

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie und  
Endokrinologie  
(Prof. Dr. med. V. Ellenrieder)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

*In-vitro-* und *In-vivo*-Untersuchungen  
zum Gemcitabinmetabolismus von  
Makrophagen im Duktalen Adenokar-  
zinom des Pankreas

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Sören Matthias Buchholz**

aus Göttingen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. med. A. Neeße

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. med. A. Neeße

Ko-Referent: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

Drittreferent: Prof. Dr. med. M. Dobbstein

Datum der mündlichen Prüfung: 27.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*In-vitro-* und *In-vivo*-Untersuchungen zum Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen im Duktalen Adenokarzinom des Pankreas" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 27.12.2021

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Buchholz SM**, Patzak MS, Richards FM, Jodrell DI, Griesmann H, Michl P, Buchholz M, Ellenrieder V, Neesse A: Drug scavenging of TAMs in pancreatic cancer. Posterpräsentation im Rahmen des 38. Deutschen Pankreasclubs, Ulm, 25.01.-27.01.2018

**Buchholz SM**, Goetze RG, Singh SK, Ammer-Herrmenau C, Richards FM, Jodrell DI, Buchholz M, Michl P, Ellenrieder V, Hessmann E et al. (2020): Depletion of Macrophages Improves Therapeutic Response to Gemcitabine in Murine Pancreas Cancer. *Cancers* 12, 1978

**Buchholz SM**, Ramu I, Patzak MS, Goetze RG, Singh S, Richards FM, Jodrell DI, Sipos B, Michl P, Buchholz M et al.: Depletion of tumour associated macrophages rather than collagen improves therapeutic response in murine pancreas cancer, Vortrag im Rahmen des 40. Deutschen Pankreasclubs, Halle/Saale, 13.02.-15.02.2020

Goetze RG, **Buchholz SM**, Patil S, Petzold G, Ellenrieder V, Hessmann E, Neesse A (2018): Utilizing High Resolution Ultrasound to Monitor Tumor Onset and Growth in Genetically Engineered Pancreatic Cancer Models. *J Vis Exp* 134, e56979

Ramu I, **Buchholz SM**, Patzak MS, Goetze RG, Singh SK, Richards FM, Jodrell DI, Sipos B, Strobel P, Ellenrieder V et al. (2019): SPARC dependent collagen deposition and gemcitabine delivery in a genetically engineered mouse model of pancreas cancer. *EBioMedicine* 48, 161-168

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Diagnose und Therapie .....	1
1.1.3 Gemcitabin in der Therapie des Pankreaskarzinoms .....	3
1.2 Molekularbiologie des Pankreaskarzinoms .....	5
1.3 Das Tumorstroma im Pankreaskarzinom .....	8
1.4 Die Immunantwort auf das Pankreaskarzinom .....	10
1.4.1 Die allgemeine Immunantwort .....	10
1.4.2 Makrophagen im Pankreaskarzinom .....	11
1.5 Clodronat .....	13
1.6 Genetisch modifizierte Mausmodelle .....	14
1.6.1 Das KC-Mausmodell .....	15
1.6.2 Das KPC-Mausmodell .....	16
1.7 Ziel der Arbeit .....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Geräte .....	18
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	20
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	21
2.4 Puffer und Ansätze .....	24
2.5 Kits .....	26
2.6 Zytokine .....	26
2.7 Medikamente .....	27
2.8 Antikörper .....	27
2.9 TaqMan-Ansätze .....	28
2.10 Software und Internetadressen .....	28
2.11 Zelllinien .....	29
2.12 Molekularbiologische Methoden .....	30
2.12.1 Isolation von DNA aus Mausschwanzbiopsien .....	30
2.12.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	31
2.12.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.12.4 Isolation von RNA aus Zellen .....	32
2.12.5 Reverse Transkriptase-Reaktion .....	32
2.12.6 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	33
2.13 Zellbiologische Methoden .....	33

2.13.1	Kulturbedingungen.....	33
2.13.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	34
2.13.3	Mykoplasmentest .....	34
2.13.4	Polarisierung von humanen Makrophagen .....	35
2.13.5	Isolation und Differenzierung von murinen Makrophagen.....	35
2.13.6	Behandlung von Zellen mit Chemotherapeutika .....	36
2.13.7	Zellviabilitätsbestimmung durch Tetrazoliumsalz-Reduktion .....	38
2.14	Massenspektrometrische Methoden.....	38
2.14.1	Gemcitabinbehandlung von Zellen .....	39
2.14.2	Vorbereitung von Tumorproben.....	39
2.14.3	Qualitätssicherung und Kalibrierung .....	40
2.14.4	Massenspektrometrische Untersuchung.....	40
2.15	Tierexperimentelle Methoden .....	40
2.15.1	Zucht und Haltung .....	40
2.15.2	Sonografische Untersuchung.....	41
2.15.3	Intraperitoneale Medikamentengabe .....	42
2.15.4	Abbruchkriterien .....	45
2.15.5	Opferung und Präparation .....	46
2.16	Histologische und immunhistochemische Methoden .....	46
2.16.1	HE-Färbung.....	47
2.16.2	Immunhistochemie .....	47
2.16.3	Histologische Quantifizierung .....	48
2.17	Statistische Auswertung.....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1	Validierung der Polarisierung und Isolation von Makrophagen.....	50
3.2	Makrophagen speichern mehr Gemcitabin als Tumorzellen .....	52
3.3	Makrophagen senken das Ansprechen von Tumorzellen auf Gemcitabin in Versuchen mit konditioniertem Medium .....	54
3.4	Makrophagen verändern nicht das Ansprechen von Tumorzellen auf 5-FU und Paclitaxel.....	58
3.5	Auswirkungen der Depletion von TAM <i>in vivo</i> .....	61
3.5.1	Langfristige Gabe von liposomalem Clodronat induziert Aszites und erhöht die Mortalität im KC-Mausmodell.....	61
3.5.2	In KPC-Tumorgewebe kommt es zu einer Akkumulation von TAM .....	63
3.5.3	Liposomales Clodronat depletiert Makrophagen im KPC-Mausmodell.....	64
3.5.4	Klinische Auswirkungen der Depletion von Makrophagen im KPC-Mausmodell.....	66
3.5.5	Makrophagendepletion führt zu verstärkter Gemcitabin-induzierter Apoptose.....	68
3.5.6	Quantitative Bestimmung von Gemcitabinmetaboliten nach Clodronat-Therapie <i>in vivo</i> mittels LC-MS/MS .....	71

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
4.1	Chemotherapieresistenz im Pankreaskarzinom.....	73
4.1.1	Das <i>tumor microenvironment</i> als biophysikalische Barriere.....	73
4.1.2	Die Metabolisierung von Gemcitabin durch Zellen des <i>tumor microenvironment</i> .....	74
4.1.3	Makrophagen und Gemcitabinresistenz.....	75
4.2	Auswirkungen von Makrophagen auf die Gemcitabin-therapie <i>in vitro</i> .....	76
4.2.1	Stoffwechselprofil und LC-MS/MS-Untersuchungen von Makrophagen...	76
4.2.2	Versuche mit makrophagenkonditioniertem Medium.....	77
4.3	Makrophagendepletion und Gemcitabintherapie <i>in vivo</i> .....	81
4.3.1	Stärken und Limitationen der verwendeten Mausmodelle.....	81
4.3.2	Untersuchungen des Gemcitabinmetabolismus <i>in vivo</i> mittels LC-MS/MS	82
4.3.3	Klinische und Immunhistochemische Daten.....	83
4.4	Präklinische und klinische Makrophagendepletion als therapeutische Optionen beim Pankreaskarzinom.....	84
4.4.1	Makrophagendepletion mit liposomalem Clodronat.....	84
4.4.2	Alternative Ansätze zur Makrophagendepletion.....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

5-FU	5-Fluorouracil
ADM	Azinär duktale Metaplasie
AML	Akute myeloische Leukämie
ASI	<i>activated stroma index</i>
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BL/6	C57BL/6
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	<i>cancer associated fibroblast</i>
CC3	<i>cleaved caspase 3</i>
CCL	CC-Chemokinligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDA	Cytitindesaminase
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> / Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cre	<i>cause of recombination</i>
CSF-1	<i>colony-stimulating factor 1</i> / Koloniestimulierender Faktor 1
CSF-1R	CSF-1-Rezeptor
CT	Computertomografie
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dCK	Desoxycytidinkinase
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
dFdC	Difluorodeoxycytidin (Gemcitabin)
dFdCMP	Difluorodeoxycytidinmonophosphat
dFdCTP	Difluorodeoxycytidintriphosphat
dFdU	Difluorodeoxyuridin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECM	<i>extracellular matrix</i> / Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat



GTPase	GTP-Hydrolase
HE	Hämatoxylin&Eosin
hENT	Humaner equilibrativer Nukleosidtransporter
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenös
IC50	<i>half maximal inhibitory concentration</i> / Mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
KC	p48 <sup>+ / Cre</sup> ;LSL-Kras <sup>+ / G12D</sup>
KPC	Kras <sup>+ / G12D</sup> ;p53 <sup>+ / R172H</sup> ;Pdx- 1-Cre
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharide
LSL	Lox-STOP-Lox
MCN	<i>mucinous cystic neoplasm</i> / Muzinös zystische Neoplasien
MEM	<i>minimal essential medium</i>
miRNA	MicroRNA
MRC1	<i>mannose receptor 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> / Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
nab-Paclitaxel	<i>nanoparticle albumin-bound paclitaxel</i> / An Nanopartikel-Albumin gebundenes Paclitaxel
NSCLC	<i>non small cell lung carcinoma</i> / Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NT5C	5'3'-Nukleotidase
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PSC	<i>pancreatic stellate cell</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	<i>ribonucleid acid</i> / Ribonukleinsäure

---

rpm	<i>revolutions per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Insitute medium 1640</i>
SSH	Sonic-Hedgehog
TAM	Tumorassoziierte Makrophage
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS-Borat-Natriumchlorid
TBS-T	TBS-Tween
TE	TRIS-EDTA
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TP53	Tumor-Protein-p53
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western-Blot
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2016 erkrankten in Deutschland ungefähr 18.400 Menschen am duktalem Adenokarzinom des Pankreas (im Folgenden Pankreaskarzinom genannt). Das entspricht einer Inzidenz von 14,4 (Männer) bzw. 10,9 (Frauen) auf 100.000 Menschen pro Jahr (Robert-Koch-Institut 2019).

Für das Jahr 2020 werden 19.900 Neuerkrankungen in Deutschland prognostiziert. Dabei ist die Mortalität mit 18.052 Todesfällen 2016 fast ebenso groß wie die Inzidenz. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland bei 9%, was neben dem Mesotheliom der schlechteste Wert aller malignen Tumoren ist. Das ist unter anderem mit der meist späten Diagnosestellung und der Therapieresistenz zu erklären (Robert-Koch-Institut 2019). In den Vereinigten Staaten ist das Pankreaskarzinom mit 8,2% (Männer) und 6,8% (Frauen) für beide Geschlechter die vierthäufigste tödliche Neoplasie. Aktuelle Berechnungen prognostizieren, dass das Pankreaskarzinom bis 2030 weltweit die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache sein wird (Rahib et al. 2014). Das mittlere Alter bei Diagnose der Erkrankung liegt bei 72 – 76 Jahren (Robert-Koch-Institut 2019).

### 1.1.2 Diagnose und Therapie

Das Pankreaskarzinom zeigt zu Beginn häufig keine Symptome und äußert sich selbst im fortgeschrittenen Stadium meist durch unspezifische Beschwerden wie Bauchschmerzen, Müdigkeit, Fieber oder neu aufgetretenen Diabetes. Dadurch wird der Tumor oft erst im lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium entdeckt (Vincent et al. 2011). Die Diagnose früher Tumorstadien geschieht meist zufällig im Rahmen einer Computertomografie(CT)- oder Magnetresonanztomografie(MRT)-Untersuchung des Abdomens. Tumoren des Pankreaskopfes zeigen teilweise durch die Kompression der Gallenwege schon früher spezifische Symptome wie beispielsweise Ikterus oder Steatorrhoe (Porta et al. 2005). Bei dem klinischen Verdacht eines Pankreaskarzinoms wird die Diagnose meist mittels CT oder Sonografie gestellt (Kamisawa et al. 2016). Ein zuverlässiges Screening der Gesamtbevölkerung zur Vorsorge ist bisher nicht etabliert (Yeo 2015).

Die kurative Therapie ist bisher nur durch die vollständige Resektion des Tumors möglich. Jedoch kommt diese nur für die 15 – 20% der Patienten ohne Metastasen und einem lokal begrenzten Tumor in Frage (Konstantinidis et al. 2013). Nach der Resektion erfolgte in der Vergangenheit üblicherweise eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin (Oettle et al. 2007). In Studien konnte jedoch ein verlängertes Überleben bei Gabe von Gemcitabin mit der 5-Fluorouracil(5-FU)-Prodrug Capecitabin oder der Gabe nach modifiziertem FOLFIRINOX-Schema (Leucovorin, 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin) gezeigt werden (Conroy et al. 2018; Neoptolemos et al. 2017).

Aufgrund der frühen Metastasierung und der ausgeprägten Chemotherapieresistenz ist eine neoadjuvante Therapie vor allem bei grenzwertig resektablen Tumoren indiziert. Aktuell wird außerdem die NEONAX-Studie durchgeführt, die eine neoadjuvante Gabe von an Albumin gebundenem Paclitaxel (nab-Paclitaxel) und Gemcitabin bei resektablen Tumoren evaluiert (Ferrone et al. 2015; Murphy et al. 2018). Nur bei symptomatischen Metastasen, etwa in Knochen oder Gehirn, oder bei Lokalrezidiven nach kurativ intendierter Operation kann eine Strahlentherapie indiziert sein (Ducieux et al. 2015).

Ist eine vollständige Resektion aufgrund des fortgeschrittenen Tumorstadiums nicht mehr möglich, war lange Zeit die Gemcitabin-Monotherapie die einzige Erstlinientherapie zur palliativen Behandlung. Diese bot jedoch nur eine Verlängerung der medianen Lebensdauer um etwas mehr als einen Monat (Burriss et al. 1997; Neesse et al. 2015). Durch die Kombination mit nab-Paclitaxel konnte die Überlebensdauer von im Median 6,7 Monaten auf 8,5 Monate gesteigert werden (Von Hoff et al. 2013). Für Patienten in sehr gutem Allgemeinzustand ist zudem eine Therapie nach dem FOLFIRINOX-Schema geeignet. Doch auch hier bleibt die Prognose mit einem medianen Überleben von 11,1 Monaten schlecht (Conroy et al. 2011).

Mittlerweile werden erste Therapien eingesetzt, die gezielt Veränderungen einzelner Signalwege angreifen (Kaufman et al. 2015; Moore et al. 2007). Die Behandlung mit einer bestimmte Mutationen angreifenden Therapie verlängerte das mediane Überleben nach Diagnose der Erkrankung von 18,1 auf 31 Monate im Vergleich zur ungezielten Systemtherapie. Bei den hier untersuchten Studienteilnehmern trat jedoch nur bei 26% eine Mutation auf, die eine solche gezielte Therapie ermöglicht. Selbst bei Identifikation einer solchen Mutation wird aktuell nur ein

Bruchteil der Patienten mit einer geeigneten zielgerichteten Therapie behandelt (Pishvaian et al. 2020).

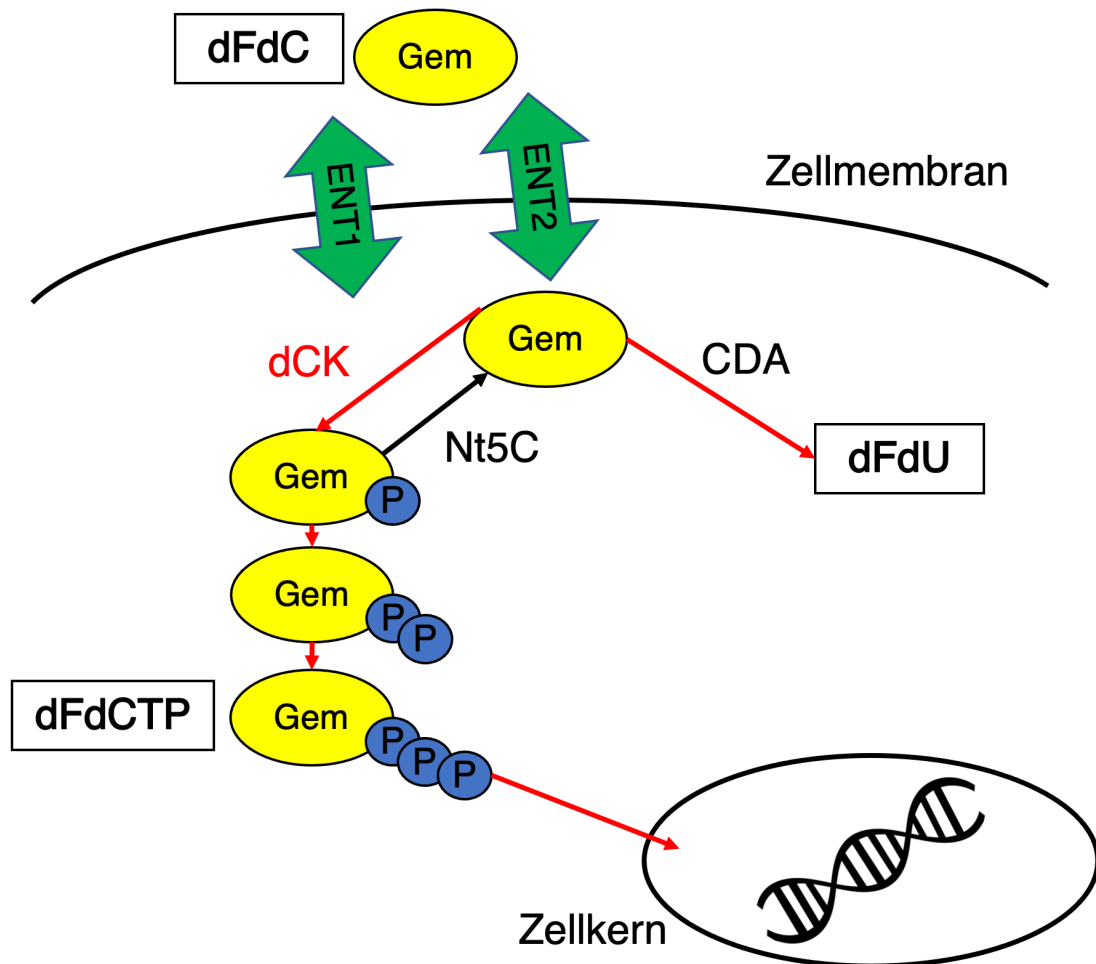
Für die Chemotherapieresistenz des Pankreaskarzinoms werden verschiedene Ursachen diskutiert. Es wird zwischen primärer und erworbener Resistenz unterschieden. Das Pankreaskarzinom hat in der Regel bereits eine starke primäre Therapieresistenz, sodass bereits die initial verabreichte Therapie nur ein unvollständiges Ansprechen zeigt (Oberstein und Olive 2013; Zeng et al. 2019). Als Hauptursachen werden die hohe genetische Variabilität des Pankreaskarzinoms sowie umfangreiche epigenetische und posttranskriptionelle Veränderungen diskutiert, die zu multiplen Resistenzmechanismen führen können (Amrutkar und Gladhaug 2017; Oberstein und Olive 2013). Ein weiterer wichtiger Faktor ist das *tumor microenvironment* (TME), welches zur Therapieresistenz beiträgt und später im Detail beschrieben wird.

