser Arbeit mit Hilfe der Heatmap (Abbildung 19) beobachtet werden. Laut Literatur führt CCL19 zu einer Verringerung des Tumorwachstums, da es den Tumor unterdrückt, indem es vor allem Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten und dendritische Zellen in die Mikroumgebung des Tumors rekrutiert (Lu et al., 2014). Im Prinzip sollte eine hohe CCL19-Konzentration im Gewebe eine bessere Prognose für Tumorpatienten bedeuten. Dieses konnte nicht verifiziert werden, da diese Arbeit nicht auf die prognostische Bedeutung der zellulären und Chemokinveränderungen ausgerichtet war.

Die IHC-Ergebnisse dieser Studie wiesen höhere Konzentrationen an pSTAT1⁺-Zellen (M1-Makrophagen) im Kolonkarzinomgewebe mit und ohne PM auf verglichen mit dem Kontrollgewebe. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die FACS-Analyse bestätigt. Auch hier kam es zu einer Zunahme von M1-Makrophagen (CD80⁺) im erkrankten Omentum. Das Chemokin-Level von CCL19 war jedoch im Gewebe von PM-Patienten am niedrigsten und am höchsten im gesunden Gewebe.

CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 sind dafür bekannt, dass sie Lymphozyten effizient aktivieren. Bei einigen Krebsarten, wie Brust- und Eierstockkrebs (Müller et al., 2001, Scotton et al., 2002), wurde berichtet, dass CXCL12 an der Tumormetastasierung beteiligt ist (Darash-Yahana et al., 2004). Laut Yasumoto et al., 2006, wurde bereits experimentell untersucht, dass CXCL12/CXCR4 die peritoneale Metastasierung von Magenkrebs beeinflusst (Yasumoto et al., 2006). Um einen Zusammenhang zwischen der Metastasierung von Kolonkarzinomen

und dem Omentum zu bestätigen, untersuchten wir die CXCL12-Konzentrationen in diesem Gewebe mittels ELISA. Allerdings muss beim Vergleich mit der Studie von Yasumoto berücksichtigt werden, dass der CXCL12-Spiegel von Patienten mit PM mittels ELISA in Aszites bestimmt wurde, während in dieser Studie die Chemokinkonzentration direkt aus dem Omentalgewebe von Patienten mit PM gemessen wurde. Die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten, dass auch das Level von CXCL12 während des Fortschreitens der peritonealen Metastasierung von Kolonkarzinomen ansteigt. Das CXCL12-Level war statistisch signifikant erhöht im Gewebe von PM-Patienten, verglichen mit gesundem Gewebe. Darüber hinaus vermittelt das Chemokin CXCL12 ebenfalls die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in die Tumormikroumgebung (Shimizu et al., 2009). Auch diese Korrelation konnte durch die Heatmap (Abbildung 19) validiert werden.

Eine zusätzliche Gefäßversorgung zur Deckung des Stoffwechselbedarfs spielt eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Krebszellen, da sie für das weitere Tumorwachstum notwendig ist. Frühere Studien (Bachelder et al., 2002, Kryczek et al., 2005) berichteten, dass CXCL12 mit dem VEGF-A synergistisch wirkt, was dazu beiträgt, die Tumorangio-genese zu fördern und daher für die Entwicklung von PM relevant ist. Ergebnisse unserer Studie legen dar, dass es eine synergistische Wirkung von CXCL12 und VEGF-A im Gewebe mit metastatischer Progression gibt, da beide im Peritonealmetastasegewebe überexprimiert waren. Dies wird auch durch die positive Korrelation zwischen CXCL12 und VEGFA in der Heatmap (Abbildung 19) belegt.

➤ **Der „peritoneale Switch“**

Die Kenntnis der Zellkonstellation im Tumormikromilieu ist für das Verständnis der Metastasierung von Kolonkarzinomen innerhalb der Bauchhöhle unerlässlich, denn die Immunzellkonstellation hat einen drastischen Einfluss auf den klinischen Outcome von Krebspatienten. Da bestimmte Chemokine und Zellen im Gewebe eine tumorfördernde Wirkung haben können, während andere den Tumor hemmen, kann, je nachdem, was im Gewebe am Ort der Metastasierung vermehrt vorhanden ist, das Tumormilieu auf unterschiedlichste

Art und Weise beeinflusst werden. Eine gezielte Manipulation der Chemokin- und Chemokinrezeptor-Signalwege kann somit den immunologischen Phänotyp eines Tumors direkt oder indirekt beeinflussen und damit die Wirksamkeit einer Immuntherapie erhöhen. Eine Studie von Sandhu belegte, dass durch die Blockade von CCL2 in der Peritonealhöhle die üblicherweise tumorfördernde Wirkung von CCL2 in eine vorläufige anti-tumorale Antwort umgewandelt werden konnte (Sandhu et al., 2013). Unsere Arbeit zeigt, dass sich die Zusammensetzung von Immunzellen und Chemokinen mit zunehmender Schwere der Erkrankung deutlich verändert. Es hat sich gezeigt, dass eine höhere Konzentration an Immunzellen und Chemokinen nachgewiesen werden kann, insbesondere in Gewebe von Patienten, die nicht nur an einem Primärtumor (Kolonkarzinom) erkrankt sind, sondern bereits PM entwickelt haben. Auch zeigen unsere Ergebnisse eine eindrückliche Erschöpfung des tumorfeindlichen intraperitonealen Milieus im Verlauf der metastatischen Progression. Im fortgeschrittenen Stadium der PM kann dieses Milieu die Tumorprogression durch den Aufbau einer zellulären und humoralen Immunsuppression sogar fördern.

➤ **Mögliche diagnostische und therapeutische Ansätze**

In unserer Studie wurden mehrere Immunzellen sowie Subtypen mit ihren korrelierenden Chemokinen im Omentum untersucht, die im Weiteren gezielt aktiviert oder gehemmt werden könnten. Basierend auf unseren Ergebnissen wäre die Möglichkeit gegeben, neue diagnostische und therapeutische Ansätze im Bereich der Immuntherapie zu finden.

Nach Prüfung und Bestätigung unserer Befunde in adäquat dimensionierten, prospektiven klinischen Studien könnte die Profilierung der intraperitonealen Zellpopulation und/oder der Chemokin-Expression als prognostische und prediktive Biomarker zur individualisierten Therapie von PM-Patienten angewandt werden. Insbesondere könnte ein sinnvoller Zeitpunkt für die Einleitung einer systemischen Immuntherapie bestimmt werden und die Antwort auf diese Immuntherapie objektiviert werden.

Therapeutisch könnte die Blockierung von tumorfördernden Chemokinen durch die Verwendung entsprechender Antagonisten dazu genutzt werden, um die Wirkung vorhandener krebshemmender Therapien bei PM synergistisch zu verbessern. Zum Beispiel sind Antagonisten für das Chemokin CXCL12 und seinen Rezeptor CXCR4 verfügbar, und deren Sicherheit und Wirksamkeit wurden in klinischen Studien bereits geprüft (Rubin et al., 2003, Liang et al., 2005). Ebenso konnte in anderen Studien in Bezug auf das Chemokin CCL2 mittels Verwendung eines entsprechenden Antagonisten eine hemmende Wirkung auf die Metastasierung und Angiogenese bei Brust- und Eierstockkrebs nachgewiesen werden (Qian et al., 2011, Bonapace et al., 2014). Diese Studien weisen allerdings auch darauf hin, dass eine Kombination dieser Antagonisten mit anderen Immuntherapien notwendig ist, um eine effektivere Wirkung zu erzielen (Fridlender et al., 2010, Bonapace et al., 2014).

In Zukunft könnten solche kombinierten therapeutischen Ansätze auch in der Peritonealhöhle eingesetzt werden, um PM effizienter zu bekämpfen. So könnte die Anti-Tumor-Immunantwort der Patienten selektiv und lokal optimiert werden.

➤ **Ausblick und zukünftige Forschungsansätze**

Diese Arbeit zeigt eindrücklich auf, dass das Omentum kein unbedeutendes abdominelles Organ ist, das ohne Bedenken reseziert werden kann, so wie es bisher häufig dargestellt wurde. Ganz im Gegenteil weist das Omentum wichtige Immunzellen und Chemokine auf, deren Präsenz und Bedeutung sich während der malignen Progression verändern. Die Immunfunktionen des Omentums und der MS sowie die Aktivitäten dieser Gewebe tragen dazu bei, die peritoneale Immunität zu regulieren.

Die Bekämpfung von PM durch die Regulierung lokaler Immunreaktionen könnte auf den neuen Erkenntnissen aufbauen, die von unserer Studie geliefert wurden. Es sind aber weitere Forschungen notwendig, die Aufschluss über das genauere Tumorumfeld innerhalb von PM erkranktem Gewebe geben. Dazu ist es sinnvoll diese Arbeit mit der Untersuchung weiterer Immunmarker und Chemokine zu ergänzen, um noch spezifischere Aussagen zu erhalten und die hier aufgeführten Tendenzen weiterhin zu bestätigen.

In Anbetracht der gewonnenen Kenntnisse über die Immunaktivitäten des Omentums sowie der MS ist es wahrscheinlich sinnvoll, auf Immunstrategien abzielen, die eine regionale Anti-Tumor-Antwort fördern. Insbesondere sollte überlegt werden, wie der Zeitpunkt der Umstellung der adaptiven peritonealen Immunantwort von Immunabwehr zur Immuntoleranz/ - Wachstumsförderung (das sog. „Peritonealswitch“) bestimmt werden kann. Auch sollten Wege untersucht werden, wie die Entwicklung der peritonealen Immuntoleranz verzögert oder sogar verhindert werden kann.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die nachfolgende Zusammenfassung ist weitestgehend dem publizierten Abstract „Characterization of human omental lymphatic system in health and cancer“ entnommen und ins Deutsche übersetzt worden (Graf et al., 2023).

Hintergrund: Das Omentum verfügt über einzigartige lymphatische Strukturen, die als Milky Spots (MS) bezeichnet werden. Dieses Gewebe ist für Immunprozesse äußerst attraktiv und zwar insbesondere im Hinblick auf Interaktionen mit der Bauchhöhle. MS sind die erste Verteidigungslinie in der frühen Phase der Peritonealmetastasierung (PM), bieten aber auch eine strukturelle und metabolische Grundlage für das Fortschreiten der PM. Aufgrund von Metastasierungsprozessen verändert sich die zelluläre Zusammensetzung des Omentums und die Expression verschiedener Chemokine, die als interzelluläre Botenstoffe fungieren. Diese Studie zielt darauf ab, neue Erkenntnisse über die MS-Subpopulationen, die Verteilung von Immunzellen und die damit verbundenen Chemokinspiegel im Omentum in verschiedenen Stadien der Tumorprogression zu charakterisieren und damit den Weg für neue Ansätze in der Immuntherapie bei PM zu eröffnen.

Methoden: Die Charakterisierung der zellulären Subpopulationen von MS im Omentum wurde mittels Immunhistochemie, Multiplex-Immunfluoreszenz (MacSima) und Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt, während die Chemokine im Omentum mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) analysiert wurden.

Ergebnisse: Die durchschnittliche Zellmenge bei MS erwies sich während des Fortschreitens der PM im Gewebe von PM-Patienten als außergewöhnlich hoch, wobei die Zellmenge, ebenso wie die Größe der MS, im Vergleich zum Gewebe mit Kolonkarzinom ohne PM und zum Kontrollgewebe deutlich erhöht war. Die IHC-, MacSima und FACS-Ergebnisse zeigten, dass bei allen Methoden nur wenige Zellsubpopulationen im gesamten Omentum gefunden werden konnten (0,1 %–5 %). Die höchste Anzahl an Immunzellen, darunter auch M1-, M2-

Makrophagen und regulatorischen T-Zellen wurde jedoch jeweils im Gewebe von kolorektalen PM-Patienten nachgewiesen. Die Ergebnisse der ELISA-Analyse machten deutlich, dass die Konzentrationen aller drei tumorfördernden Chemokine (CCL2, CCL22, CXCL12) mit dem Fortschreiten des Karzinoms und der PM anstiegen. Im Gegensatz dazu nahm die Konzentration des tumorhemmenden Chemokins (CCL19) mit fortschreitender PM ab. Zudem konnten Korrelationen zwischen bestimmten Immunzellen und Chemokinen bestätigt werden.