### 1.1.3 Gemcitabin in der Therapie des Pankreaskarzinoms

Gemcitabin, auch Difluorodeoxycytidin (dFdC), ist ein Pyrimidinanalogon, bei dem die Wasserstoff-Atome am 2'-Kohlenstoff-Atom durch Fluor ersetzt wurden. Es ist hydrophil und wird vor allem über die humanen equilibrativen Nucleosidtransporter(hENT)1 und hENT2 in die Zelle transportiert, dort zunächst von Desoxycytidinkinase (dCK) und anschließend von der Cytidin-Uridin-Monophosphatkinase 1 (CMPK1) phosphoryliert, sodass es als Nucleotidanalogon Difluorodeoxycytidintriphosphat (dFdCTP) vorliegt. Nun kann es in den Zellkern gelangen und dort während der Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Replikation anstelle von Desoxycytidin in die DNA eingebaut werden. Dadurch wird die weitere DNA-Synthese inhibiert und es kommt zum Zelltod. Da Tumorzellen eine hohe Proliferationsrate haben, sind sie verglichen mit gesunden Zellen deutlich stärker von diesen Effekten betroffen. Intrazellulär kann Gemcitabin auch von der Cytitindesaminase (CDA) zu desaminiert und damit inaktiviert werden. Dies geschieht mit etwa 90% der inkorporierten Substanz (Alvarellos et al. 2014). Sobald Gemcitabin phosphoryliert ist, kann es die Zelle nicht mehr durch hENT1 und hENT2 verlassen (Hessmann et al. 2018). Es kann jedoch von zytosolischen 5'3'-Nucleotidasen (NT5Cs) dephosphoryliert werden (Alvarellos et al. 2014; Hessmann et al. 2018; Mini et al. 2006) (Abbildung 1).

Obwohl Gemcitabin im Vergleich zu anderen Zytostatika gut vertragen wird, gibt es starke systemische Nebenwirkungen. Die Substanz greift alle hochproliferativen Zellen und Gewebe an; insbesondere eine Knochenmarkschädigung kann zu Störungen der Hämatopoese führen und in Leukopenien, Anämien und Thrombopenien resultieren. Weiterhin leiden die Patienten unter anderem unter Haarausfall, Hautproblemen und Übelkeit (Burriss et al. 1997; Von Hoff et al. 2013).

Die Therapieresistenz des Pankreaskarzinoms betrifft auch Gemcitabin. Eine mögliche Ursache dafür ist die starke desmoplastische Reaktion der Pankreastumore und die daraus resultierende verminderte Durchblutung. Das zeigt sich unter anderem in dem guten Ansprechen von Gemcitabin in der Zellkultur verglichen mit schlechten Ergebnissen im Mausmodell und im Menschen (de Sousa Cavalcante und Monteiro 2014; Olive et al. 2009). Eine wichtige Rolle spielt auch die Expression der Gemcitabin metabolisierenden Enzyme im Pankreaskarzinom. Hier ist insbesondere die Korrelation von Therapieresistenz, niedriger hENT1-Expression und hoher dCK-Expression hervorzuheben (de Sousa Cavalcante und Monteiro 2014; Kroep et al. 2002; Sebastiani et al. 2006). Auch der Einfluss von nicht malignen Zellen des TME wie *cancer associated fibroblasts* (CAFs), Immunzellen und sogar die enzymatische Inaktivierung von Gemcitabin durch Bakterien scheinen eine Rolle zu spielen (Geller et al. 2017; Hessmann et al. 2018). Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) etwa schütten Pyrimidine aus, mit denen sie die Wirkung von Gemcitabin auf Pankreaskarzinomzellen reduzieren (Halbrook et al. 2019). Außerdem wurde gezeigt, dass Bakterien, z. B. *Escherichia coli* (*E. coli*) im Großteil der humanen Pankreaskarzinome nachweisbar sind und durch die Metabolisierung von Gemcitabin eine Auswirkung auf das Tumorstadium im Mausmodell haben (Geller et al. 2017). Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass CAFs Gemcitabin über die oben beschriebenen Transportproteine aufnehmen, phosphorylieren und so in der Zelle speichern. Dadurch ist ein Teil der Gemcitabinmoleküle im Tumor nicht mehr für Tumorzellen verfügbar (Hessmann et al. 2018) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Der Gemcitabinmetabolismus der Zelle:** Gemcitabin (dFdC) wird mittels der Transportproteine hENT1 und hENT2 in die Zelle aufgenommen. Dort wird es entweder mittels CDA zu Difluorodeoxyuridin (dFdU) desaminiert und somit inaktiviert oder durch dCK phosphoryliert. Das phosphorylierte Difluorodeoxycytidinmonophosphat (dFdCMP) kann die Zelle durch die beschriebenen Transportproteine nicht mehr verlassen. Es wird weiter bis zur aktiven Form dFdCTP phosphoryliert oder durch Dephosphorylierung in den Ausgangszustand zurückversetzt. Nur dFdCTP kann in die DNA eingefügt werden.

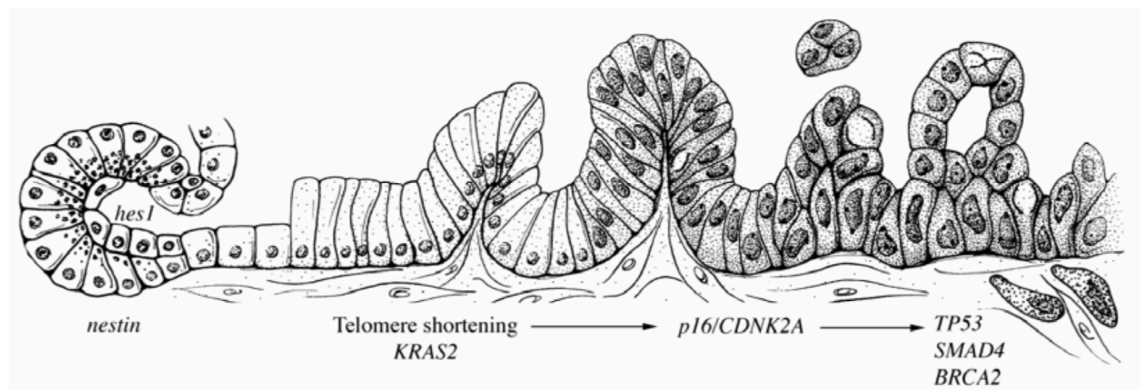
## 1.2 Molekularbiologie des Pankreaskarzinoms

Die Entwicklung des Pankreaskarzinoms läuft in mehreren Schritten ab. Die häufigsten Vorläuferläsionen bilden die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Diese gehen aus azinär-duktalem Metaplasien (ADM) hervor. Das im Gesunden kubische bis säulenartige Gangepithel ist bei PanIN-1-Läsionen hyperplastisch und flach (PanIN-1A) oder papillär (PanIN-1B) ausgebildet (Hruban et al. 2004). Bei PanIN-2-Läsionen zeigen sich erste Atypien in den Zellen, die Kerne sind pleomorph. Die PanIN-3 stellt bereits ein *carcinoma in situ* dar; die hochproliferativen Zellen sind hier deutlich stärker entdifferenziert (Abbildung

2). Während PanIN-1-Läsionen in ungefähr 40% der gesunden Pankreata gefunden werden, sind die höhergradigen Neoplasien im gesunden Gewebe nur selten beschrieben (Hruban et al. 2004; Hruban et al. 2008).

Eine weitere Gruppe von Vorläuferläsionen sind die selteneren intraduktal papillär muzinösen Neoplasien (IPMN). Diese bilden sich nicht an den kleinen Pankreasgängen, sondern an den Haupt- oder Nebengängen des Pankreas. Es wird zwischen dem IPMN-Adenom mit wenig Dysplasie und hoher Differenzierung, dem hochgradig entdifferenzierten IPMN-Karzinom als *carcinoma in situ* und dem *borderline*-IPMN als Zwischenform unterschieden (Hruban et al. 2004; Sessa et al. 1994).

Die dritte bekannte Vorläuferläsion des Pankreaskarzinoms sind die muzinös zystischen Neoplasien (MCN). Diese zystoiden Neubildungen enthalten Muzin oder Blutbestandteile und sind mit meist mit Säulenepithel ausgekleidet. Definitionsgemäß sind MCNs nicht invasiv; ein Drittel der detektierten MCNs sind allerdings mit einem invasiven Karzinom assoziiert (Hruban et al. 2004).



**Abbildung 2: Progression zum Pankreaskarzinom mit assoziierten Genen:** Die Entwicklung des Pankreaskarzinoms folgt definierten histomorphologischen Veränderungen, die mit molekularen Alterationen von entscheidenden Onkogenen und Tumorsuppressorgenen einhergehen (Hruban et al. 2008). Abbildung lizenziert nach CC BY-NC.

Das Pankreaskarzinom ist ein genetisch sehr heterogener Tumor, der sich über verschiedene Vorstufen entwickeln kann. Über 90% der Karzinome ist jedoch eine Mutation des Onkogens *Kirsten rat sarcoma virus* (*KRAS*) gemeinsam (Almoguera et al. 1988; Hruban et al. 1993; Waddell et al. 2015). Das *KRAS*-Gen kodiert für Proteine zur Regulation der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (Kranenburg 2005). Die häufigste Mutation von *KRAS* in diesem Zusammenhang ist der Austausch von Guanin durch Adenosin in Exon 1 des Co-



don 12 ( $KRAS^{G12D}$ ). Dadurch wird die Aktivität der intrinsischen Guanosin triphosphat-(GTP)-Hydrolase (GTPase) vermindert (Eser et al. 2014). Durch diese Hemmung wird die Interaktion von KRAS mit GTPase-aktivierenden Proteinen gestört, was zu einer konsekutiven Aktivierung der *Rat-Sarcoma*(RAS)-Proteinfamilie und zahlreichen davon abhängigen Signalwegen führt (Eser et al. 2014; Schneider und Schmid 2003). Mehrfach wurde im Mausmodell die Relevanz der *Kras*-Mutation für die Entstehung des Pankreaskarzinoms gezeigt, etwa durch Tiere mit *Kras*-Keimbahnmutation, die Pankreasmetaplasien und Tumoren ausbilden (Hingorani et al. 2003).

Etwa 75% der Pankreaskarzinome im Menschen zeigen eine Mutation im *Tumor-Protein-p53*( $TP53$ )-Gen (Olive et al. 2004). Dieses Gen kodiert für eine Gruppe von Proteinen, die physiologisch als Tumorsuppressor fungieren. Das geschieht unter anderem durch Aktivierung der DNA-Reparatur, Beeinflussung des Zellzyklus und Initiierung der Apoptose in Zellen mit beschädigtem Erbgut. Keimbahnmutationen von  $TP53$  führen zum Li-Fraumeni-Syndrom, einer autosomal-dominanten Erbkrankheit, die durch das frühe und multiple Auftreten von Krebs, etwa Rhabdomyosarkomen, Brustkrebs oder Leukämien charakterisiert ist (Olive et al. 2004). Die häufigste im humanen Pankreaskarzinom gefundene Mutation des Gens ist  $TP53^{R172H}$ , deren murine Form im Gen zusammen mit  $Kras^{G12D}$  zur Etablierung eines weiteren Mausmodelles für das Pankreaskarzinom verwendet wird. Diese Kombination führt regelhaft zur Entstehung von Pankreaskarzinomen, die spätestens nach einem Jahr zum Tod der Tiere führen (Hingorani et al. 2005).

Neben Mutationen von  $KRAS$  und  $TP53$  gehören Veränderungen von *mothers against decapentaplegic homolog 4* ( $SMAD4$ ) und *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* ( $CDKN2A$ ) zu den verbreitetsten onkogenen Mutationen (Bailey et al. 2016a; Collisson et al. 2011; Koorstra et al. 2008). Andere mutierte Gene wie *breast cancer 2* ( $BRCA2$ ) sind eher charakteristisch für die familiäre Form des Pankreaskarzinoms (Bailey et al. 2016a; Hingorani et al. 2005).

Neben diesen häufig anzutreffenden Genmutationen weisen Pankreaskarzinome eine hohe Variabilität genetischer Veränderungen auf, die jeweils nur in wenigen Fällen der Pankreaskarzinome mutiert, inaktiviert oder amplifiziert sind, und deren Funktion als *driver* oder *passenger* der Karzinogenese nicht immer offensichtlich ist. Auch spielen eine Vielzahl epigenetischer Veränderungen eine entscheidende Rolle bei der Fehlregulation zahlreicher Gene im Pankreaskarzinom

(Bailey et al. 2016b). Durch die hohe Heterogenität werden Subklassifizierungen notwendig, um individualisierte Therapien für einzelne Patienten zu entwerfen, die nur von bestimmten Therapien profitieren können (Pishvaian et al. 2020).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Modelle zur molekularen Stratifizierung des Pankreaskarzinoms und dessen Stroma entwickelt, die anhand von Ribonukleinsäure(RNA)-Expressionsprofilen verschiedene Subtypen der Tumorzellen und des Stromas charakterisieren. (Bailey et al. 2016a; Collisson et al. 2011; Moffitt et al. 2015). Kürzlich wurde durch Maurer und Kollegen ein Modell vorgestellt, das die zuvor etablierten Subtypen vergleicht, vereinfacht und harmonisiert. Darin werden die beiden epithelialen Subtypen "klassisch" und "basal" sowie die stromalen Subtypen "normal" und "aktiviert" unterschieden. Es zeigt sich für den basalen epithelialen Subtyp eine signifikant schlechtere Prognose verglichen mit dem klassisch epithelialen Subtyp. Beim Vergleich der beiden stromalen Subtypen zeigt sich, dass der normale, an *extracellular matrix* (ECM) reiche Subtyp tendenziell eine schlechtere Prognose hat, ein Unterschied, der jedoch nicht in allen überprüften Kohorten signifikant ist. Ein Zusammenhang zwischen der Expression der epithelialen und stromalen Subtypen konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden (Maurer et al. 2019).

Auf der anderen Seite gibt es auch Daten, die zeigen, dass humane Pankreaskarzinomzellen als Xenograft im Mausmodell in der Lage sind, sich mittels Rekrutierung muriner Zellen ein TME nachzubilden. Dies steht der These von voneinander unabhängigen Typen von epithelialen Tumorzellen und Stromazellen entgegen (Nicolle et al. 2017).

### 1.3 Das Tumorstroma im Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom gehört zu den stromareichsten Karzinomen. Die Aktivierung des Stromas wird schon durch Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms beobachtet (Aichler et al. 2012; Erkan et al. 2008; Eser et al. 2011). Über 90% der Tumormasse bestehen aus extrazellulärer Matrix, die mit aktivierten Fibroblasten, Gefäßen und Immunzellen durchsetzt ist (Neesse et al. 2015). Hier werden unter anderem Kollagen, Hyaluronsäure und Fibronectin gespeichert. Zudem werden lösliche Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und *connective tissue growth factor* (CTGF) ausgeschüttet (Feig et al. 2012). Diese als Desmoplasie bezeichnete Reaktion beeinflusst dabei wesentlich die Entwicklung des Karzinoms.

Bisher ist ungeklärt, ob das Stroma das Tumorstroma fördert oder hemmt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass das Tumorstroma den Tumor sowohl fördern, als auch hemmen kann. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Depletion von  $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA)-positiven Fibroblasten im Mausmodell zu deutlich aggressiveren Tumoren führt, höhere Mengen von ECM im Tumor korrelieren jedoch mit einem verkürzten Überleben (Ozdemir et al. 2014; Whatcott et al. 2015).

Auf der einen Seite sorgt die ausgeprägte extrazelluläre Matrix durch ein erschwertes Wachstum von Lymph- und Blutgefäßen für eine stärkere Therapieresistenz, da der Transport der Chemotherapeutika zu ihrem Ziel, den Tumorzellen, erheblich erschwert wird. Der Versuch, mittels pharmakologischer Inhibierung des Sonic-Hedgehog(SSH)-Signalweges das Stromawachstum zu hemmen und das Ansprechen von Gemcitabin zu erhöhen, zeigte in präklinischen Studien Erfolge, welche klinisch jedoch nicht reproduziert werden konnten (Catenacci et al. 2015; Kim et al. 2014; Olive et al. 2009). Im Mausmodell konnte anschließend gezeigt werden, dass eine Blockade des SSH-Signalweges zwar zu einer schwächeren Desmoplasie führt, jedoch in undifferenzierten und invasiven Tumoren resultiert (Rhim et al. 2014).

Außerdem sind eine erhöhte Gefäßproliferation und eine erhöhte VEGF-Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben im humanen Pankreaskarzinom assoziiert, erhöhte VEGF-Level auch mit erhöhter Metastasierungsrate (Ikeda et al. 1999; Seo et al. 2000). Die Hemmung der Angiogenese, etwa mit Bevacizumab, einem monoklonalen Anti-VEGF-A-Antikörper, erbrachte in Kombination mit Gemcitabin allerdings keinen therapeutischen Vorteil (Kindler et al. 2010). Ganz im Gegenteil sind Pankreaskarzinome, die Hypoxie ausgesetzt sind, aggressiver und metastasieren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit (Chang et al. 2011).

Neben der ausgeprägten extrazellulären Matrix spielen Fibroblasten, darunter auch *pancreatic stellate cells* (PSCs), eine wichtige Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung der desmoplastischen Reaktion im Pankreaskarzinom. Die Umwandlung von inaktiven, ruhenden PSCs in ihren aktiven, myofibroblastischen Status geschieht durch entzündliche oder neoplastische Stimuli (Apte et al. 2004; Bachem et al. 2005; Phillips et al. 2003). Die aktive Form steht im Zusammenhang mit der Überexpression von Kollagen und der Aktivierung von Tumorzellen (Apte et al. 2004; Bachem et al. 2005; Feig et al. 2012). PSCs fördern außerdem die Metastasierung des Tumors, indem sie mit den Tumorzellen migrieren

und in Organen wie der Leber eine Nische für die Tumorzellen schaffen (Xu et al. 2010).

Im Mausmodell konnte eine die Möglichkeit gezeigt werden, die tumorfördernden Eigenschaften der PSCs therapeutisch mit All-Trans-Retinsäure (ATRA) zu reprogrammieren und so die desmoplastische Reaktion zu begrenzen. Eine Phase-I-Studie zur Untersuchung der Verträglichkeit des Medikaments war erfolgreich. Eine Phase-IIb-Studie zur Evaluation der Wirkung ist in Planung (Froeling et al. 2011; Han et al. 2018; Kocher et al. 2020; Sherman et al. 2014).