Schlussfolgerung: Nach unserem Kenntnisstand haben wir die Subpopulationen von MS-Immunzellen sowie die Verteilung dieser Immunzellen im Omentum mittels Immunhistochemie und FACS in menschlichen Omentalproben bei PM unterschiedlichen Ausmaßes zum ersten Mal beschrieben. Weiterhin wurden verschiedene Chemokine während der peritonealen Tumorprogression nachgewiesen, die die Immunzellen und damit die Tumorumgebung beeinflussen. Dies eröffnet ein neues Beobachtungsfenster zur Charakterisierung des peritonealen immunologischen Milieus bei Gesunden und bei tumorerkrankten Patienten.

5.2 Englische Zusammenfassung

The following summary is largely taken from the published abstract "Characterization of human omental lymphatic system in health and cancer" (Graf et al., 2023).

Background: The omentum has unique lymphatic structures called milky spots (MS), making this tissue extremely attractive for immune processes, especially in terms of interactions with the peritoneal cavity. MS are the first line of defense in the early phase of peritoneal metastasis (PM) but also provide a structural and metabolic basis for the progression of PM. Due to metastatic processes, the cellular composition of the omentum changes and the expression of various chemokines that function as intercellular messengers. This study aims to gain new knowledge about the MS subpopulations, the distribution of immune cells, and the related chemokine levels in the omentum at different stages of tumor progression, with the hope of paving the way for new approaches in immunotherapy of PM.

Methods: The characterization of cellular subpopulations of MS in the omentum was performed by immunohistochemistry, multiplex immunofluorescence (MacSima) and flow cytometry (FACS), whereas the chemokines in the omentum were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: The average cell amount in MS during the progression of PM proved to be exceptionally high in the tissue of PM patients, where the cell amount as well as the size of MS was significantly increased compared to the tissue with colon cancer without PM and the control tissue. The IHC, MacSima and FACS results showed only a few cell subpopulations found throughout the omentum by all methods (0.1%-5%). However, the highest number of immune cells, including M1-, M2-macrophages and regulatory T-cells, was detected in the tissue of colorectal PM patients in each case. The results of ELISA analysis indicated that the levels of all three tumor-promoting chemokines (CCL2, CCL22, CXCL12) increased with cancer progression and PM. In contrast, the tumor-inhibitory chemokine (CCL19) concentration decreased as PM progressed. In addition, correlations between certain immune cells and chemokines were confirmed.

CONCLUSION: To our knowledge, we characterized for the first time the immune cell subpopulations as well as the distribution of these immune cells in the omentum by immunohistochemistry and FACS in human omental samples in PM of varying degrees. Furthermore, various chemokines were detected during peritoneal tumor progression that influence immune cells and thus the tumor environment. This opens a new observational window for characterizing the peritoneal immunological space in healthy individuals and tumor patients.

6 Literaturverzeichnis

- ABE, H., INA, K., KITAMURA, H., SUMIYOSHI, H., TATSUKAWA, S., YOSHIOKA, H. & FUJIKURA, Y. 2009. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in milky spots of rats bearing ascitic-type hepatoma. *Anat Sci Int*, 84, 226-36.
- ANSEL, K. M., HARRIS, R. B. & CYSTER, J. G. 2002. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity*, 16, 67-76.
- AOYAGI, T., TERRACINA, K. P., RAZA, A. & TAKABE, K. 2014. Current treatment options for colon cancer peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol*, 20, 12493-500.
- ARJONA-SÁNCHEZ, A., MEDINA-FERNÁNDEZ, F. J., MUÑOZ-CASARES, F. C., CASADO-ADAM, A., SÁNCHEZ-HIDALGO, J. M. & RUFÍAN-PENA, S. 2014. Peritoneal metastases of colorectal origin treated by cytoreduction and HIPEC: An overview. *World J Gastrointest Oncol*, 6, 407-12.
- BACHELDER, R. E., WENDT, M. A. & MERCURIO, A. M. 2002. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*, 62, 7203-6.
- BALKWILL, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4, 540-50.
- BONAPACE, L., COISSIEUX, M. M., WYCKOFF, J., MERTZ, K. D., VARGA, Z., JUNT, T. & BENTIREN-ALJ, M. 2014. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature*, 515, 130-3.
- BOTIANU, P. V. H. 2019. Current indications for the intrathoracic transposition of the omentum. *J Cardiothorac Surg*, 14, 103.
- BRODY, H. 2015. Colorectal cancer. *Nature*, 521, S1.
- CURIEL, T. J., COUKOS, G., ZOU, L., ALVAREZ, X., CHENG, P., MOTTRAM, P., EVDEMON-HOGAN, M., CONEJO-GARCIA, J. R., ZHANG, L., BUROW, M., ZHU, Y., WEI, S., KRYCZEK, I., DANIEL, B., GORDON, A., MYERS, L., LACKNER, A., DISIS, M. L., KNUTSON, K. L., CHEN, L. & ZOU, W. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10, 942-9.
- DARASH-YAHANA, M., PIKARSKY, E., ABRAMOVITCH, R., ZEIRA, E., PAL, B., KARPLUS, R., BEIDER, K., AVNIEL, S., KASEM, S., GALUN, E. & PELED, A. 2004. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *Faseb j*, 18, 1240-2.
- DE LA FUENTE LÓPEZ, M., LANDSKRON, G., PARADA, D., DUBOIS-CAMACHO, K., SIMIAN, D., MARTINEZ, M., ROMERO, D., ROA, J. C., CHAHUÁN, I., GUTIÉRREZ, R., LOPEZ, K. F., ALVAREZ, K., KRONBERG, U., LÓPEZ, S., SANGUINETTI, A., MORENO, N., ABEDRAPO, M., GONZÁLEZ, M. J., QUERA, R. & HERMOSO, R. M. 2018. The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4

- with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumour Biol*, 40, 1010428318810059.
- DEMTRÖDER, C., SOLASS, W., ZIEREN, J., STRUMBERG, D., GIGER-PABST, U. & REYMOND, M. A. 2016. Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy with oxaliplatin in colorectal peritoneal metastasis. *Colorectal Dis*, 18, 364-71.
- DI CARO, G., CARVELLO, M., PESCE, S., ERRENI, M., MARCHESI, F., TODORIC, J., SACCHI, M., MONTORSI, M., ALLAVENA, P. & SPINELLI, A. 2016. Circulating Inflammatory Mediators as Potential Prognostic Markers of Human Colorectal Cancer. *PLoS One*, 11, e0148186.
- DO, H. T. T., LEE, C. H. & CHO, J. 2020. Chemokines and their Receptors: Multifaceted Roles in Cancer Progression and Potential Value as Cancer Prognostic Markers. *Cancers (Basel)*, 12.
- ELIAS, D., BLOT, F., EL OTMANY, A., ANTOUN, S., LASSER, P., BOIGE, V., ROUGIER, P. & DUCREUX, M. 2001. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. *Cancer*, 92, 71-6.
- ELLEBÆK, S. B., GRAVERSEN, M., DETLEFSEN, S., LUNDELL, L., FRISTRUP, C. W., PFEIFFER, P. & MORTENSEN, M. B. 2020. Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC)-directed treatment of peritoneal metastasis in end-stage colo-rectal cancer patients. *Pleura Peritoneum*, 5, 20200109.
- ETZERODT, A., MOULIN, M., DOKTOR, T. K., DELFINI, M., MOSSADEGH-KELLER, N., BAJENOFF, M., SIEWEKE, M. H., MOESTRUP, S. K., AUPHAN-ANEZIN, N. & LAWRENCE, T. 2020. Tissue-resident macrophages in omentum promote metastatic spread of ovarian cancer. *J Exp Med*, 217.
- FANG, W. B., YAO, M., BRUMMER, G., ACEVEDO, D., ALHAKAMY, N., BERKLAND, C. & CHENG, N. 2016. Targeted gene silencing of CCL2 inhibits triple negative breast cancer progression by blocking cancer stem cell renewal and M2 macrophage recruitment. *Oncotarget*, 7, 49349-49367.
- FRANKO, J., IBRAHIM, Z., GUSANI, N. J., HOLTZMAN, M. P., BARTLETT, D. L. & ZEH, H. J., 3RD 2010. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion versus systemic chemotherapy alone for colorectal peritoneal carcinomatosis. *Cancer*, 116, 3756-62.
- FRIDLENDER, Z. G., BUCHLIS, G., KAPOOR, V., CHENG, G., SUN, J., SINGHAL, S., CRISANTI, M. C., WANG, L. C., HEITJAN, D., SNYDER, L. A. & ALBELDA, S. M. 2010. CCL2 blockade augments cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 70, 109-18.
- FUJIWARA, N. & KOBAYASHI, K. 2005. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4, 281-6.
- GERBER, S. A., RYBALKO, V. Y., BIGELOW, C. E., LUGADE, A. A., FOSTER, T. H., FRELINGER, J. G. & LORD, E. M. 2006. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol*, 169, 1739-52.

- GESUNDHEITSINDUSTRIE BW. 2017. *Peritonealkarzinose – Überleben mit guter Lebensqualität* [Online]. Available: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/fachbeitrag/aktuell/peritonealkarzinose-ueberleben-mit-guter-lebensqualitaet/sendPdf/551553> [Accessed 10.02.2022].
- GOLDSMITH, H. S. 2014. Benefit of omental blood flow in Alzheimer's disease: effect on deteriorating neurons. *J Alzheimers Dis*, 42 Suppl 3, S277-80.
- GOLDSMITH, H. S., WU, W., ZHONG, J. & EDGAR, M. 2003. Omental transposition to the brain as a surgical method for treating Alzheimer's disease. *Neurol Res*, 25, 625-34.
- GRAF, C., WEINREICH, F. J., KÖNIGSRAINER, A., NADIRADZE, G., REYMOND, M. A. & SOLASS, W. 2023. ISSPP CONGRESS 2022 3RD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF PLEURA AND PERITONEUM. *Pleura Peritoneum*, 8, A1-a47.
- GRIFFITH, J. W., SOKOL, C. L. & LUSTER, A. D. 2014. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*, 32, 659-702.
- GRIFFITHS, R. W., ZEE, Y. K., EVANS, S., MITCHELL, C. L., KUMARAN, G. C., WELCH, R. S., JAYSON, G. C., CLAMP, A. R. & HASAN, J. 2011. Outcomes after multiple lines of chemotherapy for platinum-resistant epithelial cancers of the ovary, peritoneum, and fallopian tube. *Int J Gynecol Cancer*, 21, 58-65.
- GUERRERO, C., BERTHET, J. P. & GÓMEZ-CARO, A. 2021. Intrathoracic transposition of the omentum. *Multimed Man Cardiothorac Surg*, 2021.
- HAGIWARA, A., TAKAHASHI, T., SAWAI, K., TANIGUCHI, H., SHIMOTSUMA, M., OKANO, S., SAKAKURA, C., TSUJIMOTO, H., OSAKI, K., SASAKI, S. & ET AL. 1993. Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res*, 53, 687-92.
- HAO, N. B., LÜ, M. H., FAN, Y. H., CAO, Y. L., ZHANG, Z. R. & YANG, S. M. 2012. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*, 2012, 948098.
- HAVRLENTOVA, L., FAISTOVA, H., MAZUR, M., ZIAK, D. & POLAK, S. 2017. Comparative analysis of human omental milky spots between the patients with colon cancer and the control group. *Bratisl Lek Listy*, 118, 580-584.
- HOMEY, B., MÜLLER, A. & ZLOTNIK, A. 2002. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol*, 2, 175-84.
- ISAZA-RESTREPO, A., MARTIN-SAAVEDRA, J. S., VELEZ-LEAL, J. L., VARGAS-BARATO, F. & RIVEROS-DUEÑAS, R. 2018. The Peritoneum: Beyond the Tissue - A Review. *Front Physiol*, 9, 738.
- KORBECKI, J., KOJDER, K., SIMIŃSKA, D., BOHATYREWICZ, R., GUTOWSKA, I., CHLUBEK, D. & BARANOWSKA-BOSIACKA, I. 2020. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *Int J Mol Sci*, 21.
- KRIST, L. F., EESTERMANS, I. L., STEENBERGEN, J. J., HOEFSMIT, E. C., CUESTA, M. A., MEYER, S. & BEELEN, R. H. 1995. Cellular