Um eine Prognose anhand der histologisch messbaren Stromakomposition zu erlauben, wurde der *activated stroma index* (ASI) entwickelt. Dabei wird durch das Verhältnis von  $\alpha$ -SMA-positiven Fibroblasten und Kollagen die Aktivität des Stromas quantifiziert. Ein hoher ASI korreliert mit kürzerem Überleben (Erkan et al. 2008). Im *Kras<sup>+G12D</sup>;p53<sup>+R172H</sup>;Pdx-1-Cause-of-recombination(Cre)*(KPC)-Mausmodell konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression verschiedener stromaler Komponenten und dem Gesamtüberleben bei unbehandelten Mäusen gezeigt werden, auch eine Reproduktion des ASI war nicht möglich (Hasselluhn et al. 2020).

Im Rahmen der Tumorstratifizierung wurde in den letzten Jahren das Stroma auch auf molekularer Ebene klassifiziert. Anhand von Transkriptomanalysen wird zwischen aktivem und normalem Stroma differenziert (Maurer et al. 2019; Moffitt et al. 2015). Zusätzlich gibt es Ansätze einer Charakterisierung unter Einbeziehung des Auftretens von Immunzellen wie Makrophagen und regulatorischen T-(Treg-)Zellen (Knudsen et al. 2017). Diese Stratifizierung ist noch nicht Teil der klinischen Routine; durch neue immunmodulatorische Therapieansätze ist sie perspektivisch jedoch unumgänglich (Pishvaian et al. 2020). Insgesamt geraten Immunzellen als Teil des TME immer stärker in den Fokus der Forschung (Aglietta et al. 2014; Hessmann et al. 2020).

## 1.4 Die Immunantwort auf das Pankreaskarzinom

### 1.4.1 Die allgemeine Immunantwort

Immunzellen bilden die größte Subpopulation von Zellen im Tumorstroma des Pankreaskarzinoms und haben großen Einfluss auf die Karzinogenese (Elyada et al. 2019). Das komplexe Zusammenspiel von angeborenem und erworbenem Immunsystem erschwert aber auch hier eine klare Zuordnung von positiven und

negativen Effekten auf Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieresistenz (Clark et al. 2007; Elyada et al. 2019; Knudsen et al. 2017; Mielgo und Schmid 2013).

So ist die Tumordinfiltration durch zytotoxische *cluster of differentiation*(CD)8-positive T-Zellen prognostisch günstig, allerdings sind diese im Tumor oft inaktiv (Fukunaga et al. 2004; Neesse et al. 2019). Der Versuch, mittels Immuncheckpoint-Inhibition T-Zellen zu stimulieren ist Bestandteil zahlreicher neuer Therapieansätze. Während dies z. B. im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) bereits Teil des klinischen Alltags ist und für das Pankreaskarzinom präklinisch vielversprechende Ergebnisse zeigte, enttäuschten diese Therapien in den ersten durchgeführten klinischen Studien (Aglietta et al. 2014; Borghaei et al. 2015; Brahmer et al. 2012; Royal et al. 2010; Winograd et al. 2015).

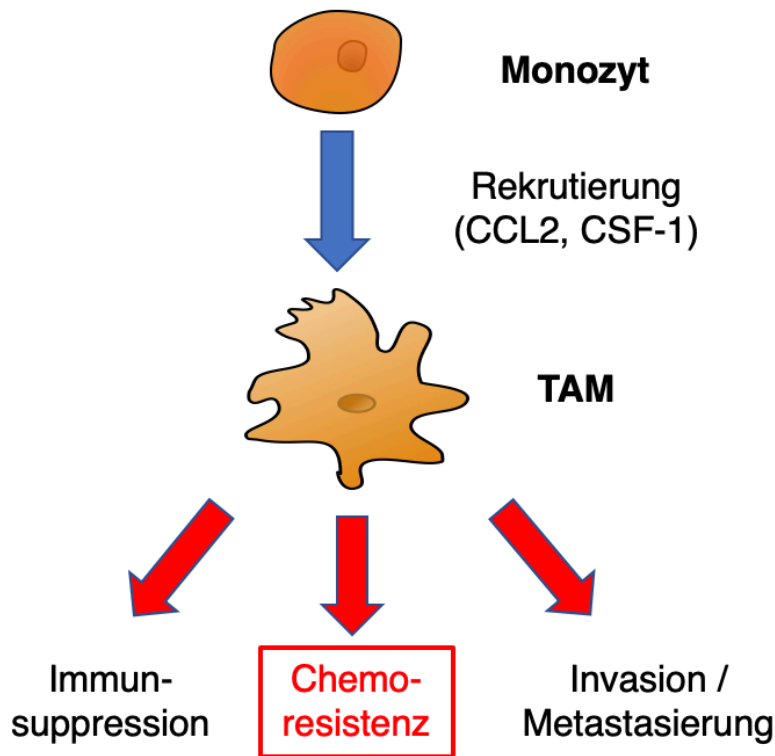
Entgegen langjährigen Annahmen zeigen fast alle Pankreaskarzinome durch die zahlreichen Mutationen Neoantigene, die Immunantwort darauf wird aber von Treg-Zellen, TAM und myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) blockiert (Bailey et al. 2016a). Dieses immunsuppressive Milieu ist auch im  $p48^{+/Cre};(Lox-STOP-Lox)LSL-Kras^{+/G12D}$ (KC)- sowie KPC-Mausmodell reproduzierbar (Hingorani et al. 2005; Stromnes et al. 2014; Stromnes et al. 2019). Die von Teilen des Immunsystems selbst ausgelöste Immunsuppression beginnt bereits in frühen PanIN-Stadien mit der Blockade von CD8-positiven T-Zellen durch CD4-positive T-Zellen. Daneben spielt auch die induzierbare Stickstoffoxid-Synthase 2 (NOS 2) eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Immunsuppression. Der Angriff dieses Enzyms bietet daher eine weitere Therapieoption (Bailey et al. 2016a). Die Immunantwort wird zudem durch die erst kürzlich charakterisierten  $\gamma$ - $\delta$ -T-Zellen erschwert; tierexperimentell führt eine Unterdrückung dieser Population zu deutlich mehr CD-8-T-Zellen im Tumor (Daley et al. 2016). Zur weiteren Untersuchung der Immunantwort auf das Pankreaskarzinom existieren zahlreiche Mausmodelle, insgesamt spielt auch die  $Kras^{G12D}$ -Mutation eine große Rolle für die Immunsuppression (Clark et al. 2009).

#### 1.4.2 Makrophagen im Pankreaskarzinom

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten, die Teil der myeloiden Reihe des Blutes sind, und wurden zuerst gegen Ende des 19. Jahrhunderts von Ilja Metschnikow beschrieben (Cavaillon 2011). Der Name geht aus den griechischen Wör-

tern *makros* für groß und *phagein* für Essen hervor. Damit wird deren Hauptfunktion beschrieben, die darin besteht, durch Phagozytose fremde Stoffe wie z. B. Krankheitserreger aufzunehmen, um diese anschließend intrazellulär zu inaktivieren und Teile davon anderen Immunzellen zu präsentieren. Aus dem Knochenmark gelöste, im Blut zirkulierende Monozyten wandern in Gewebe ein und werden dort durch Zytokine und Stoffwechselprodukte von Krankheitserregern aktiviert. Organabhängig entwickeln sich verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen, etwa Alveolarmakrophagen in der Lunge oder Kupffer-Sternzellen in der Leber (Murray und Wynn 2011).

Makrophagen und Monozyten bilden die größte Gruppe von Zellen im Pankreaskarzinom (Elyada et al. 2019). Allgemein kann ihre Aktivierung in klassisch (M1-Makrophagen) und alternativ (M2-Makrophagen) unterteilt werden (Mantovani et al. 2002; Mantovani et al. 2004). Die klassische Aktivierung wird etwa durch Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) angestoßen, während für die alternative Aktivierung beispielsweise die Interleukine (IL) IL-4, IL-10 und IL-13 benötigt werden (Mantovani et al. 2004; Mielgo und Schmid 2013; Mills et al. 2000). Während M1-Makrophagen antiinflammatorische Wirkung zeigen, haben M2-Makrophagen eine immunsuppressive und dadurch tumorfördernde Wirkung (Cui et al. 2016). M1- und M2-Makrophagen im TME des Pankreaskarzinoms werden als TAM zusammengefasst. Die Einwanderung von Makrophagen in Karzinome wird durch Faktoren wie CC-Chemokinligand 2 (CCL2) und Koloniestimulierender Faktor 1 (CSF-1) gesteuert (Cui et al. 2016). TAM spielen im Pankreaskarzinom durch die Sekretion von VEGF-A und weiteren angioproliferativen Zytokinen eine wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung. Kürzlich wurde auch der Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von Makrophagen durch Tumorzellen und einer höheren Gefäßproliferation gezeigt (Huang et al. 2018). Im Gegensatz zu den meisten anderen malignen Tumoren besitzt das Pankreaskarzinom eine geringere Gefäßdichte als das gesunde Gewebe. Trotzdem korreliert eine hohe VEGF-A-Expression im Pankreaskarzinom mit einer stärkeren Metastasierung und einer schlechteren Prognose (Cui et al. 2016; Xie et al. 2006) (Abbildung 3). Die Depletion von TAM im KPC-Mausmodell führt zu signifikant weniger Lebermetastasen (Griesmann et al. 2017).



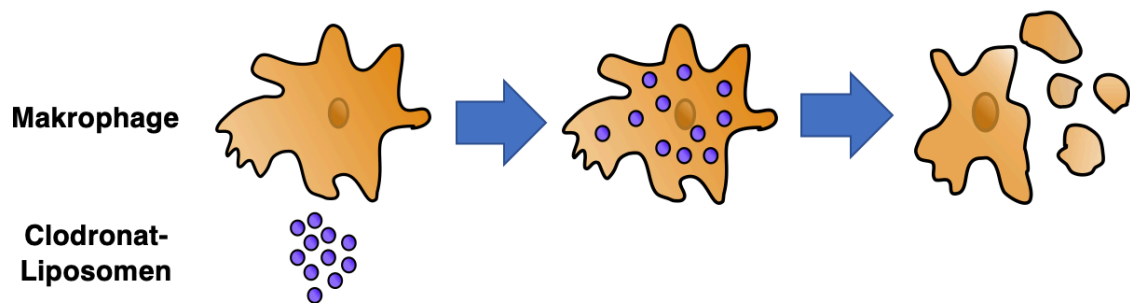
**Abbildung 3: Rekrutierung und Auswirkungen von Tumorassoziierten Makrophagen auf das Pankreaskarzinom:** Monozyten wandern nach Rekrutierung durch Faktoren wie CCL2 und CSF-1 in den Primärtumor ein. Dort tragen sie zur Immunsuppression und Metastasierung des Karzinoms bei. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Makrophagen auch eine wichtige Rolle für die Chemotherapieresistenz des Pankreaskarzinoms spielen.

TAM scheinen außerdem die Wirkung von Chemotherapie im Pankreaskarzinom zu beeinflussen. Beispielsweise induzieren sie eine höhere Expression von CDA in Pankreastumorzellen und sorgen so für eine schnellere Inaktivierung von Gemcitabin und ein vermindertes Therapieansprechen (Frese et al. 2012; Weizman et al. 2014). Außerdem reduzieren TAM das Ansprechen von Pankreaskarzinomen auf Bestrahlung und limitieren die Wirksamkeit antiangiogenetischer Therapieansätze (Brown et al. 2017).

## 1.5 Clodronat

Clodronat oder Dichloromethylenbisphosphonat ist ein Bisphosphonat der ersten Generation. Es ist für die Therapie von postmenopausaler Osteoporose zugelassen, da es Frakturen reduziert (Filipponi et al. 1995; Frediani und Bertoldi 2015). Clodronat kann als hydrophile Substanz nur schwer Membranen überwinden, wird aber von den mit Makrophagen verwandten Osteoklasten während des Knochenabbaus aufgenommen und akkumuliert. Das führt zum vorzeitigen Zelltod

der Osteoklasten; außerdem werden durch die systemische Therapie schon die Monozyten als Vorläufer dieser Zellen angegriffen. Dadurch kommt es zu einer Verlangsamung des Knochenabbaus (Frith et al. 1997).



**Abbildung 4: Illustration der Wirkung von liposomalem Clodronat auf Makrophagen:** Liposomen werden von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen. Das Clodronat akkumuliert in den Makrophagen und führt so zum Zelltod.

Die apoptoseinduzierende Wirkung von Clodronat kann auch genutzt werden, um Makrophagen systemisch zu depletieren. Dazu wird Clodronat in Liposomen verabreicht. Diese von van Rooijen und Kollegen 1984 etablierte Methode nutzt zusätzlich die Phagozytose der Makrophagen aus und ermöglicht es so, einen höheren Anteil an Makrophagen zu depletieren (Abbildung 4). Nach der Apoptose der Makrophagen wird das nun freie Clodronat renal ausgeschieden (van Rooijen und van Nieuwmegen 1984; van Rooijen und Sanders 1994). Im Tiermodell wird Clodronat zur systemischen Therapie intravenös (i. v.) oder intraperitoneal (i. p.) appliziert. So kann eine Depletion der Makrophagen im gesamten intestinalen System sowie der Milz erreicht werden (van Rooijen und Sanders 1994).

Der Einsatz von liposomalem Clodronat in der Patientenversorgung ist dadurch eingeschränkt, dass eine Sterilisierung der Liposomen, ohne sie zu zerstören, nur mit großem Aufwand möglich ist. Daher beschränkt sich ihr Einsatz auf die Injektion in Gelenke bei Rheumatoider Arthritis im Rahmen von klinischen Studien, um zu untersuchen, ob die Depletion der eingewanderten Makrophagen zu einer Besserung der Symptome führt (Barrera et al. 2000).

## 1.6 Genetisch modifizierte Mausmodelle

Viele wissenschaftliche Fragestellungen lassen sich in der onkologischen Forschung durch die Nutzung von isolierten, immortalisierten Zellen *in vitro* beant-



worten. Beim Studium der Wechselwirkungen von verschiedenen Zelltypen, extrazellulären Komponenten, dem Immunsystem und Bindegewebszellen stoßen diese Methoden allerdings schnell an ihre Grenzen (Hessmann et al. 2020; Hingorani et al. 2003; Ponz-Sarvise et al. 2015).

Außerdem gibt es Versuche, bei denen immunsupprimierten Mäusen Krebszellen entweder subkutan oder orthotop transplantiert werden. Für die Untersuchung der Interaktion von Tumor, Stroma, Immunsystem und Organismus ist die genetisch modifizierte Maus geeigneter; hier ist das Zusammenspiel der genannten Faktoren am besten nachgebildet, da sich die Tumore endogen im jeweiligen Organ und *microenvironment* entwickeln (Ding et al. 2010; Frese und Tuveson 2007; Ponz-Sarvise et al. 2015). Gleiches gilt für pharmakokinetische Untersuchungen *in vivo*, da sich die Blutversorgung in endogenen Tumoren der genetisch modifizierten Maus sehr ähnlich entwickelt wie in humanen Tumoren (Frese und Tuveson 2007).

Um Krebs oder dessen Vorläufer zu induzieren, werden Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene durch Mutationen oder Deletionen inaktiviert. Im Allgemeinen wird dazu ein organ- bzw. zellspezifischer Promotionsfaktor mit der gewünschten Mutation kombiniert. Durch den organspezifischen Promotor wird eine DNA-Rekombinase aktiviert, die wiederum ein Stop-Codon vor der mutierten Sequenz ausschneidet. Beim konditionalem *knockout* wird anstatt des Stop-Codons meist das erste Exon des gewünschten Gens ausgeschnitten. So wird das Allel inaktiviert und für die Proteinbiosynthese nicht mehr verfügbar gemacht (Hingorani et al. 2003; Ponz-Sarvise et al. 2015).

Im Vergleich zu Modellen, bei denen Tumorgewebe oder Tumorzellen subkutan oder orthotop implantiert werden, eignen sich die genetisch modifizierten Mäuse deutlich besser, um die Wechselwirkung von Tumorzellen und dem TME zu untersuchen (Frese und Tuveson 2007). Hier entwickelt sich das Stroma parallel zu den Vorläuferläsionen und dem invasiven Tumor.

### 1.6.1 Das KC-Mausmodell

Für diese Arbeit wurden zwei unterschiedliche Mausmodelle verwendet. Das KC-Mausmodell bildet regelhaft PanINs aus, die sich im weiteren Verlauf zu Pankreaskarzinomen entwickeln; dieser Prozess benötigt Monate bis Jahre (Hingorani et al. 2003). Zur Generierung wurden zunächst Mäuse mit einem mutierten *Kras*-Allel (*Kras*<sup>+/*G12D*</sup>) erzeugt. Das geschah durch ein Genkonstrukt mit

einer LSL-Gruppe aufwärts eines *Kras*-Locus, in dessen Exon 1 in Codon 12 Glycin durch Aspartat ersetzt wurde (*Kras*<sup>G12D</sup>) (Jackson et al. 2001). Die Verpaarung mit Tieren, die heterozygot die *Cre*-Rekombinase des pankreasspezifischen Promotors p48 exprimieren (p48<sup>+Cre</sup>), sorgte bei den Nachkommen mit Genotyp p48<sup>+Cre</sup>;LSL-*Kras*<sup>+G12D</sup> durch Exzision des Stop-Codons zur pankreasspezifischen Expression des mutierten *Kras*<sup>G12D</sup> (Hingorani et al. 2003).

### 1.6.2 Das KPC-Mausmodell

Für das zweite in dieser Arbeit verwendete transgene Tiermodell wurden Mäuse mit mutiertem *Kras*-Allel und mutiertem *p53*-Allel, also dem *Kras*<sup>+G12D</sup>; *p53*<sup>+R172H</sup>-Genotyp mit Mäusen des *Pdx-1-Cre*-Genotyps gekreuzt. Der hier entstehende *Kras*<sup>+G12D</sup>; *p53*<sup>+R172H</sup>; *Pdx-1-Cre*-Genotyp, im Weiteren KPC-Genotyp genannt, exprimiert die mutierten Allele von *Kras* und *p53* pankreasspezifisch und entwickelt innerhalb von drei bis zehn Monaten endogene Pankreastumore (Hingorani et al. 2005; Olive et al. 2004). Die Genotypen der Zuchttiere wurden wie oben beschrieben gewählt, damit diese keinen veränderten Phänotyp ausbilden und somit keine tumorassoziierten Symptome aufweisen.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die medikamentöse Therapie des Pankreaskarzinoms sowohl im palliativen Setting als auch in der adjuvanten Situation wird mit Kombinationschemotherapien (z. B. FOLFIRINOX, nab-Paclitaxel und Gemcitabin) durchgeführt.