- composition of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical and ultrastructural study. *Anat Rec*, 241, 163-74.
- KRIST, L. F., KERREMANS, M., BROEKHUIS-FLUITSMA, D. M., EESTERMANS, I. L., MEYER, S. & BEELEN, R. H. 1998. Milky spots in the greater omentum are predominant sites of local tumour cell proliferation and accumulation in the peritoneal cavity. *Cancer Immunol Immunother*, 47, 205-12.
- KRYCZEK, I., LANGE, A., MOTTRAM, P., ALVAREZ, X., CHENG, P., HOGAN, M., MOONS, L., WEI, S., ZOU, L., MACHELON, V., EMILIE, D., TERRASSA, M., LACKNER, A., CURIEL, T. J., CARMELIET, P. & ZOU, W. 2005. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res*, 65, 465-72.
- LEENAARS, M. & HENDRIKSEN, C. F. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Har j*, 46, 269-79.
- LEMOINE, L., SUGARBAKER, P. & VAN DER SPEETEN, K. 2016. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World J Gastroenterol*, 22, 7692-707.
- LI, C., JIANG, P., WEI, S., XU, X. & WANG, J. 2020. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer*, 19, 116.
- LIANG, Z., YOON, Y., VOTAW, J., GOODMAN, M. M., WILLIAMS, L. & SHIM, H. 2005. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 65, 967-71.
- LIU, J., GENG, X. & LI, Y. 2016. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol*, 37, 5715-26.
- LIU, J. Y., YUAN, J. P., GENG, X. F., QU, A. P. & LI, Y. 2015. Morphological study and comprehensive cellular constituents of milky spots in the human omentum. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 12877-84.
- LIU, M., SILVA-SANCHEZ, A., RANDALL, T. D. & MEZA-PEREZ, S. 2021. Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. *J Leukoc Biol*, 109, 717-729.
- LU, J., ZHAO, J., FENG, H., WANG, P., ZHANG, Z., ZONG, Y., MA, J., ZHENG, M. & LU, A. 2014. Antitumor efficacy of CC motif chemokine ligand 19 in colorectal cancer. *Dig Dis Sci*, 59, 2153-62.
- MAIWALD, G., MÜLLER, C., FÜRST, H., ARBOGAST, S. & BAUMEISTER, R. G. 1999. [Use of pedicled greater omentum-plasty as thoraco-abdominal defect repair following extensive tumor resection]. *Chirurg*, 70, 566-70.
- MANTOVANI, A. & SICA, A. 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*, 22, 231-7.
- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P. & SICA, A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23, 549-55.
- MARTINEZ, F. O., HELMING, L. & GORDON, S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, 27, 451-83.

- MEZA-PEREZ, S. & RANDALL, T. D. 2017. Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol*, 38, 526-536.
- MICHAILOVA, K. N. & USUNOFF, K. G. 2006. Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 183, i-vii, 1-144, back cover.
- MILLER, M. C. & MAYO, K. H. 2017. Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci*, 18.
- MIRONOV, V. A., GUSEV, S. A. & BARADI, A. F. 1979. Mesothelial stomata overlying omental milky spots: scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res*, 201, 327-30.
- MORISON, R. 1906. Remarks ON SOME FUNCTIONS OF THE OMENTUM. *Br Med J*, 1, 76-8.
- MOSER, B. & LOETSCHER, P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, 2, 123-8.
- MOSER, B., WOLF, M., WALZ, A. & LOETSCHER, P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25, 75-84.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.
- MOUGIAKAKOS, D. 2011. Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance. *Cancers (Basel)*, 3, 1708-31.
- MÜLLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MCCLANAHAN, T., MURPHY, E., YUAN, W., WAGNER, S. N., BARRERA, J. L., MOHAR, A., VERÁSTEGUI, E. & ZLOTNIK, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-6.
- MURPHY, P. M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I. F., HÉBERT, C. A., HORUK, R., MATSUSHIMA, K., MILLER, L. H., OPPENHEIM, J. J. & POWER, C. A. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 145-76.
- NAGARSHETH, N., WICHA, M. S. & ZOU, W. 2017. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 17, 559-572.
- OHUE, Y. & NISHIKAWA, H. 2019. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*, 110, 2080-2089.
- OOSTERLING, S. J., VAN DER BIJ, G. J., BÖGELS, M., VAN DER SIJP, J. R., BEELEN, R. H., MEIJER, S. & VAN EGMOND, M. 2006. Insufficient ability of omental milky spots to prevent peritoneal tumor outgrowth supports omentectomy in minimal residual disease. *Cancer Immunol Immunother*, 55, 1043-51.
- PAŃCZEK, S., ŁUKASZEWICZ-ZAJĄC, M. & MROCZKO, B. 2020. Chemokines- What Is Their Role in Colorectal Cancer? *Cancer Control*, 27, 1073274820903384.
- PALOMINO, D. C. & MARTI, L. C. 2015. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo)*, 13, 469-73.
- PAN, Y., YU, Y., WANG, X. & ZHANG, T. 2020. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol*, 11, 583084.