Viele Jahre war Gemcitabin das einzige, jedoch gering wirksame Chemotherapeutikum zur Behandlung des Pankreaskarzinoms, welches jedoch das mittlere Überleben der Patienten nur marginal verlängern konnte. Durch die Hinzunahme weiterer Substanzen (z. B. nab-Paclitaxel) konnte die Wirksamkeit geringfügig erhöht werden und auch das mittlere Überleben der Patienten verlängert werden. Charakteristisch ist, dass isolierte Tumorzellen in der Zellkultur sehr gut auf einzelne Chemotherapeutika ansprechen, während diese im Tumorgewebe kaum Wirkung zeigen. Die Gründe für die große Diskrepanz zwischen therapeutischem Ansprechen *in vivo* und *in vitro* sind noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Arbeiten lassen vermuten, dass die direkte metabolische Inaktivierung von Gemcitabin, beispielsweise durch Fibroblasten oder Bakterien, eine große Rolle spielt (Geller et al. 2017; Hessmann et al. 2018). Makrophagen sind unter anderem für das Entstehen von Fernmetastasen im Pankreaskarzinom ein

wichtiger Faktor, außerdem aktivieren sie CDA in Tumorzellen und sorgen dadurch für eine schnellere Inaktivierung des Medikaments (Griesmann et al. 2017; Weizman et al. 2014). Die direkte Metabolisierung von Gemcitabin durch Makrophagen wurde noch nicht erforscht.

Das Ziel dieser Studie ist die Analyse des Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen und dessen Auswirkung auf neue therapeutische Optionen im Pankreaskarzinom. Auf der einen Seite sollen durch *In-vitro*-Experimente die Metabolisierung von Gemcitabin in Makrophagen sowie die Auswirkung davon auf Tumorzellen untersucht werden. Auf der anderen Seite sollen mögliche Auswirkungen einer therapeutischen Makrophagendepletion auf das Pankreaskarzinom und dessen Ansprechen auf Gemcitabin im Mausmodell eruiert werden. Nur durch die Kombination der beiden Ansätze können sowohl die direkte metabolische Konsequenz der Makrophagen als auch die Auswirkung einer Makrophagendepletion während der Chemotherapie auf das komplexe Pankreasstroma und die Tumorzellen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC Control	Vacuubrand, Wertheim
Akkupipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Aspirator Grant-bio FTA-1	Grant, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Autoklav	Tecnomara, Fernwald
Autoklav Laboklav	SHP Steriltechnik, Haldensleben
Digitalkamera Cyber-Shot DSC-RX100	Sony Europe, Surrey, Vereinig- tes Königreich
Einbettssystem EG1150 H	Leica, Wetzlar
Eismaschine AF80	Scotsman, Vernon Hills, Illinois
Feinwaage PT210	Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentations-System Chemidoc	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien
Gel-Dokumentations-System Chemocam Imager	Intas, Göttingen
Gelelektrophoresesystem 41-2025	Peqlab, Erlangen
Heizplatte für Kleintiere snuggleSafe	snuggleSafe, West Sussex, Ver- einigtes Königreich
Hood Universal Hood II	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien
Inkubator UN55pa	Memmert, Schwabach
Kleintierultraschall Visual Sonics Vevo2100	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada
Kühl- und Gefrierschränke Medline	Liebherr, Biberach an der Riß
Kühlzentrifuge PerfectSpin 24R	Peqlab, Erlangen
Mikroskop BX43	Olympus Europa, Hamburg
Mikroskop ID03	Zeiss, Jena
Mikrotom RM2265	Leica Biosystems, Nußloch
Mikrowelle NN-E209W	Panasonic, Kadoma, Japan

Gerät	Hersteller
Mini Gel Tank für Western Blot (WB)	Thermo, Waltham, Massachusetts
Minizentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Nekropsiebesteck	Karl Hammacher, Solingen
Objektträger-Strecktisch OTS 40	Medite, Burgdorf
Parrafineinbettgerät EG1150 H	Leica Biosystems, Nußloch
Photometer P330	Implen, München
Photometer PHOmo	Autobio, Zhengzhou, China
Pipetten (5; 20; 100; 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Real-Time Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-System StepOnePlus	Thermo, Waltham, Massachusetts
Rotationsinkubator Rotator SB3	Stuart, Stone, Vereinigtes Königreich
Schüttelinkubator PSU-20i	Grant, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Spannungsquelle PowerPac HC	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien
Thermoblock TH21	Hettich Benelux, Geldermalsen, Niederlande
Thermocycler FlexCycler	Analytik Jena, Jena
Thermocycler T100	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien
Vortexmischer Reax 1	Heidolph, Schwabach
Wasserbad GFL 1052	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wippe Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Zellkultur-Inkubator Heracell 240i	Thermo, Waltham, Massachusetts
Zellzähler Cellometer Auto 1000	Nexcelcom Bioscience, Lawrence, Massachusetts
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Multifuge X1R	Thermo, Waltham, Massachusetts
Zentrifuge Perfectspin 24 Plus	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge Perfectspin P	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Lauenau

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgut	Hersteller
Augenschutzcreme Bepanthen	Bayer Vital, Leverkusen
Blottingmembran Protran 0,45 $\mu\text{m}$ Nitrocellulose	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Deckgläser	Thermo, Waltham, Massachusetts
Einbettkassetten	Th. Geyer, Renningen
Filterpipettenspitzen 20 $\mu\text{l}$ , 100 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$	Starlab, Hamburg
Glaswaren	DWK Life Sciences, Wertheim/Main
Haarentfernungscreme Veet	Reckitt Benckiser Deutschland, Heidelberg
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotomklinge Feather S35	pfm medical, Köln
Multipettenspitzen	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Multipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Nitrocellulosemembran 0,45 $\mu\text{m}$	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
NuPage 4 – 12% Bis-Tris-Gel 1.0 mm 10 Well, 15 Well, 20 Well	Thermo, Waltham, Massachusetts
Objektträger	Thermo, Waltham, Massachusetts

<b>Verbrauchsgut</b>	<b>Hersteller</b>
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wisconsin
Pipettenspitzen Combitips advanced 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spritze 1 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey
Spritze 5 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen, Melsungen
Spritze Insulin 30 G	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey
Sterilfilter	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgel	Asmuth, Minden
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Sigma, St. Louis, Missouri
Agarose	Nippon Genetics, Tokio, Japan
Albumin-Standards 2 mg/ml	Thermo, Waltham, Massachusetts
Ammoniumchlorid	Sigma, St. Louis, Missouri
beta-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau pH 3 – 4,6	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Appllichem, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Chlorwasserstoffsäure 37%	Carl Roth, Karlsruhe
cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail	Sigma, St. Louis, Missouri

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Coomassie Protein-Nachweis-Reagenz	Thermo, Waltham, Massachusetts
<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> (DMEM)	Thermo, Waltham, Massachusetts
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, Missouri
DNA-Zeiger Gene Ruler Plus 1 Kilobase (kB)	Thermo, Waltham, Massachusetts
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) 100 mM	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	Thermo, Waltham, Massachusetts
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Thermo, Waltham, Massachusetts
Eosin-Lösung	Sigma, St. Louis, Missouri
Essigsäure 100%	Sigma, St. Louis, Missouri
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Ethanol, vergällt	Th. Geyer, Renningen
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, St. Louis, Missouri
Fetales bovines Serum (FBS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Fettarmes Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Formaledehyd-Lösung 4%	Merck, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Hämatoxylin nach Mayer	Sigma, St. Louis, Missouri
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure(HEPES)-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe
Isotonische Kochsalzlösung	B. Braun Melsungen, Melsungen
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma, St. Louis, Missouri
LPS	Peptotech, Rocky Hill, New Jersey
Magnesiumchlorid	Sigma, St. Louis, Missouri
<i>minimal essential medium</i> (MEM)	Thermo, Waltham, Massachusetts



<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Midori Green	Nippon Genetics, Tokio, Japan
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumfluorid	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumpyrophosphat-Dekahydrat	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Nikotinamid	Sigma, St. Louis, Missouri
NuPAGE LDS Puffer	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
NuPAGE 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) Natriumlaurylsulfat(SDS)-Laufpuffer / Transferpuffer	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Paraffin (Einbettwachs)	Engelbrecht, Edermünde / Besse
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, St. Louis, Missouri
Ponceau-Rot	Sigma, St. Louis, Missouri
RNAsin Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin
Roticlear	Carl Roth, Karlsruhe
Rotimount Einschlussmittel Histologie	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Rosswell Park Memoriam Institute</i> 1640(RPMI)-Medium	Thermo, Waltham, Massachusetts
Salzsäure 37%	Applichem, Darmstadt
Streptomycin	Sigma, St. Louis, Missouri
Thiazolylblautetrazoliumbromid	Sigma, St. Louis, Missouri
Transferpuffer (20x) für WB	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe

---

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Triton-X-100	Applichem, Darmstadt
Trizol	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA 0,5% (10x)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Tween 20	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe
Western Blot Amersham Full Rainbow Marker	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich
Zitronensäure-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe

## **2.4 Puffer und Ansätze**

Alle hier dargestellten Puffer wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und bei Bedarf zusätzlich steril filtriert oder autoklaviert.

Tabelle 4: Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
TRIS-Borat-EDTA(TBE)-Puffer	TRIS	0,9 M
	Borsäure	0,9 M
	EDTA	25 mM
	ddH <sub>2</sub> O	1000 ml
TRIS-EDTA(TE)-Puffer 10x, pH 9,0	EDTA	10 mM
	TRIS	100 mM
	ddH <sub>2</sub> O	1000 ml
TRIS-Borat-Natriumchlorid (TBS) 10x Konzentrat, pH 7,5	Tris-HCl	165 mM
	TRIS	35 mM
	Natriumchlorid	5 M
	ddH <sub>2</sub> O	1000 ml
PBS-Tween (PBS-T):	Tween 20	1 ml
	PBS	1000 ml
TBS-Tween (TBS-T):	Tween 20	1 ml
	TBS	1000 ml
Block-Puffer:	TBS-T	100 ml
	Milchpulver	5 g
Erythrozyten-Lysepuffer	ddH <sub>2</sub> O	1000 ml
	Ammoniumchlorid	8 g
	Kaliumhydrogencarbonat	1 g
	EDTA	37,2 mg
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid(MTT)	Thiazolylblautetrazoliumbromid	0,61 g
	ddH <sub>2</sub> O	100 ml
	2-Propanol	897 ml
MTT-Lösungsansatz	TritonX-100	103 ml
	HCl	0,1 M
	FCS	90 ml
Einfriermedium für Zellen	FCS	90 ml
	DMSO	10 ml

## 2.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Anwendung	Name	Hersteller
Genotypisierungs-PCR	KAPA HotStart Mouse Genotyping Kit	Sigma, St. Louis, Missouri
Immunhistochemie	3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Peroxidase Substratkit ImmPACT	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien
Immunhistochemie	Mouse on Mouse (M.O.M.) basic kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien
Immunhistochemie Peroxidase <i>rab-bit/mouse</i>	Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien
Mykoplasmen-Untersuchungs-Kit	Look-Out	Sigma, St. Louis, Missouri
PCR	TaqMan Gene Expression Master Mix	Thermo, Waltham, Massachusetts
RNA-Aufreinigung	RNeasy mini Kit	Quiagen, Hilden
RNA-Isolation	peqGOLD Total RNA	Peqlab, Erlangen

## 2.6 Zytokine

Tabelle 6: Zytokine

Zytokin	Spezies	Hersteller
CSF-1	murin	Peptotech, Rocky Hill, New Jersey
IFN- $\gamma$	human	Peptotech, Rocky Hill, New Jersey
IL-13	human	Peptotech, Rocky Hill, New Jersey
IL-4	human	Peptotech, Rocky Hill, New Jersey

## 2.7 Medikamente

Tabelle 7: Medikamente

Medikament	Hersteller
5-Fluorouracil	Sigma, St. Louis, Missouri
Gemcitabin	Sigma, St. Louis, Missouri
Isofluran	AbbVie Deutschland, Ludwigshafen
Paclitaxel	Sigma, St. Louis, Missouri
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma, St. Louis, Missouri

## 2.8 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
CD68	ab53444	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	1:50 (Immunhistochemie (IHC))
<i>cleaved caspase 3</i> (CC3)	9664	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts	1:100 (IHC)
Ki-67	RM-9106-so	Thermo, Waltham, Massachusetts	1:200 (IHC)

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung
--------------------	---------------	------------	------------

<i>goat anti mouse</i> Immunglobulin G (IgG)/ <i>horseradish peroxidase</i>	P0161	Dako, Glostrup, Dänemark	1:2000 (WB)
<i>goat anti rabbit</i>	E0432	Dako, Glostrup, Dänemark	1:300 (IHC)
<i>rabbit anti mouse</i>	E0354	Dako, Glostrup, Dänemark	1:300 (IHC)

## 2.9 TaqMan-Ansätze

Tabelle 10: Taqman-Ansätze

TaqMan-Ansatz	Katalognummer	Hersteller
<i>C-X-C motif chemokine ligand</i> (CXCL)10 (human)	Hs001714042_m1	Thermo, Waltham, Massachusetts
CXCL2 (human)	Mm00436450_m1	Thermo, Waltham, Massachusetts
CCL22 (human)	Hs01575247_m1	Thermo, Waltham, Massachusetts
<i>mannose receptor 1</i> (MRC1) (human)	Hs00267207_m1	Thermo, Waltham, Massachusetts
$\beta$ -Aktin (human)	Hs99999903_m1	Thermo, Waltham, Massachusetts
$\beta$ -Aktin (murin)	Mm00607939_s1	Thermo, Waltham, Massachusetts

## 2.10 Software und Internetadressen

Tabelle 11: Software und Internetadressen

Beschreibung	Hersteller/Anbieter	Verwendung
Affinity Designer 1.7.2	Serif, Nottingham, Ver- einigtes Königreich	Erstellung von Grafiken

AUTOsoft 2.6	Autobio, Zhengzhou, China	Auswertung MTT
CellSens Entry 1.12	Olympus, Tokyo, Japan	Mikroskopfotografie
Excel 2016	Microsoft, Redmond, Washington	Statistik, Dokumentation, Erstellung von Diagrammen
FIJI 1.0	Johannes Schindelin und weitere	Auswertung HE- und IHC
GraphPad Prism 7.03/8.1.1	GraphPad, La Jolla, Kalifornien	Statistik, Erstellung von Diagrammen
Pixelmator 3.6	Pixelmator Team, Vilnius, Litauen	Bildbearbeitung
PowerPoint 2016	Microsoft, Redmond, Washington	Erstellung von Grafiken
StepOne 2.3	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien	Auswertung quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)
Word 2016	Microsoft, Redmond, Washington	Textverarbeitung

## 2.11 Zelllinien

Die humane Monozytenzelllinie THP-1 (*american type culture collection*(ATCC) TIB-202) wurde aus dem Blut eines an Akuter Myeloischer Leukämie (AML) erkrankten Kindes gewonnen (Tsuchiya et al. 1980). Sie ist durch humane Interleukine zu Makrophagen differenzierbar, die sich weiter zu M1- und M2-Makrophagen polarisieren lassen. In dieser Arbeit wurde sie daher als Modell für tumorassoziierte und entzündungsassoziierte Makrophagen verwendet.

Die humane Zelllinie BxPC-3 (ATCC CRL-1687) wurde mittels Biopsie einem Pankreaschorpustumor entnommen (Tan et al. 1986).

Die Zelllinie PANC-1 (ATCC CRL-1469) wurde aus einem invasiv wachsenden duktalem Adenokarzinom des Pankreas bei einem 56-jährigen Mann isoliert. Die

adhärent wachsenden Zellen haben eine *KRAS*- sowie eine *P53*-Mutation (Lieber et al. 1975). Sie wird in dieser Arbeit als Modell für Zellen eines fortgeschrittenen, schlecht differenzierten Karzinoms verwendet.

Die humane Zelllinie L3.6 wurde durch *In-vivo*-Selektion der Zelllinie COLO357 gewonnen. Diese Zelllinie entstammt der Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoms. Die Zellen wurden in Leber und Milz von Nacktmäusen injiziert. Daraufhin wurden Zellen aus in den Mäusen entstandenen Metastasen isoliert und kultiviert. Dieser Vorgang wurde mit dem Zwischenschritt der Generierung der Zelllinie L3.3 mehrfach wiederholt. Wegen der starken Selektion der Zellen durch Metastasierung hat diese Zelllinie starke metastatische Eigenschaften (Bruns et al. 1999; Vezeridis et al. 1992).

Die beiden humanen PSC-Zelllinien Klon 2.2 und HPSC wurden aus resezierten Pankreaskarzinomen gewonnen und mittels Telomerase und dem großen T-Antigen immortalisiert. Die Zellen exprimieren  $\alpha$ -SMA und Vimentin, HPSC außerdem *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Sie werden in Co-Kultur-Versuchen eingesetzt, um einzelne Eigenschaften von PSCs zu simulieren (Hwang et al. 2008; Jesnowski et al. 2005; Ramu et al. 2019).

Die Zelllinien KPC-3468 und KPC-3082 wurden aus den Tumoren von Mäusen mit KPC-Genotyp isoliert (Hingorani et al. 2005). Durch den heterozygoten *knockout* von *p53* und der Mutation von *Kras*<sup>G12D</sup> kommt es zu weiteren Mutationen, die in den Zelllinien vorliegen.

Nach derselben Methode wurde die Zelllinie KPC-3468 generiert. Allerdings ist die KPC-Maus, die verwendet wurde, das Ergebnis einer zehnfachen Rückkreuzung von KPC-Mäusen mit C57BL/6(BL/6)-Mäusen, um einen reinen BL/6-Hintergrund in der Zelllinie zu erreichen. Dadurch ist diese Linie gut geeignet für die Co-Kultur-Experimente mit den primär isolierten Makrophagen aus BL/6-Mäusen.

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 Isolation von DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zur Feststellung des Genotyps der Nachkommen transgener Mäuse wurde den Mäusen 18 – 21 Tage nach der Geburt eine Schwanzbiopsie entnommen. Daraus wurde die DNA mittels HotSHOT-Methode isoliert, indem den Proben 75  $\mu$ l Alkaline-Lysepuffer hinzugegeben wurden (Truett et al. 2000). Daraufhin wurden sie



für 30 min auf 95 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C mit 75 µl Neutralisationspuffer versetzt. Die entstandene DNA-Vorlage wurde bei –80 °C gelagert.

### 2.12.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung der aus den Mausschwänzen isolierten DNA erfolgte durch PCR (Mullis et al. 1986). Diese wurde mit dem KAPA2G Robust PCR-Kit von Sigma durchgeführt. Als Thermocycler wurden der FlexCycler von Analytik Jena oder das Modell T100 von Bio-Rad verwendet. Der Standardansatz und das Protokoll sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 12:** Genotypisierungs-PCR: Standardansatz

Komponente	Menge in µl
ddH <sub>2</sub> O	4,25
DNA-Vorlage	1
Forward-Primer	0,5
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	6,25
Reverse-Primer	0,5

**Tabelle 13:** Genotypisierungs-PCR: Standardprotokoll

Temperatur und Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	1
Denaturierung	34
Primer-Anlagerung und Polymerisation	34

### 2.12.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Aufteilung von DNA-Fragmenten nach Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. In die Taschen des 1,5%igen Agarosegels wurden 12 µl des Produktes der PCR gegeben, ebenso Positiv-, Negativ- und Wasserkontrollen sowie eine Leiter, die den Lauf in 100 Basenpaaren (bp) anzeigt. Die Auftrennung der DNA gelang in einer mit TBE-Puffer gefüllten Gelkammer bei einer Spannung von 150 V über 45 min. Das Midori Green interkalierte in die Doppelstrang-

DNA, sodass diese mittels ultravioletten Lichts der Wellenlänge 302  $\mu\text{m}$  detektiert werden konnte.