- PISO, P. & ARNOLD, D. 2011. Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer. *Dtsch Arztebl Int*, 108, 802-8.
- PLATELL, C., COOPER, D., PAPADIMITRIOU, J. M. & HALL, J. C. 2000. The omentum. *World J Gastroenterol*, 6, 169-176.
- QIAN, B. Z., LI, J., ZHANG, H., KITAMURA, T., ZHANG, J., CAMPION, L. R., KAISER, E. A., SNYDER, L. A. & POLLARD, J. W. 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 475, 222-5.
- QUÉNET, F., ELIAS, D., ROCA, L., GOÉRE, D., GHOUTI, L., POCARD, M., FACY, O., ARVIEUX, C., LORIMIER, G., PEZET, D., MARCHAL, F., LOI, V., MEEUS, P., JUZYNA, B., DE FORGES, H., PAINEAU, J. & GLEHEN, O. 2021. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus cytoreductive surgery alone for colorectal peritoneal metastases (PRODIGE 7): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 22, 256-266.
- RAMAN, D., SOBOLIK-DELMARE, T. & RICHMOND, A. 2011. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res*, 317, 575-89.
- RECKLINGHAUSEN, F. D. V. 1863. *Ueber Eiter- und Bindegewebskörperchen*.
- REYMOND, M. A., HU, B., GARCIA, A., RECK, T., KÖCKERLING, F., HESS, J. & MOREL, P. 2000. Feasibility of therapeutic pneumoperitoneum in a large animal model using a microvaporisator. *Surg Endosc*, 14, 51-5.
- RUBIN, J. B., KUNG, A. L., KLEIN, R. S., CHAN, J. A., SUN, Y., SCHMIDT, K., KIERAN, M. W., LUSTER, A. D. & SEGAL, R. A. 2003. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13513-8.
- SANDHU, S. K., PAPADOPOULOS, K., FONG, P. C., PATNAIK, A., MESSIOU, C., OLMOS, D., WANG, G., TROMP, B. J., PUCHALSKI, T. A., BALKWILL, F., BERNS, B., SEETHARAM, S., DE BONO, J. S. & TOLCHER, A. W. 2013. A first-in-human, first-in-class, phase I study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71, 1041-50.
- SAQIB, N. U., MCGUIRE, P. G. & HOWDIESHELL, T. R. 2010. The omentum is a site of stromal cell-derived factor 1alpha production and reservoir for CXC chemokine receptor 4-positive cell recruitment. *Am J Surg*, 200, 276-82.
- SCHURINK, B., CLEYPOL, C. G. J. & BLEYS, R. 2019. A rapid and simple method for visualizing milky spots in large fixed tissue samples of the human greater omentum. *Biotech Histochem*, 94, 429-434.
- SCOTTON, C. J., WILSON, J. L., SCOTT, K., STAMP, G., WILBANKS, G. D., FRICKER, S., BRIDGER, G. & BALKWILL, F. R. 2002. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 62, 5930-8.
- SEIFERT, E. 1921. Zur Biologie des menschlichen grossen Netzes. *Arch. Klin. Circ.*, 116, 510-517.
- SHANKLE, W. R., HARA, J., BJORNSEN, L., GADE, G. F., LEPORT, P. C., ALI, M. B., KIM, J., RAIMO, M., REYES, L., AMEN, D., RUDY, L. &

- O'HEANY, T. 2008. Omentum transposition surgery for patients with Alzheimer's disease: a case series. *Neurol Res*, 30, 313-25.
- SHIMIZU, Y., DOBASHI, K., IMAI, H., SUNAGA, N., ONO, A., SANO, T., HIKINO, T., SHIMIZU, K., TANAKA, S., ISHIZUKA, T., UTSUGI, M. & MORI, M. 2009. CXCR4+FOXP3+CD25+ lymphocytes accumulate in CXCL12-expressing malignant pleural mesothelioma. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 22, 43-51.
- SHIMOTSUMA, M., SHIELDS, J. W., SIMPSON-MORGAN, M. W., SAKUYAMA, A., SHIRASU, M., HAGIWARA, A. & TAKAHASHI, T. 1993. Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity. *Lymphology*, 26, 90-101.
- SHIMOTSUMA, M., SIMPSON-MORGAN, M. W., TAKAHASHI, T. & HAGIWARA, A. 1992. Activation of omental milky spots and milky spot macrophages by intraperitoneal administration of a streptococcal preparation, OK-432. *Cancer Res*, 52, 5400-2.
- SHIMOTSUMA, M., TAKAHASHI, T., KAWATA, M. & DUX, K. 1991. Cellular subsets of the milky spots in the human greater omentum. *Cell Tissue Res*, 264, 599-601.
- SOLASS, W., HERBETTE, A., SCHWARZ, T., HETZEL, A., SUN, J. S., DUTREIX, M. & REYMOND, M. A. 2012. Therapeutic approach of human peritoneal carcinomatosis with Dbait in combination with capnoperitoneum: proof of concept. *Surg Endosc*, 26, 847-52.
- SOLASS, W., KERB, R., MÜRDTER, T., GIGER-PABST, U., STRUMBERG, D., TEMPFER, C., ZIEREN, J., SCHWAB, M. & REYMOND, M. A. 2014. Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy. *Ann Surg Oncol*, 21, 553-9.
- SOLINAS, G., GERMANO, G., MANTOVANI, A. & ALLAVENA, P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol*, 86, 1065-73.
- STRÖHLEIN, M. A., HEISS, M. M. & JAUCH, K. W. 2016. The current status of immunotherapy in peritoneal carcinomatosis. *Expert Rev Anticancer Ther*, 16, 1019-27.
- SUGARBAKER, P. H. 1995. Peritonectomy procedures. *Ann Surg*, 221, 29-42.
- SUN, X., CHENG, G., HAO, M., ZHENG, J., ZHOU, X., ZHANG, J., TAICHMAN, R. S., PIENTA, K. J. & WANG, J. 2010. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 709-22.
- TAMURA, R., TANAKA, T., YAMAMOTO, Y., AKASAKI, Y. & SASAKI, H. 2018. Dual role of macrophage in tumor immunity. *Immunotherapy*, 10, 899-909.
- THADI, A., KHALILI, M., MORANO, W. F., RICHARD, S. D., KATZ, S. C. & BOWNE, W. B. 2018. Early Investigations and Recent Advances in Intraperitoneal Immunotherapy for Peritoneal Metastasis. *Vaccines (Basel)*, 6.
- TRIPODO, C. 2019. Time for a "Plan B" in Peritoneal Metastatic Disease. *Cancer Res*, 79, 5-6.

- TSUJIMOTO, H., HAGIWARA, A., SHIMOTSUMA, M., SAKAKURA, C., OSAKI, K., SASAKI, S., OHYAMA, T., OHGAKI, M., IMANISHI, T., YAMAZAKI, J. & TAKAHASHI, T. 1996. Role of milky spots as selective implantation sites for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *J Cancer Res Clin Oncol*, 122, 590-5.
- TSUJIMOTO, H., TAKHASHI, T., HAGIWARA, A., SHIMOTSUMA, M., SAKAKURA, C., OSAKI, K., SASAKI, S., SHIRASU, M., SAKAKIBARA, T., OHYAMA, T. & ET AL. 1995. Site-specific implantation in the milky spots of malignant cells in peritoneal dissemination: immunohistochemical observation in mice inoculated intraperitoneally with bromodeoxyuridine-labelled cells. *Br J Cancer*, 71, 468-72.
- VAN GESTEL, Y. R., THOMASSEN, I., LEMMENS, V. E., PRUIJT, J. F., VAN HERK-SUKEL, M. P., RUTTEN, H. J., CREEMERS, G. J. & DE HINGH, I. H. 2014. Metachronous peritoneal carcinomatosis after curative treatment of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 40, 963-9.
- VAN OUDHEUSDEN, T. R., RAZENBERG, L. G., VAN GESTEL, Y. R., CREEMERS, G. J., LEMMENS, V. E. & DE HINGH, I. H. 2015. Systemic treatment of patients with metachronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Sci Rep*, 5, 18632.
- VAN VUGT, E., VAN RIJTHOVEN, E. A., KAMPERDIJK, E. W. & BEELEN, R. H. 1996. Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anat Rec*, 244, 235-45.
- VERWAAL, V. J., BRUIN, S., BOOT, H., VAN SLOOTEN, G. & VAN TINTEREN, H. 2008. 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 15, 2426-32.
- VERWAAL, V. J., VAN RUTH, S., DE BREE, E., VAN SLOOTHEN, G. W., VAN TINTEREN, H., BOOT, H. & ZOETMULDER, F. A. 2003. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21, 3737-43.
- VESELY, M. D., KERSHAW, M. H., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, 29, 235-71.
- WILKOSZ, S., IRELAND, G., KHWAJA, N., WALKER, M., BUTT, R., DE GIORGIO-MILLER, A. & HERRICK, S. E. 2005. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl)*, 209, 251-61.
- XUAN, W., QU, Q., ZHENG, B., XIONG, S. & FAN, G. H. 2015. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J Leukoc Biol*, 97, 61-9.
- YASUMOTO, K., KOIZUMI, K., KAWASHIMA, A., SAITOH, Y., ARITA, Y., SHINOHARA, K., MINAMI, T., NAKAYAMA, T., SAKURAI, H., TAKAHASHI, Y., YOSHIE, O. & SAIKI, I. 2006. Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res*, 66, 2181-7.

- YOKOYAMA, Y., HIRAKAWA, H., WANG, H. & MIZUNUMA, H. 2012. Is omentectomy mandatory in the operation for ovarian cancer? Preliminary results in a rat study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 164, 89-92.
- ZHANG, Q. X., MAGOVERN, C. J., MACK, C. A., BUDENBENDER, K. T., KO, W. & ROSENGART, T. K. 1997. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res*, 67, 147-54.
- ZHUO, C., WU, X., LI, J., HU, D., JIAN, J., CHEN, C., ZHENG, X. & YANG, C. 2018. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Biosci Rep*, 38.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12, 121-7.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die gesamte Arbeit wurde in der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Transplantationschirurgie (AVT) am UKT unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Alfred Königsreiner und unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Marc Reymond durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. med. Marc Reymond (Betreuer dieser Arbeit) und Frau Dr. med. Wiebke Solaß (Pathologin am pathologischen Institut Tübingen).

Sämtliche Versuche, die in den NCPP-Laboren ausgeführt wurden, sind nach eingehender Einarbeitung und Unterstützung durch den Laborleiter Herrn Dr. hum. biol. Jürgen Weinreich von mir durchgeführt worden. Die durchflusszytometrischen Messungen und Analysen wurden unter Mitwirkung von Simone Pöschel (FCF-Mitarbeiterin) in den Räumlichkeiten der FCF Tübingen erhoben. Für die Multifluoreszenz-Methode wurde das MacSima Gerät in der Abteilung der Kinderklinik verwendet, bei der die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Christian Seitz mir unterstützend zur Seite stand. Die immunhistochemischen Durchführungen erfolgten von mir unter Aufsicht von Frau Dr. med. Wiebke Solaß. Das Sammeln der humanen biologischen Proben geschah in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Schnellschnittlabors der CRONA-Klinik sowie den Chirurgen der AVT.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. med. Marc Reymond eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Tübingen, den

Caroline Christina Graf

8 Veröffentlichungen

Die Zusammenfassung dieser Arbeit wurde bereits im Rahmen des ISSPP Kongress 2022 in der folgenden wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht:

ISSPP 2022 POSTER OF DISTINCTION ABSTRACT 8.

Caroline Graf, Frank-Jürgen Weinreich, A. Königsrainer, G. Nadiradze, Marc A. Reymond, Wiebke Solass. Characterization of human omental lymphatic system in health and cancer. ISSPP CONGRESS 2022 3rd CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF PLEURA AND PERITONEUM. *Pleura and Peritoneum*, vol. 8, no. 1, 2023, pp. A1-A47. <https://doi.org/10.1515/pp-2023-0010>

9 Danksagung

Im Rahmen dieser Arbeit möchte ich mich recht herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Alfred Königsreiner bedanken, der es mir in seiner Abteilung für Allgemeine-, Viszeral- und Transplantationschirurgie ermöglicht hat, Einblicke in die Forschung der Peritonealmetastasen zu bekommen und ich im Rahmen dessen meine Dissertation schreiben durfte.