#### 2.12.4 Isolation von RNA aus Zellen

Zur Gewinnung von Material wurden zunächst  $5 \cdot 10^5$  Zellen in 2 ml Medium auf eine 6-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und die RNA mit dem PeqGOLD Total RNA Kit isoliert. Die Funktion des Kits basiert auf der von Chomczynski und Mackey beschriebenen *Single-Step-Methode* (Chomczynski und Mackey 1995). Am Ende lag die RNA in ribonuklease-freiem Wasser gelöst vor.

#### 2.12.5 Reverse Transkriptase-Reaktion

Für die Analyse der Boten-RNA (mRNA) durch qPCR musste die isolierte RNA zunächst mittels reverser Transkriptase in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurde die Konzentration der mRNA photometrisch bestimmt. Danach wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA in 9  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O verdünnt, mit 1  $\mu\text{l}$  des Ribonuklease-Inhibitors RNasin versetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die darauffolgende reverse Transkription wurde zuerst von Spiegelmann und Kollegen beschrieben (Spiegelman et al. 1971). Die mRNA wurde mit dem in Tabelle 14 beschriebenen Ansatz bei 38 °C für 60 min und anschließend bei 72 °C für 10 min inkubiert. Dem Produkt wurden 120  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O zugegeben; die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 14:** Reverse Transkriptase: Standard-Ansatz

Komponente	Menge in $\mu\text{l}$	Konzentration
5x RT-Puffer	8	-
dNTPs	8	10 mM
DTT	4	0,1 M
MMLV-RT	2	200 U/I
P(dT)15 Oligo Primer	8	8 nM
RNA mit RNasin	8	-

### 2.12.6 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Quantifizierung einzelner Gene in aus Zellen oder Gewebe isolierter mRNA wurde die quantitative qPCR mit TaqMan-Sonden verwendet. Bei diesem Verfahren wird die Tatsache genutzt, dass die Taq-Polymerase neben der Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt. So wird am Ende jedes Vervielfältigungszyklus die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff versehene Primer-Sonde abgebaut. Dadurch entfernt sich der Reporter-Farbstoff von dem die Fluoreszenz unterdrückenden *quencher* am anderen Ende der Sonde, während die gemessene Fluoreszenz mit der Anzahl der Vervielfältigungen in jedem Zyklus korreliert. Dieser Effekt wird durch den Förster-Resonanzenergietransfer ermöglicht (Holland et al. 1991). Als Referenz-Gen wurde  $\beta$ -Actin zur Berechnung herangezogen. Quantifiziert wurde mittels der *Cycle-Threshold*-Methode. Das Standardprotokoll für die qPCR ist in Tabelle 15 beschrieben.

Tabelle 15: q-PCR: Standard-Protokoll

Funktion	Temperatur in °C	Zeit in s	Zyklen
Aufheizen	50	120	1
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	40
Anlagerung, Polymerisation	60	60	40

## 2.13 Zellbiologische Methoden

### 2.13.1 Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die weiteren Kulturbedingungen der Zelllinien finden sich in Tabelle 16. Abhängig von Teilungsrate und Zelldichte wurde alle ein bis vier Tage ein Teil der Zellen verworfen. Zur Verdünnung wurde das Medium abgesaugt, mit 8 ml *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C bis zum Ablösen der adhären Zellen inkubiert. Daraufhin wurde das Trypsin mit Kulturmedium inaktiviert. Die Zellen wurden bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) 3 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen und verdünnt. Die Zellzahl wurde durch das Cellometer Auto 1000 von Nexelcom bestimmt.

**Tabelle 16:** Kulturbedingungen der Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Kulturmedium
BxPC-3	Human	RPMI + 10% hitzeinaktiviertes FCS
HPSC	Human	DMEM + 10% hitzeinaktiviertes FCS
Klon 2.2	Human	DMEM + 10% hitzeinaktiviertes FCS
L3.6	Human	MEM + 10% hitzeinaktiviertes FCS
PANC-1	Human	DMEM + 10% hitzeinaktiviertes FCS
THP-1	Human	RPMI + 10% hitzeinaktiviertes FCS + 1% Natriumpyruvat
BMDM	Murin	RPMI + 5% hitzeinaktiviertes FCS + 1% Pen/Strep
KPC 1, 2, 3	Murin	DMEM + 10% hitzeinaktiviertes FCS

### 2.13.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur Einlagerung wurden  $10^6$  Zellen mit 1 ml Kryomedium, bestehend aus 10% DMSO und 90% FCS, nach Zentrifugation resuspendiert und im Kryoröhrchen für 24 h in einer Styroporbox bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen entweder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder in flüssigem Stickstoff bei ca.  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Verwendung der Zellen wurden diese bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, in 10 ml des Kulturmediums resuspendiert und 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit frischem Medium in Zellkulturflaschen gefüllt. Am nächsten Tag wurde das Medium erneut abgenommen und mit frischem Medium ersetzt, um verbliebenes DMSO zu entfernen.

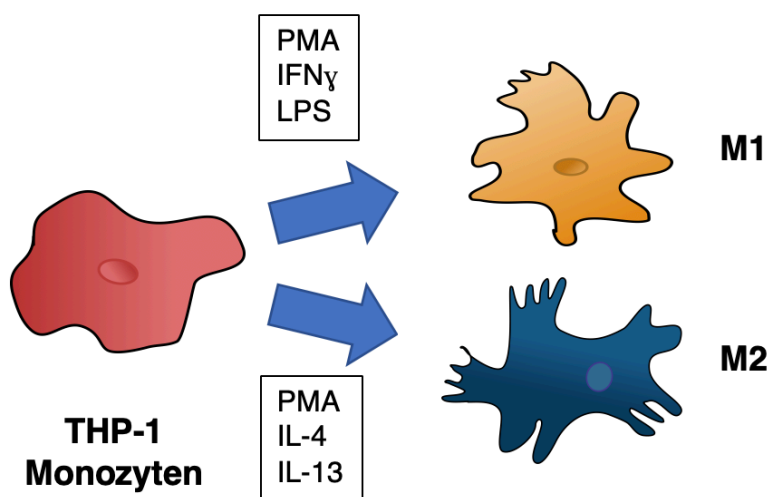
### 2.13.3 Mykoplasmentest

Die Überprüfung der Kontamination auf Mykoplasmen wurde mit einem PCR-Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Es wurden Zellen mit einer Konfluenz von 80 bis 100% und maximal 48 h altem Medium untersucht. Der Überstand wurde für 5 min bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurden die JumpStart Taq DNA-Polymerase und der Rehydrationspuffer aus dem Kit zu den Proben hinzugefügt. Es wurden  $7\text{ }\mu\text{l}$  100 bp DNA-Zeiger sowie  $12\text{ }\mu\text{l}$  Probe (in Duplikaten) auf 1,2% Agarosegel mit Midori Green gegeben. Nach

der Gel-Elektrophorese wurden die Banden mit dem ChemiDoc-System visualisiert und archiviert.

#### 2.13.4 Polarisierung von humanen Makrophagen

Zellen der nicht adhärennten Zelllinie THP-1 wurden gezählt und auf Platten aufgebracht; für 6-cm-Petrischalen wurden  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen in 2 ml Medium verwendet. Für die Polarisation zum M1-Phänotyp wurde das Medium für 6 h mit 200 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt; danach wurden für weitere 66 h 20 ng/ml IFN- $\gamma$  und 100 ng/ml LPS hinzugesetzt. Für die Polarisation zum M2-Phänotyp wurde das Medium für 72 h mit 200 ng/ml PMA, 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml IL-13 behandelt (Abbildung 5). Danach wurde entweder das Medium von den nun adhärennten Makrophagen gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht oder die Zellen gewaschen und ihrer weiteren Verwendung zugeführt.

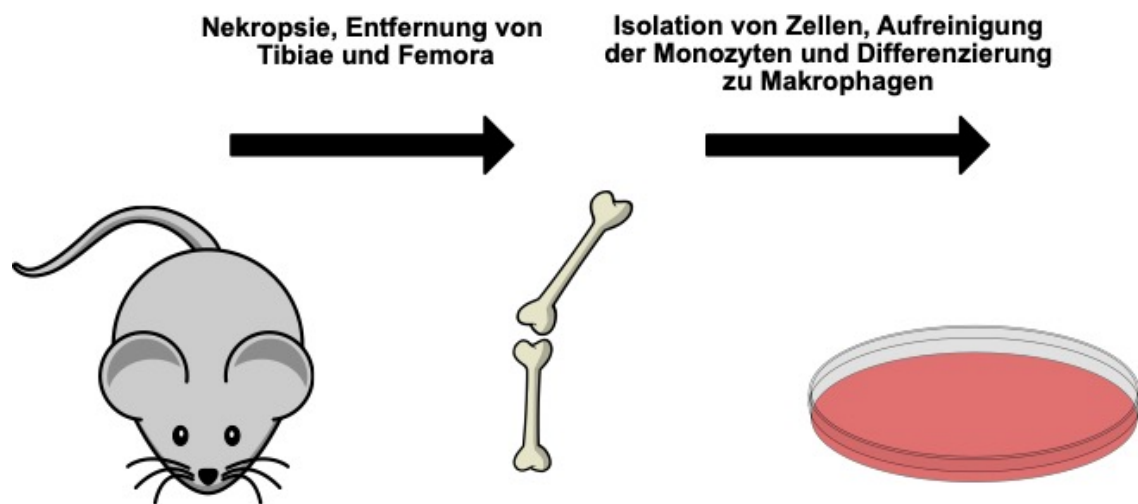


**Abbildung 5: Polarisation von THP-1-Monozyten:** THP-1-Zellen werden für 6 h mit PMA inkubiert, dann werden für 66 h IFN- $\gamma$  und LPS hinzugefügt; so entstehen M1-Makrophagen. Zur Gewinnung von M2-polarisierten Makrophagen werden die THP-1-Zellen für 72 h mit PMA, IL-4 und IL-13 inkubiert. Die polarisierten Zellen sind adhärennt.

#### 2.13.5 Isolation und Differenzierung von murinen Makrophagen

Murine Makrophagen wurden aus dem Knochenmark der Tibia und des Femurs von BL/6-Mäusen gewonnen. Wir verwendeten dafür eine modifizierte Version des von Mühlberg im Jahr 2016 beschriebenen Protokolls (Mühlberg et al. 2016). Dazu wurde die Maus zunächst durch zervikale Dislokation getötet und mit einem Skalpell das Fell an ihren Beinen eröffnet und entfernt. Der Femurknochen

wurde mit Hilfe des Skalpell aus dem Hüftgelenk gelöst und sowohl proximal als auch distal Gewebe bis zu den Grenzen von Tibia und Femur entfernt. Die Knochen wurden in kaltes PBS auf Eis überführt und dort mit dem Skalpell von Muskeln und Sehnen befreit. Zur Extraktion des Knochenmarks wurden die gesäuberten Knochen mit einer 0,45 x 25 mm messenden Kanüle und einer 1-ml-Spritze mehrmals mit kaltem RPMI gespült (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Gewinnung von primären murinen Makrophagen:** Zunächst wurden Tibia- und Femurknochen gespült; die so gewonnenen Zellen wurden mittels Zentrifugation isoliert. Anschließend wurden die Monozyten aufgereinigt und zu Makrophagen differenziert.

Das Medium wurde bei 4 °C und 1200 rpm für 7 min zentrifugiert, abgenommen und das Zellpellet mit frischem, kaltem RPMI resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Medium abgenommen, das Pellet mit 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen wieder 7 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit 5 ml RPMI resuspendiert, gezählt und entweder  $2 \cdot 10^6$  Zellen auf eine 10-cm-Petrischale in 10 ml oder  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 2 ml auf eine 6-Well-Platte aufgebracht. Das verwendete Medium wurde mit 5% FCS und 1% Pen/Strep-Ansatz versetzt. Zur Differenzierung wurden 5 ng/ml murines CSF-1 zugesetzt, die Zellen wurden für bis zu sieben Tage inkubiert und dann weiterverwendet.

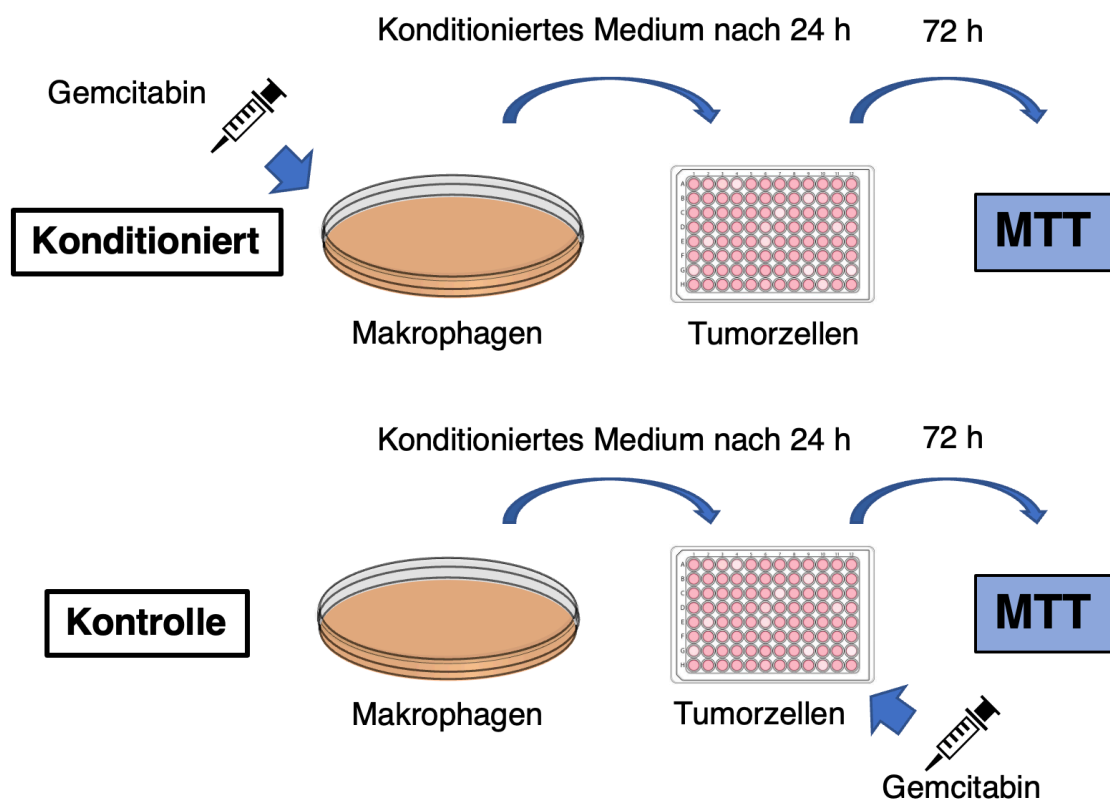
### 2.13.6 Behandlung von Zellen mit Chemotherapeutika

Um den Einfluss von Makrophagen auf die Gemcitabinbehandlung von Pankreaskarzinomzellen zu evaluieren, wurden polarisierte Makrophagen über 24 h in 6-cm-Petrischalen mit 5 ml Medium inkubiert, dem entweder Gemcitabin oder

das gleiche Volumen H<sub>2</sub>O zugesetzt war. Dieses konditionierte Medium wurde 3 min mit 1200 rpm zentrifugiert, um Rückstände zu entfernen.

Anschließend wurde es in verschiedenen Kombinationen auf ebenfalls 24 h zuvor auf 96-Well-Platten mit 5000 Zellen/Well ausgesäte Pankreaskarzinomzellen gegeben und 72 h inkubiert. Danach wurde die Viabilität mittels der beschriebenen MTT-Reduktion gemessen. Um das Wachstum der Zellen bei Behandlungsbeginn zu bestimmen, wurden zu diesem Zeitpunkt als Kontrolle ausgesäte Zellen mittels MTT gemessen (Abbildung 7).

Als Medium wurde das übliche Kulturmedium der zu behandelnden Zellen verwendet. Für Paclitaxel und 5-FU wurde ähnlich vorgegangen. Da Paclitaxel in DMSO gelöst vorlag, wurde für die Kontrollbehandlung auch DMSO als Ersatz gewählt. Die Konzentration der Chemotherapeutika wurde abhängig von der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) der behandelten Zelllinie gewählt und ist in Tabelle 17 aufgeführt.



**Abbildung 7: Behandlung von Pankreastumorzellen in Co-Kultur mit Makrophagen:** Für konditioniertes Medium wird Gemcitabin 24 h auf Makrophagen inkubiert, für die Kontrolle wird Gemcitabin zum Medium erst nach den 24 h hinzugegeben. Anschließend werden Pankreastumorzellen mit dem inkubierten Medium über 72 h behandelt. Die Viabilität wird durch die MTT-Reaktion mit anschließender photometrischer Messung bestimmt.

**Tabelle 17:** Medikamentenkonzentrationen (c) für die Behandlung mit Überstand

Zelllinie	c Gemcitabin	c 5-FU	c Paclitaxel
BxPC-3	15 nM	1 $\mu$ M	3,5 $\mu$ M
KPC-3082	25 nM	3,5 $\mu$ M	15 $\mu$ M
KPC-32047	25 nM	3,5 $\mu$ M	15 $\mu$ M
KPC-3468	25 nM	3,5 $\mu$ M	15 $\mu$ M
L3.6	3 nM	7,5 $\mu$ M	3,5 $\mu$ M
PANC-1	200 nM	4 $\mu$ M	3,5 $\mu$ M

### 2.13.7 Zellviabilitätsbestimmung durch Tetrazoliumsalz-Reduktion

Diese Methode der Zellviabilitätsbestimmung beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen. Das Produkt hat im Gegensatz zum gelben MTT eine violette Farbe. Durch diesen Prozess korreliert die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 550 bis 600 nm mit der metabolischen Aktivität der untersuchten Zellen (Mosmann 1983). Der metabolische Umsatz der untersuchten Population wiederum korreliert in der Regel mit der Anzahl der lebenden Zellen. Zur Bestimmung wurden je 5000 Zellen in 200  $\mu$ l des üblichen Kulturmediums auf einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend nahmen wir das Medium ab und gaben 200  $\mu$ l konditioniertes bzw. mit Medikamenten versetztes Medium hinzu. Daraufhin wurden die Zellen bei üblichen Kulturbedingungen 72 h und nach Hinzugabe von 20  $\mu$ l MTT-Lösung für zwei weitere Stunden inkubiert. Danach wurde die gesamte Flüssigkeit abgenommen und mit 100  $\mu$ l MTT-Lösungsansatz versetzt. Dieser Schritt war nötig, weil das Formazan zunächst kristallin vorliegt, für eine gleichmäßige Dichtemessung aber in Lösung benötigt wird. Abschließend wurde die optische Dichte der Lösung photometrisch bei 595 nm bestimmt.