Ebenso gilt auch ein großer Dank meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Marc Reymond, der mich mit der Auswahl des Themas unterstützte und während seiner fachlichen Betreuung und Unterstützung mit Rat und Tat zur Seite stand. So ergab sich für mich während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit die einzigartige Möglichkeit Teil einer großartigen Arbeitsgruppe zu sein, in die ich mich aktiv einbringen konnte. Wir haben viel gemeinsam erlebt und konnten auch viel voneinander lernen. Vielen Dank für diese wunderbare gemeinsame und lehrreiche Zeit.

Einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit gebührt auch Herr Dr. hum. biol. Jürgen Weinreich durch seine tatkräftige Hilfe bei der praktischen Durchführung der Experimente. Mit seinen wissenschaftlichen und zielorientierten Lösungsansätzen brachte er diese Arbeit maßgeblich voran. Durch seine Geduld, Hilfsbereitschaft und sein Engagement verbrachten wir viele Stunden gemeinsam im Labor, in denen ich viel lernen konnte.

Einen großen Dank möchte ich auch allen aussprechen, die zur Fertigstellung dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere Frau Dr. med. Wiebke Solaß, die mich in den pathologischen Angelegenheiten mit zielgerichteten Lösungsvorschlägen umfangreich unterstützte und Simone Pöschel, die durch ihr großes Engagement zur Vollendung der Experimente beigetragen hat. Ich bedanke mich für diese ausgezeichnete Zusammenarbeit und die gemeinschaftliche Atmosphäre, die mir entgegengebracht wurde.

Ein besonderer Dank geht auch an Daria Beck, die mich seit Geburt auf meinem Lebensweg begleitet. Mit ihrer langjährigen pädagogischen Erfahrung konnte sie mir wertvolle Anregungen für die Ausgestaltung dieser Arbeit geben.

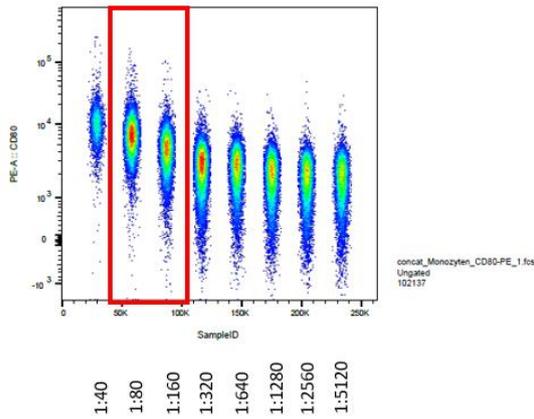
Auch ein spezieller Dank gilt meinen Eltern, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre. Durch ihre liebevolle Unterstützung bereits während des Studiums war mir das Verfassen einer solchen Arbeit überhaupt möglich. Ihre Geduld und ihr Beistand haben zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen. Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mir jederzeit zur Seite standen und wenn es mal schwierig wurde, mich mit den richtigen Worten wieder aufgemuntert haben.

Vielen herzlichen Dank.

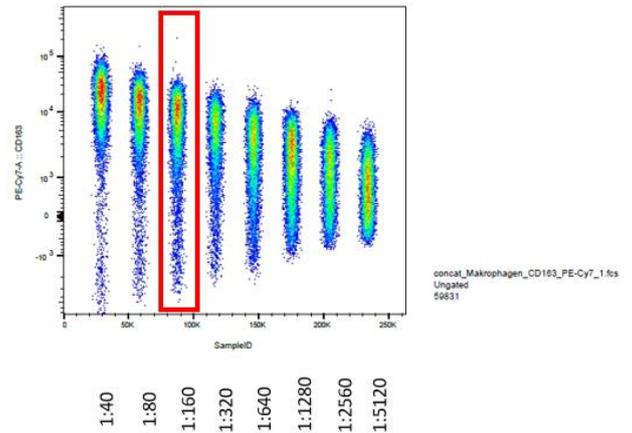
10 Anhang

1. Antikörpertitration Ergebnisse

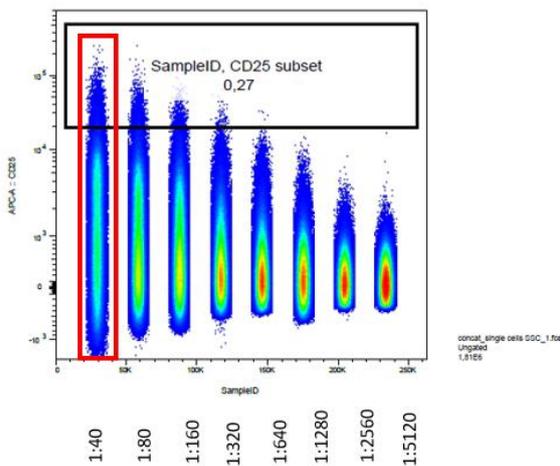
CD80-PE
ThermoFischer
2D10.4



CD163-Cy7
ThermoFischer
eBioGHI/61 (GHI/61)



CD25-APC
ThermoFischer
CD25-4E3



Zombie Aqua
BioLegend

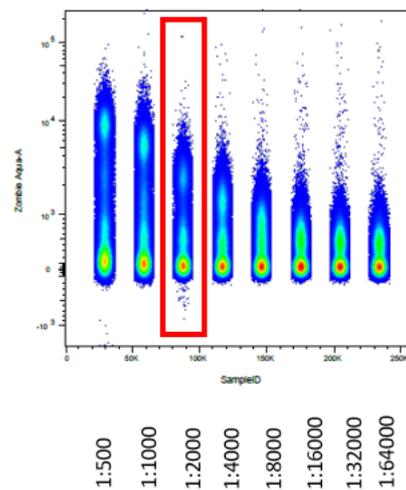


Abbildung 20: Verkettete („Concatenated“) Rohdaten der Antikörpertitrationen für die verschiedenen verwendeten Marker (CD80-PE, CD163-Cy7, CD25-APC, Zombie Aqua)