## 2.14 Massenspektrometrische Methoden

Sämtliche massenspektrometrische Analysen von Gemcitabin und seinen Metaboliten entstanden in Kooperation mit der *Pharmacology & Drug Development Group* des Cancer Research UK Centre in Cambridge unter der Leitung von Prof. Dr. Duncan Jodrell.



### 2.14.1 Gemcitabinbehandlung von Zellen

Je  $7 \cdot 10^5$  der zu untersuchenden Zellen wurden in 2 ml in vier Kammern einer 6-Well-Platte ausgesät und 24 h unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen inkubiert. Für THP-1-Zellen wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen ausgesät und wie zuvor beschrieben zu M1- oder M2-Makrophagen polarisiert. Nach 24 h bzw. der erfolgten Polarisation wurde das Medium abgenommen und in drei der vier Kammern mit 1 ml Kulturmedium, in dem  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  Gemcitabin gelöst war, versetzt. In der vierten Kammer wurden die Zellen mit 1 ml frischem Kulturmedium ohne Gemcitabin behandelt. Die Zellen wurden 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und einzeln in Kryoröhrchen überführt, die bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Der Zellrasen wurde zweimal mit 1 ml  $4^\circ\text{C}$  kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Das Trypsin wurde nach mikroskopisch bestätigter vollständiger Ablösung aller Zellen mit 3 ml des jeweiligen Kulturmediums neutralisiert, die Zellen wurden 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert und mit 2 ml Kulturmedium resuspendiert und gezählt.  $5 \cdot 10^5$  Zellen wurden im Medium in Kryoröhrchen überführt, dieses wurde 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, vom Überstand befreit und mit 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt; anschließend wurde das PBS abgenommen und das verbleibende Zellpellet im Kryoröhrchen bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur massenspektrometrischen Analyse gelagert. Für jedes biologisch unabhängige Replikat wurden Triplikate verwendet und daraus der Mittelwert errechnet. Für die Untersuchungen wurden für jeden Aufbau mindestens je drei biologisch unabhängige Replikate verglichen.

### 2.14.2 Vorbereitung von Tumorproben

Die Mäuse wurden, wie in 2.15.3 beschrieben, mit Gemcitabin behandelt und wie in 2.15.5. beschrieben geopfert. Die zu untersuchenden Tumorproben wurden nach Nekropsie umgehend in flüssigen Stickstoff gegeben. Anschließend wurden diese in kaltem 50% Acetonitril mit  $25 \mu\text{g/ml}$  Tetrahydrouridin homogenisiert und extrahiert, sodass Gewebehomogenisat mit einer Konzentration von  $0,05 \text{ mg}/\mu\text{l}$  vorlag. Die so gewonnenen Proben wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  im Kryoröhrchen bis zur massenspektrometrischen Analyse gelagert (Bapiro et al. 2011; Bapiro et al. 2014; Ramu et al. 2019).

### 2.14.3 Qualitätssicherung und Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde eine Standardkurve mittels Zugabe definierter Mengen der zu messenden Moleküle im Tumorlysat erstellt. Zudem wurden zu Beginn und am Ende jeder Messcharge Proben mit verschiedenen bekannten Konzentration zur Qualitätssicherung verwendet (Bapiro et al. 2011; Ramu et al. 2019).

### 2.14.4 Massenspektrometrische Untersuchung

Für die Analyse von dFdc , dFdu und dFdCTP wurden PGC-Hypercarb-Säulen der Firma Thermo Fisher in einem Thermo Scientific *TSQ-vantage triple-stage-quadrupole*-Massenspektrometer in Verbindung mit dem *Vanquish-quaternary-ultra-high-performance-liquid-chromatography*(UHPLC) eingesetzt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten mittels Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Die Daten wurden mit der Software LC Quan 2.5.6 gemessen und ausgewertet (Bapiro et al. 2011; Bapiro et al. 2014).

## 2.15 Tierexperimentelle Methoden

### 2.15.1 Zucht und Haltung

Zur Überprüfung der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse *in vivo* wurden zwei transgene Mausmodelle genutzt. Außerdem wurden BL/6-Wildtyp-Mäuse zur Isolation von primären Monozyten aus dem Knochenmark benötigt. Alle Tiere wurden nach den Richtlinien der Tierschutzkommission der Universität Göttingen gehalten. Die Tierversuche wurden im Rahmen der durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigten Tierversuchsanträge 14/1634 und 15/2056 in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie europäischen und regionalen Regulationen durchgeführt.

Zur Verpaarung wurde ein Männchen mit einem Weibchen zusammen in einem Käfig gehalten. 18 – 21 Tage nach Geburt wurden die Mäuse mittels Ohrclips fortlaufend nummeriert. Anschließend wurde ein Stück des Schwanzes zur Bestimmung des Genotyps entfernt. Die Mäuse mit geeignetem Genotyp wurden aus dem Elternkäfig in einen normalen Käfig überführt. Sowohl die Verpaarung als

auch die Pflege der Tiere wurde von den Tierpflegern der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) durchgeführt.

Um die geeigneten Genotypen zu erhalten, wurden verschiedene Kreuzungen durchgeführt und kombiniert. Dabei wurde nach den mendelschen Regeln vorgegangen. Für die Versuche wurden Mäuse mit den Genotypen KC und KPC verwendet; diese sind in 1.6 ausführlich beschrieben.

### **2.15.2 Sonografische Untersuchung**

Da die KPC-Mäuse erst behandelt wurden, wenn sie einen ausreichend großen Pankreastumor hatten und die Tumore variabel in einer Zeitspanne von drei bis zehn Monaten auftreten, durchliefen die Mäuse ein regelmäßiges Tumorscreening. Dazu wurden sie ab einem Alter von acht Wochen wöchentlich untersucht, indem sie mit einer Hand am Schwanz fixiert wurden, während die andere Hand das Abdomen vorsichtig, aber mit ausreichend Druck palpierter. Wenn bei der Palpation eine suspekta Formation in der Maus ertastet wurde, erfolgte am selben Tag eine sonografische Untersuchung. Dazu wurde die Maus in eine geschlossene Kammer gesetzt, in die zur Sedierung ein 5%-Sauerstoff-Isotrurane-Gasgemisch strömte. Nach ungefähr 1 min wurde die Narkosetiefe mittels des Zwischenzehenreflexes überprüft. Anschließend wurde die Maus auf einer beheizten Platte mit Verbandklebeband auf dem Rücken liegend an den Extremitäten fixiert, mit dem Kurzhaarschneider ER-PA10 von Panasonic wurde das Fell über dem Abdomen großflächig rasiert. Um die verbliebenen Fellreste zu entfernen, wurde Enthaarungscreme für 3 – 5 min auf das Abdomen aufgetragen und anschließend mit Wasser sorgfältig entfernt. Auf der Platte wurde die Maus durch einen über Maul und Nase befestigten Schlauch mit 2%-Sauerstoff-Isotrurane-Gasgemisch versorgt, um die Narkose aufrechtzuerhalten.

Nach der Entfernung der Haare fand die Untersuchung der Maus mit dem VEVO-Sonic2100-Ultraschallgerät unter Zuhilfenahme von Ultraschallgel statt. Hier wurden zunächst die Gefäße sowie die Organe Leber, Nieren, Milz, Magen und Darm sowie das Pankreas grob beurteilt und nach einem möglichen Tumor gesucht. Wenn dieser detektiert werden konnte, wurde er, abhängig von der Lage, als Tumor des Pankreaskopfes, des Pankreascorpus oder des Pankreaschwanzes eingeordnet und ausgemessen. Anschließend wurde die Platte mit der Maus um 90° nach links gedreht. In dieser Position wurde die Größe des Tumors noch einmal ausgemessen, um dessen maximale Ausdehnung in allen

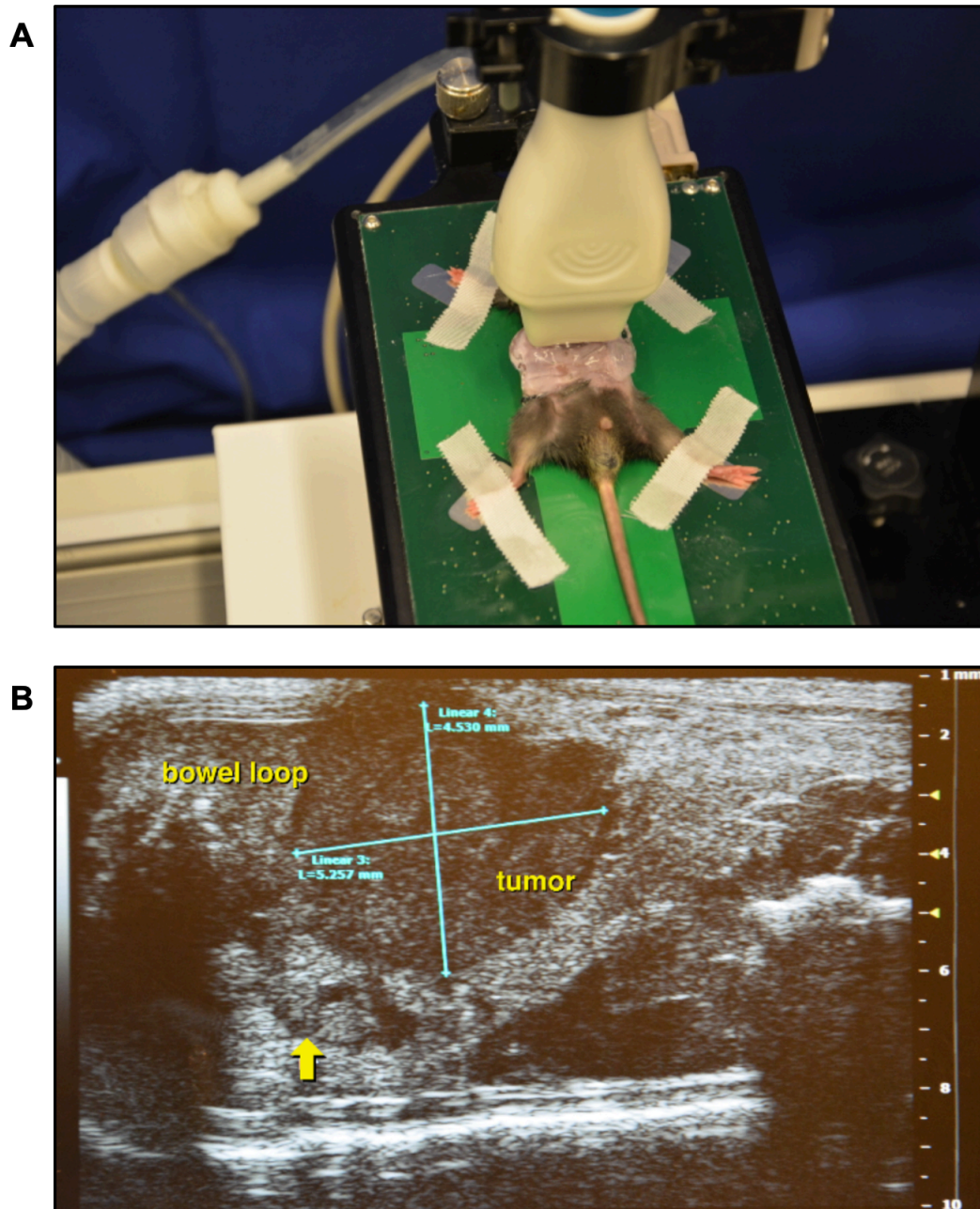
drei Ebenen zu erfassen. Nachdem die Messungen abgeschlossen waren, wurde die Maus in einen Käfig auf einer Heizplatte überführt. Wenn die Maus komplett aus der Narkose erwacht war, wurde sie in den ursprünglichen Käfig transferiert (Abbildung 8).

Wenn bei der Maus ein Tumor detektiert wurde, der in mindestens einer Ebene größer als 5 mm war, wurde sie in einen separaten Käfig umgesetzt und die Therapie begonnen. Falls der Tumor zu klein für den Therapieeinschluss war, wurde die Maus in der nächsten Woche wieder sonografisch untersucht. Die Prozeduren wurden von uns durch eine Videopublikation beschrieben (Goetze et al. 2018).

### 2.15.3 Intraperitoneale Medikamentengabe

Um den Mäusen Clodronat-Liposomen, PBS-Liposomen, Gemcitabin oder Kochsalzlösung zu verabreichen, wurde die i. p.-Injektion gewählt. Durch die hohe Resorptionskraft der *tunica serosa* wirken die Medikamente bei dieser Applikationsform systemisch. Zur Gabe von Clodronat, Gemcitabin oder entsprechenden Kontrollsubstanzen wurden die Mäuse mit einer Hand fixiert und mit der anderen Hand die Substanz mit einer 1-ml-Spritze und einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,45 mm in den unteren rechten Quadranten des Abdomens injiziert. So wurde das Risiko von versehentlichen Organperforationen minimiert.

Um die Effekte der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms mit Clodronat in Kombination mit Gemcitabin *in vivo* zu untersuchen, wurden KPC-Mäuse mit einem Tumor, der sonografisch in einer Ebene größer als 5 mm war, mit beiden Substanzen behandelt. Die Therapieschemata der drei KPC-Behandlungskohorten sind in Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21 beschrieben, die jeweils applizierten Dosen in Tabelle 18.



**Abbildung 8: Sonografisches Tumorscreening:** (A): Die Maus wird nach Narkoseeinleitung auf der Wärmeplatte fixiert, die Haare werden entfernt und der Schallkopf wird aufgesetzt. (B): Sonografisches Bild in Rückenlage, die hypodense, runde Struktur ist ein Pankreastumor (*tumor*), der gelbe Pfeil zeigt die Grenze zum gesunden Gewebe. Außerdem ist eine Darmschlinge (*bowel loop*) abgebildet.

**Tabelle 18:** Dosis der injizierten Medikamente

Medikament	Dosis	Konzentration	Menge
Clodronat-Liposomen	70 $\mu\text{g/g KG}$	5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	14 $\mu\text{l/g KG}$
Gemcitabin	100 $\mu\text{g/g KG}$	10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l/g KG}$
PBS-Liposomen	-	-	14 $\mu\text{l/g KG}$

**Tabelle 19:** Behandlungsschema KPC-Mäuse: Therapie mit Clodronat-Liposomen

Behandlungstag	Medikament	Weiteres Vorgehen
Tag 1	Clodronat	Erster Ultraschall
Tag 4	Clodronat	-
Tag 5	-	Verlaufsultraschall
Tag 8	Clodronat	-
Tag 10	Clodronat	Verlaufsultraschall
Tag 11	-	Tötung, Probenentnahme

**Tabelle 20:** Behandlungsschema KPC-Mäuse: Therapie mit Gemcitabin

Behandlungstag	Medikament	Weiteres Vorgehen
Tag 1	-	Erster Ultraschall
Tag 2	Gemcitabin	-
Tag 5	Gemcitabin	Verlaufsultraschall
Tag 9	Gemcitabin	-
Tag 10	-	Verlaufsultraschall
Tag 11	Gemcitabin	Tötung, Probenentnahme

**Tabelle 21:** Behandlungsschema KPC-Mäuse: Kombinationstherapie mit Clodronat-Liposomen und Gemcitabin

Behandlungstag	Medikament	Weiteres Vorgehen
Tag 1	Clodronat	Erster Ultraschall
Tag 2	Gemcitabin	-
Tag 4	Clodronat	-
Tag 5	Gemcitabin	Verlaufsultraschall
Tag 8	Clodronat	-
Tag 9	Gemcitabin	-
Tag 10	Clodronat	Verlaufsultraschall
Tag 11	Gemcitabin	Tötung, Probenentnahme

Um die Auswirkungen einer medikamentösen Makrophagendepletion auf die frühe Karzinogenese zu untersuchen, wurden bei den KC-Mäusen ab der zehnten bis zur zwölften Lebenswoche zweimal wöchentlich Clodronat-Liposomen in der in Tabelle 18 genannten Dosis nach dem in Tabelle 22 beschriebenen Schema injiziert. Um Effekte auszuschließen, die nicht auf das liposomale Clodronat zurückzuführen sind, wurde eine Kontrollgruppe mit PBS-Liposomen behandelt. Nachdem ursprünglich eine zehnwöchige Behandlung mit anschließender Opferung geplant war, mussten die Tiere nach sechs Wochen Behandlung getötet werden, da im Verlauf mehrere Tiere Aszites entwickelt hatten.

**Tabelle 22:** Behandlungsschema KC-Mäuse: Therapie mit Clodronat- oder PBS-Liposomen

Behandlungstag	Medikament	Weiteres Vorgehen
Tag 1	Clodronat/PBS	-
Tag 4	Clodronat/PBS	-
Tag 8	Clodronat/PBS	-
Tag 11	Clodronat/PBS	-
Tag 41	Clodronat/PBS	-
Tag 42	Gemcitabin	Tötung 2 h nach Gemcitabin-Gabe, Probenentnahme

#### 2.15.4 Abbruchkriterien

Die Mäuse in den Tierversuchen wurden vor Erreichen eines Endpunktes euthanasiert, wenn eines oder mehrere der folgenden Kriterien auftraten: Verlust von

20% des Körpergewichts, Morbidität, deutlicher Mangel an sozialer Interaktion, Lethargie oder Aszites.

### **2.15.5 Opferung und Präparation**

Um Gewebe zu gewinnen und den Tumor sowie weitere klinische Zeichen wie Metastasen, Obstruktionen oder beginnende Aszites zu beurteilen, wurden die Mäuse zu den in den Tabellen 19 – 22 beschriebenen Zeitpunkten geopfert.

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Abdomen mit Ethanol desinfiziert und mit einer Schere eröffnet. Zunächst wurde das Pankreas zügig mit Pinzette und Skalpell freipräpariert, gewogen und in verschiedene Teile geschnitten. Diese wurden in Formalin, RNAlater sowie flüssigen Stickstoff überführt, um den Selbstverdau des Organs so früh wie möglich zu unterbrechen. Anschließend wurden Leber und Milz mit den gleichen Methoden konserviert. Zusätzlich wurden Teile des Dünndarms und der Lunge entnommen und in Formalin gegeben. Eine schnelle Organentnahme und Konservierung ist für eine gleichmäßig gute Qualität der Proben essenziell. Die nicht benötigten Teile der Maus wurden nach den Richtlinien der ZTE entsorgt.

## **2.16 Histologische und immunhistochemische Methoden**

Zur Beurteilung der histomorphologischen Veränderungen des Pankreas und der Milz in den verschiedenen Behandlungsgruppen wurden sowohl Hämatoxylin-Eosin(HE)- als auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurde das den Mäusen entnommene Gewebe über Nacht in Formalin chemisch fixiert. Durch die Fixierung werden Proteine im Gewebe quervernetzt, das Präparat konserviert und durch eine Härtung auf das spätere Schneiden vorbereitet. Anschließend wurden die Proben entwässert, wobei nach dem in Tabelle 23 beschriebenen Schema vorgegangen wurde. Die Entwässerung funktionierte durch das Behandeln der Gewebeproben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie der anschließenden Verwendung von Roticlear. Nach dem Entwässern wurden die Proben in erhitztes Paraffin gegeben und in Metallwannen eingebettet. Dabei wurden die Organe einer Maus meist auf zwei Blöcke verteilt.

Nachdem die Blöcke auf 4 °C abgekühlt wurden, wurden 4 µm dicke Schnitte der Proben angefertigt, die für die verschiedenen Färbungen verwendet werden



konnten. Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Olympus BX43 beurteilt und für die weitere Auswertung mit FIJI/ImageJ fotografiert.

**Tabelle 23:** Dehydratation und Paraffinierung von Gewebe

Behandlungsflüssigkeit	Dauer in min
Formalin	75
Ethanol 55%	30
Ethanol 85%	45
Ethanol 96%	60
Ethanol 99% (3x)	75 + 70 + 90
Xylol (3x)	20 + 30 + 70
Paraffin (3x)	30 + 45 + 90

### 2.16.1 HE-Färbung

Um das paraffinierte Pankreasgewebe färben zu können, musste es zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wurden die Objektträger zweimal 5 min in Roticlear gegeben. Im Anschluss wurden sie je zweimal 3 min in 99%, 96%, 80% und 70% Ethanol getaucht und zwei- bis dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Die gewaschenen Schnitte wurden für 7 min mit Hämatoxylin gefärbt und mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in Eosin überführt, für eine weitere Minute gefärbt und erneut mit Leitungswasser gewaschen. Zur abschließenden Dehydrierung wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe je 3 min mit 70%, 80%, 96% und zweimal mit 99% Ethanol behandelt sowie viermal 5 min mit Roticlear. Auf den gefärbten Schnitten wurde ein Deckglas mit Rotimount fixiert.

### 2.16.2 Immunhistochemie

Für die Quantifizierung und Charakterisierung spezifischer Zellen, Gewebebestandteile oder Vorgänge nutzten wir Antikörper, die an bestimmte Antigene binden und so spezifisch visualisierbar sind. Um die Färbung zu ermöglichen, musste das Gewebe vorbereitet werden.

Dafür wurde das Gewebe zunächst, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, entparaffiniert und rehydriert. Um die Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte in TE-Puffer gegeben, in der Mikrowelle für 4 – 6 min aufgeköcht und weitere 10 min darin inkubiert.

Nach dem Kochen wurden Puffer und Objektträger 20 min auf Eis gekühlt und mit Leitungswasser gewaschen. Damit es nicht zu falsch positiven Ergebnissen kommt, wurde die endogene Peroxidase des Gewebes blockiert. Dies geschah durch die Behandlung mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 20 min und das anschließende erneute Spülen mit Leitungswasser. Die Objektträger wurden nun auf dem Färbesystem befestigt, dreimal mit TBS-T gewaschen und für 1 h mit 200 µl 10% BSA inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Dies erfolgte nach jedem beschriebenen weiteren Schritt bis zur Entwicklung mit DAB. Danach wurde der verdünnte Primärantikörper auf die Gewebeschnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Objektträger mit dem verdünnten Sekundärantikörper für 1 h behandelt. Um die Detektion zu ermöglichen, wurde für 1 h der frisch vorbereitete Avidin-Biotin-Komplex hinzugegeben. Dann wurden die Objektträger aus dem Färbesystem gelöst und mit 150 µl DAB behandelt. Die Reaktion wurde durch Wasser beendet und die Schnitte mit Hämatoxylin behandelt, bis sie sich blau färbten und anschließend in der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Alkoholreihe dehydriert und mit Deckgläsern versehen.

### 2.16.3 Histologische Quantifizierung

Um den Anteil von DAB-positiven Zellen bei immunhistochemischen Färbungen zu untersuchen, wurde ein semiquantitatives Verfahren gewählt.

Zur manuellen Quantifizierung der positiven Zellen bzw. Zellkerne wurden die zu quantifizierenden Gesichtsfelder von einer Person zufällig ausgewählt, verblindet und von einer anderen Person quantifiziert. Zusätzlich erfolgte eine automatische Zählung aller Zellen bzw. Zellkerne mit dem Programm FIJI/ImageJ. Aus diesen Werten wurde der Quotient gebildet.

Zur Quantifizierung von DAB-positiver Fläche wurden ein automatisiertes Skript und FIJI/ImageJ eingesetzt.

## **2.17 Statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit Graph Pad Prism (Versionen 7.03 sowie 8.1.1) ausgewertet. Für alle numerischen Ergebnisse wurden die Standardabweichung (SD) sowie die Mittelwerte (MW) berechnet. Ergebnisse mit einem  $p < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet und mit einem \* markiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde zur Berechnung der Signifikanz der zweiseitige t-Test angewendet.

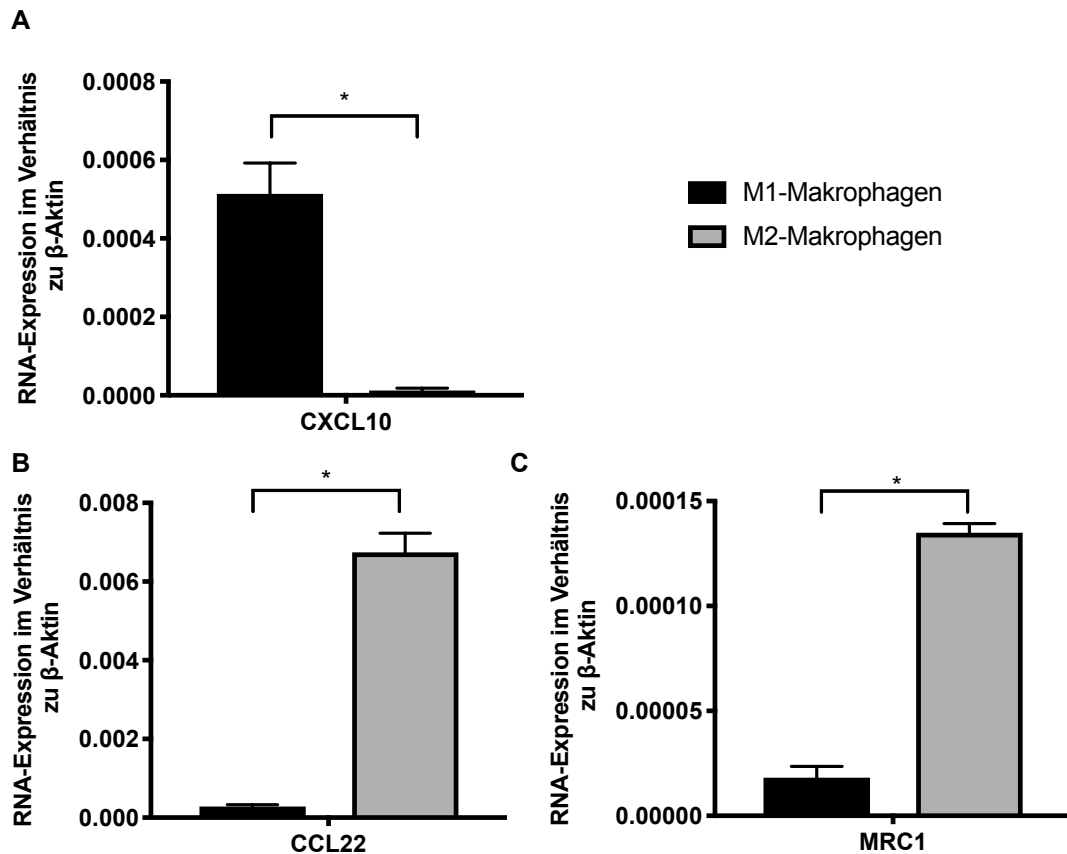
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Validierung der Polarisierung und Isolation von Makrophagen

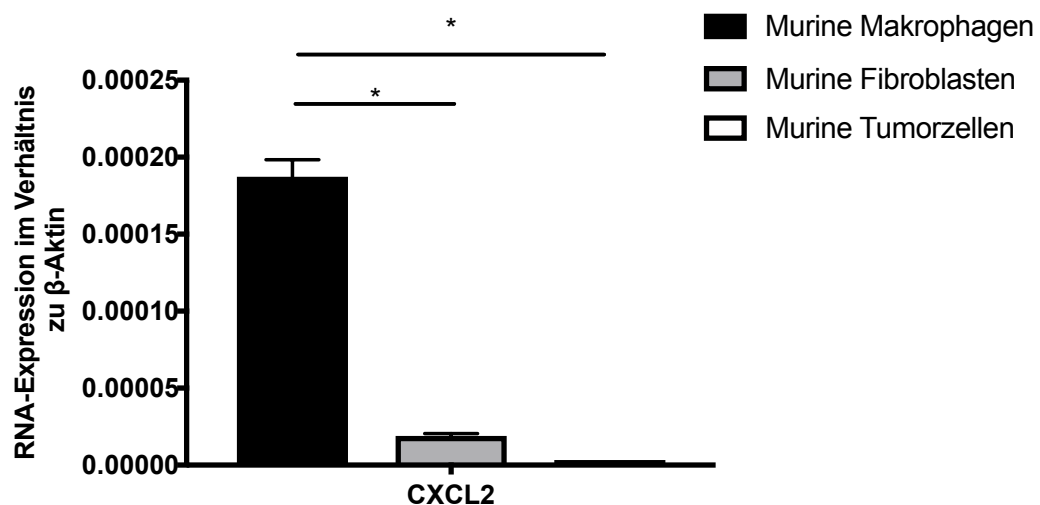
Im Pankreaskarzinom spielen aktivierte Makrophagen eine große Rolle. Das vereinfachte M1- und M2-Makrophagenschema geht davon aus, dass M2-Makrophagen eher den Tumor fördern, während M1-Makrophagen diesen eher bekämpfen (Mantovani et al. 2002; Mantovani et al. 2004). In den letzten Jahren wurde klar, dass es weit mehr Makrophagenprofile als M1- und M2-Makrophagen gibt; diese bilden eher die Enden eines breiten Differenzierungsspektrums (Karnevi et al. 2014; Mills et al. 2000; Mosser und Edwards 2008). Um Unterschiede im Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen möglichst breit zu erfassen, haben wir beide Polarisierungen untersucht. Dazu wurden die nicht adhären-ten THP-1-Zellen, wie in 2.13.4 beschrieben, über 72 h mit verschiedenen Zytokinen und LPS inkubiert und so zunächst differenziert und dann polarisiert.

Zur Verifikation der Polarisierung wurden die etablierten Marker CXCL10, CCL22 und MRC1 mittels qPCR quantifiziert. Erwartungsgemäß zeigten M1-Makrophagen eine hohe Expression von CXCL10, während M2-Makrophagen CCL22 und MRC1 stark exprimierten (Abbildung 9) (Li et al. 2016).

Neben den Versuchen mit humanen Makrophagen wurde auch der Gemcitabinmetabolismus muriner Makrophagen analysiert. Dafür wurden Monozyten aus dem Knochenmark von BL/6-Wildtyp-Mäusen isoliert, indem das Knochenmark von Tibia und Femur gespült wurde. Die anschließende Aufreinigung und Differenzierung wurde mittels verschiedener Waschmedien und Zytokine wie in 2.13.5 beschrieben durchgeführt. Der Vergleich der Expression des Makrophagen-Markers CXCL2 auf RNA-Ebene mit anderen Zelltypen durch qPCR bestätigt, dass es sich um Makrophagen handelt (Abbildung 10).



**Abbildung 9: Verifizierung der Polarisation von humanen THP-1-Makrophagen:** RNA wurde aus M1- ( $n = 2$ ) oder M2- ( $n = 2$ ) polarisierten THP-1-Zellen isoliert. (A): Die quantitative RT-PCR zeigt für M1-Makrophagen eine stärkere Expression von CXCL10 verglichen mit M2-Makrophagen ( $p = 0,0121$ ). (B) und (C): Für M2-Makrophagen zeigt sie eine stärkere Expression von CCL22 ( $p = 0,0028$ ) und MRC1 ( $p = 0,0018$ ).



**Abbildung 10: Verifizierung der Differenzierung von murinen Makrophagen:** RNA wurde aus primären isolierten murinen Makrophagen ( $n = 2$ ), murinen Pankreastumorzellen (KPC1) ( $n = 2$ ) und murinen PSCs (PSC1) ( $n = 2$ ) isoliert. Die quantitative RT-PCR zeigt eine stärkere Ausprägung des für Makrophagen spezifischen Gens CXCL2 in den Makrophagen, verglichen mit Fibroblasten ( $p = 0,0022$ ) und Tumorzellen ( $p = 0,0018$ ).

### 3.2 Makrophagen speichern mehr Gemcitabin als Tumorzellen

Zur massenspektrometrischen Bestimmung der Aufnahme und Metabolisierung von Gemcitabin in THP-1-Makrophagen und primär isolierten murinen Makrophagen wurden die Zellen wie in 2.14 beschrieben über entweder 2 h oder 24 h mit  $1 \mu\text{M}$  Gemcitabin behandelt. Anschließend wurden die Gemcitabinmetabolite dFdC, dFdU und dFdCTP sowohl in den Zellen als auch im Zellkulturüberstand mittels Massenspektrometrie untersucht. dFdU als inaktiver Metabolit ist das Produkt der Desaminierung von Gemcitabin durch CDA. Das mit einer Triphosphatgruppe verbundene dFdCTP ist die aktivierte Form von Gemcitabin, nur diese kann in die DNA integriert werden (Abbildung 1) (Alvarellós et al. 2014).

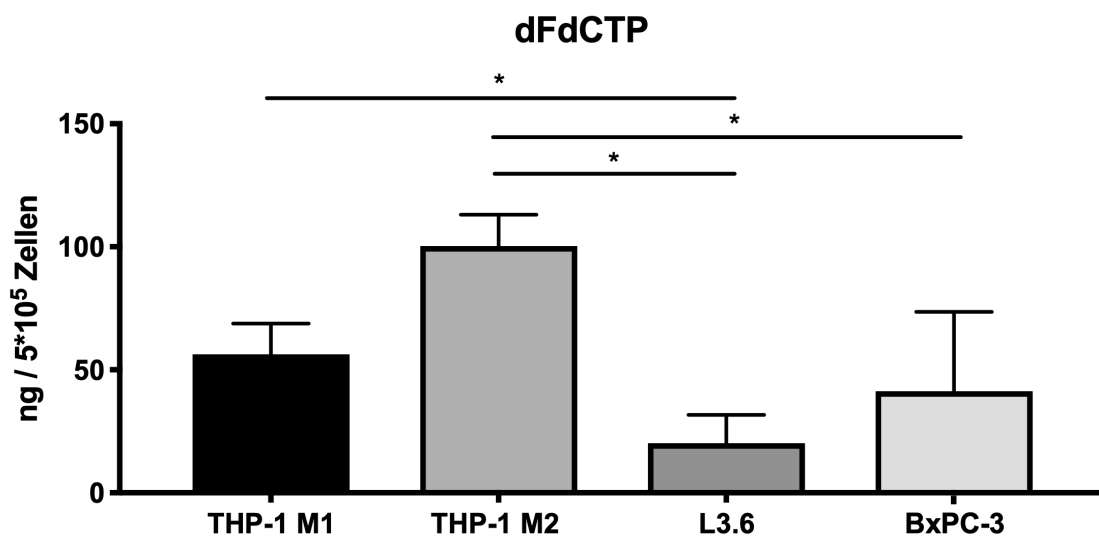
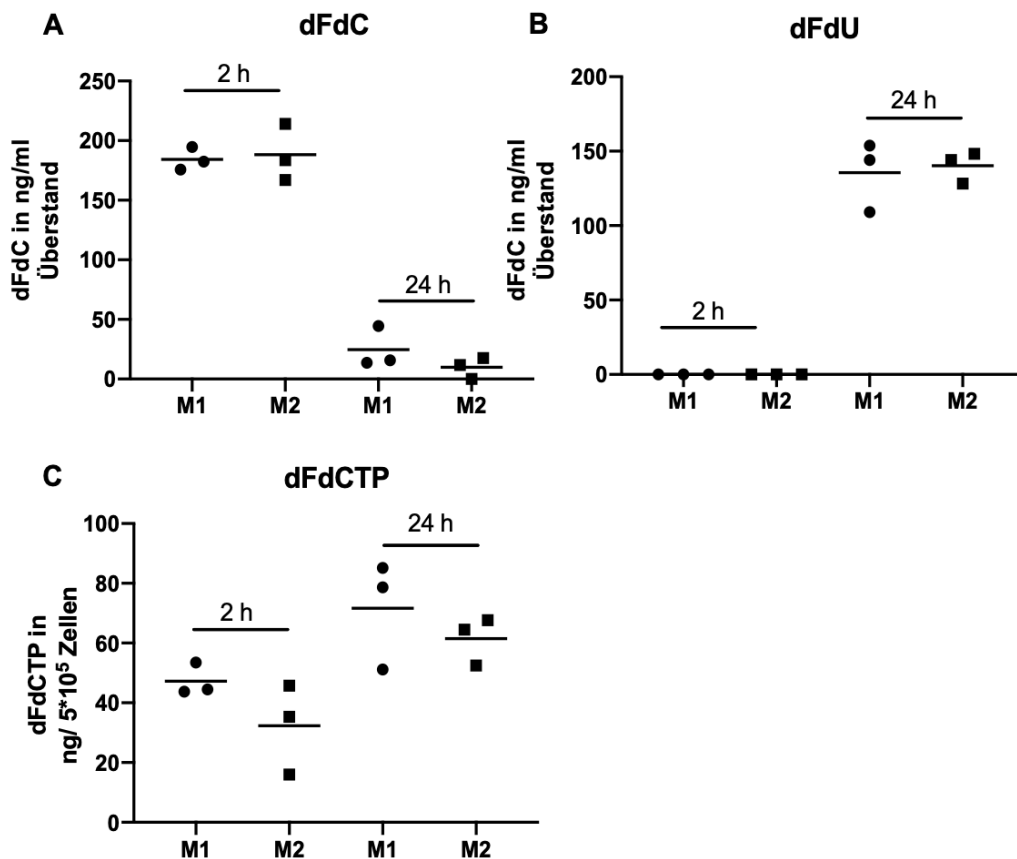


Abbildung 11: Gemcitabininkorporation in humanen Makrophagen und humanen Pankreastumorzellen: LC-MS/MS-Untersuchung von intrazellulärem dFdCTP in humanen aus THP-1 Zellen generierten M1- und M2-Makrophagen und Tumorzellen der Linien L3.6 und BxPC-3. Die Zellen wurden über 2 h mit  $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  Gemcitabin behandelt. Verglichen mit den Pankreastumorzelllinien L3.6 und BxPC-3 ist mehr dFdCTP in den M1- und M2-polarisierten Makrophagen als in den Tumorzelllinien vorhanden. Es wird die mittlere Standardabweichung von drei biologischen Replikaten gezeigt (M1 – L3.6  $p = 0,0214$ ; M2 – L3.6  $p = 0,0013$ ; M2 – BxPC-3  $p = 0,0422$ ).



**Abbildung 12: Gemcitabinmetabolismus von THP-1-M1- und THP1-M2-Makrophagen im zeitlichen Verlauf:** Die Zellen wurden für 2 h oder 24 h mit 1  $\mu$ M Gemcitabin behandelt. (A): Nach 24 h ist die Menge des im Überstand verbliebenen dFdC im Vergleich mit der Messung nach 2 h signifikant gesunken (M1 2 h – M1 24 h:  $p < 0,0001$ ; M2 2 h – M2 24 h:  $p < 0,0001$ ). (B): Nach 2 h ist noch kein dFdU im Überstand nachweisbar, nach 24 h eine ähnlich hohe Menge bei M1- und M2-Zellen (M1 2 h – M1 24 h:  $p < 0,0001$ ; M2 2 h – M2 24 h:  $p < 0,0001$ ). (C): Das nach 2 h vorhandene aktivierte Gemcitabin in den Makrophagen lässt sich nach 24 h in höherer Konzentration nachweisen, der Unterschied ist jedoch nur für M2-Zellen signifikant (M1 2 h – M1 24 h:  $p = 0,0881$ ; M2 2 h – M2 24 h:  $p = 0,0416$ ).

Interessanterweise hatten nach 2 h Inkubation die humanen THP-1-Makrophagen sowohl in M1- als auch in M2-Polarisierung, verglichen mit den Pankreastumorzelllinien L3.6 und BxPC-3, signifikant mehr dFdCTP pro Zelle inkorporiert (Abbildung 11).

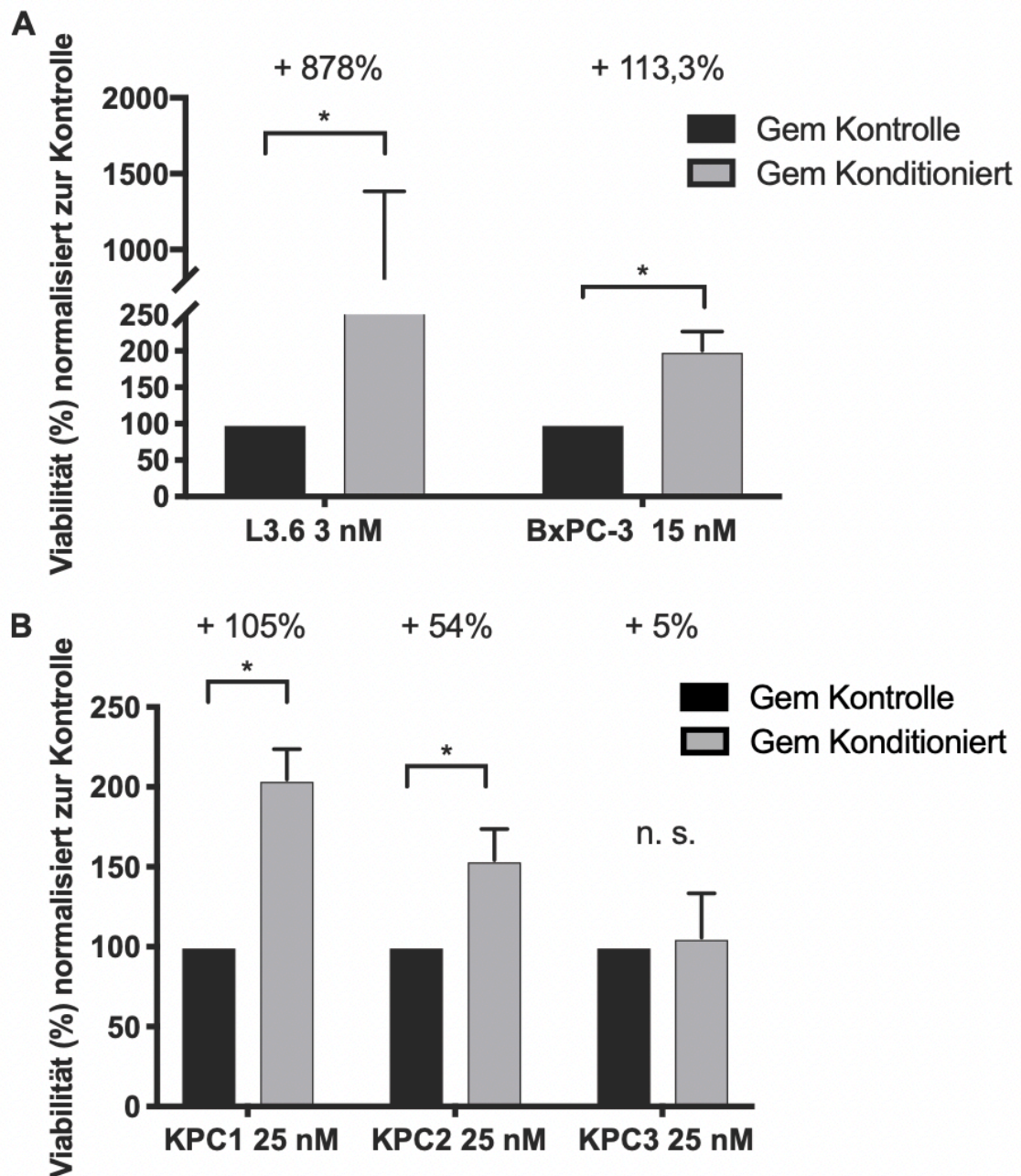
Um den Gemcitabinmetabolismus in THP-1-Makrophagen genauer und über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurde die Menge von dFdC, dFdU und dFdCTP in den M1- und M2-Makrophagen und dem Zellkulturüberstand nach 2 h und 24 h massenspektrometrisch untersucht. Während sich im Verlauf die Umwandlung von dFdC in das inaktivierte dFdU zeigt, verbleibt eine große

Menge dFdCTP in den Makrophagen; die Konzentration steigt zwischen den beiden Messpunkten (Abbildung 12). Zwischen den beiden Subtypen M1 und M2 lassen sich nach 24 h nur geringe Unterschiede feststellen (Abbildung 12).

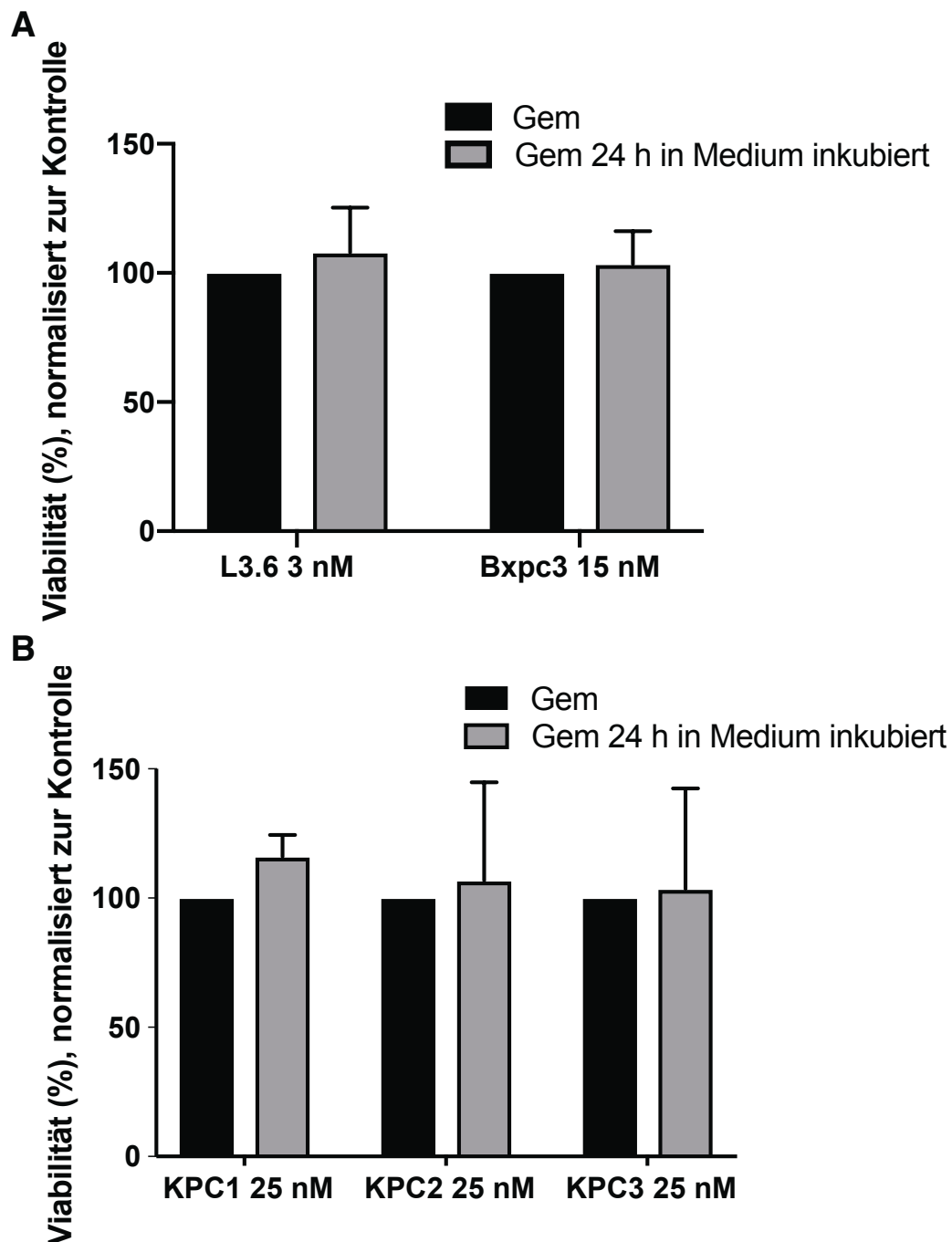
### **3.3 Makrophagen senken das Ansprechen von Tumorzellen auf Gemcitabin in Versuchen mit konditioniertem Medium**

Um zu untersuchen, ob sich die Inaktivierung von Gemcitabin durch Makrophagen auf die Wirksamkeit des Medikaments auf Pankreaskarzinomzellen auswirkt, wurden Tumorzellen mit konditioniertem Medium von THP-1-Zellen behandelt. Dazu wurden die Makrophagen über 24 h mit Gemcitabin inkubiert; anschließend wurde das Medium auf Tumorzellen gegeben und nach weiteren 72 h Inkubation die Viabilität der Tumorzellen mittels MTT-Test gemessen, wie in 2.13.6 und 2.13.7 beschrieben. Zur Kontrolle wurde Medium ohne Gemcitabin mit Makrophagen inkubiert und dann mit frischem Gemcitabin versetzt. Als humane Tumorzellen wurden L3.6 und BxPC-3 genutzt. Die THP-1-Makrophagen in M1-Polarisation waren im Anschluss an die Polarisation bei Versuchen über einen längeren Zeitraum adhärent, weshalb wir diese für unsere Versuche verwendeten. Als murine Zellen benutzten wir die in unserem Labor aus KPC-Mäusen isolierten Tumorzelllinien KPC1, KPC2 und KPC3 in Kombination mit primär aus dem Knochenmark isolierten murinen Makrophagen. Die Behandlung wurde mit einer an der IC50 der verschiedenen Tumorzelllinien orientierten Gemcitabinkonzentration durchgeführt.





**Abbildung 13: Makrophagen senken die Wirkung von Gemcitabin auf humane und murine Tumorzellen in konditioniertem Medium:** 72 h MTT-Viabilitäts-Test von humanen und murinen Pankreastumorzelllinien, entweder mit auf Makrophagen inkubiertem Gemcitabin oder Kontrollmedium behandelt, jeweils mit drei biologisch unabhängigen Replikaten. (A): L3.6-Zellen (IC<sub>50</sub> 3 nM) zeigen einen signifikanten Anstieg der Viabilität um 878%, BxPC-3-Zellen (IC<sub>50</sub> 15 nM) einen signifikanten Anstieg um 113% (L3.6:  $p = 0,0025$ ; BxPC-3:  $p = 0,002$ ). (B): Die KPC1, KPC2 und KPC3 Zelllinien zeigen einen Anstieg der Viabilität um 105% respektive 54% und 5%. Für die Zelllinien KPC1 und KPC2 ist der Anstieg signifikant (KPC1:  $p < 0,0001$ ; KPC2:  $p = 0,0022$ ; KPC3:  $p = 0,97$ ).



**Abbildung 14: 24 h Inkubation von Gemcitabin in Zellkulturmedium:** (A) und (B): 72 h MTT-Viabilitäts-Test von humanen und murinen Pankreastumorzelllinien entweder mit frischem Gemcitabin oder mit 24 h in Leermedium inkubiertem Gemcitabin behandelt. Die Graphen zeigen die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen biologischen Replikaten. Weder für die humanen Zelllinien L3.6 und BxPC-3 noch für die murinen Linien KPC1-3 zeigen sich signifikante Unterschiede in der Viabilität ( $p > 0,05$ ).

Bei den humanen Zelllinien L3.6 (behandelt mit 3 nM Gemcitabin) und BxPC-3 (behandelt mit 15 nM Gemcitabin) kam es zu einem signifikanten Anstieg der mittels MTT gemessenen Viabilität. Bei den murinen Zelllinien KPC1 und KPC2

(behandelt mit 25 nM Gemcitabin) zeigte sich der gleiche Effekt. Die Untersuchung der KPC3-Zellen (behandelt mit 25 nM Gemcitabin) zeigte einen nicht signifikanten Anstieg der Viabilität um 5% (Abbildung 13). In Kombination mit den massenspektrometrischen Untersuchungen der Gemcitabinmetabolite (Abbildung 11, Abbildung 12) lassen diese Ergebnisse erkennen, dass Makrophagen durch Aufnahme und Inaktivierung von Gemcitabin dessen Wirksamkeit auf Tumorzellen signifikant senkt.

Um auszuschließen, dass das Medium allein Gemcitabin inaktiviert, wurde als Kontrolle Gemcitabin für 24 h in Nährmedium bei Kulturbedingungen inkubiert. Hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, sodass eine Inaktivierung durch aktive Faktoren im Medium ausgeschlossen werden kann (Abbildung 14).

Ein weiterer Faktor, der den Versuch beeinflussen könnte, ist die Wirkung von den von THP-1 oder murinen BMDM ausgeschütteten Zytokinen und anderen Metaboliten auf die Viabilität der Tumorzellen. Daher erfolgte ein Vergleich der Behandlung zwischen Leermedium und 24 h auf THP-1 und BMDM konditioniertem Medium. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15).

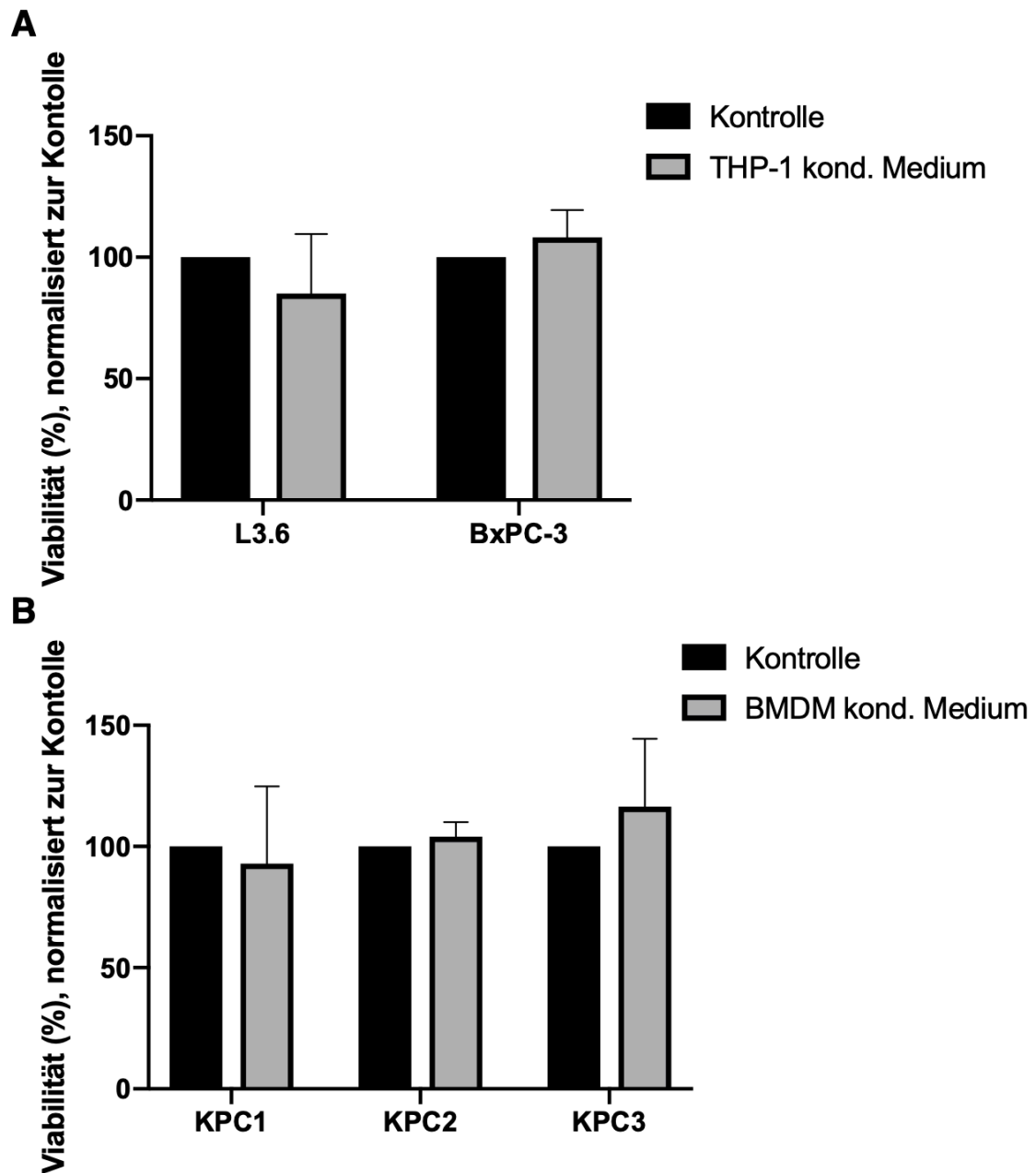


Abbildung 15: PDAC-Zellen zeigen keine veränderte Viabilität nach Behandlung mit Makrophagen-konditioniertem Medium: (A) und (B): 72 h MTT-Viabilitäts-Test von humanen und murinen Pankreastumorzelllinien entweder mit auf Makrophagen inkubiertem Medium oder Kontrollmedium behandelt. Weder für die humanen Zelllinien L3.6 und BxPC-3 noch für die murinen Linien KPC1-3 zeigen sich signifikante Unterschiede in der Viabilität ( $p > 0,05$ ).

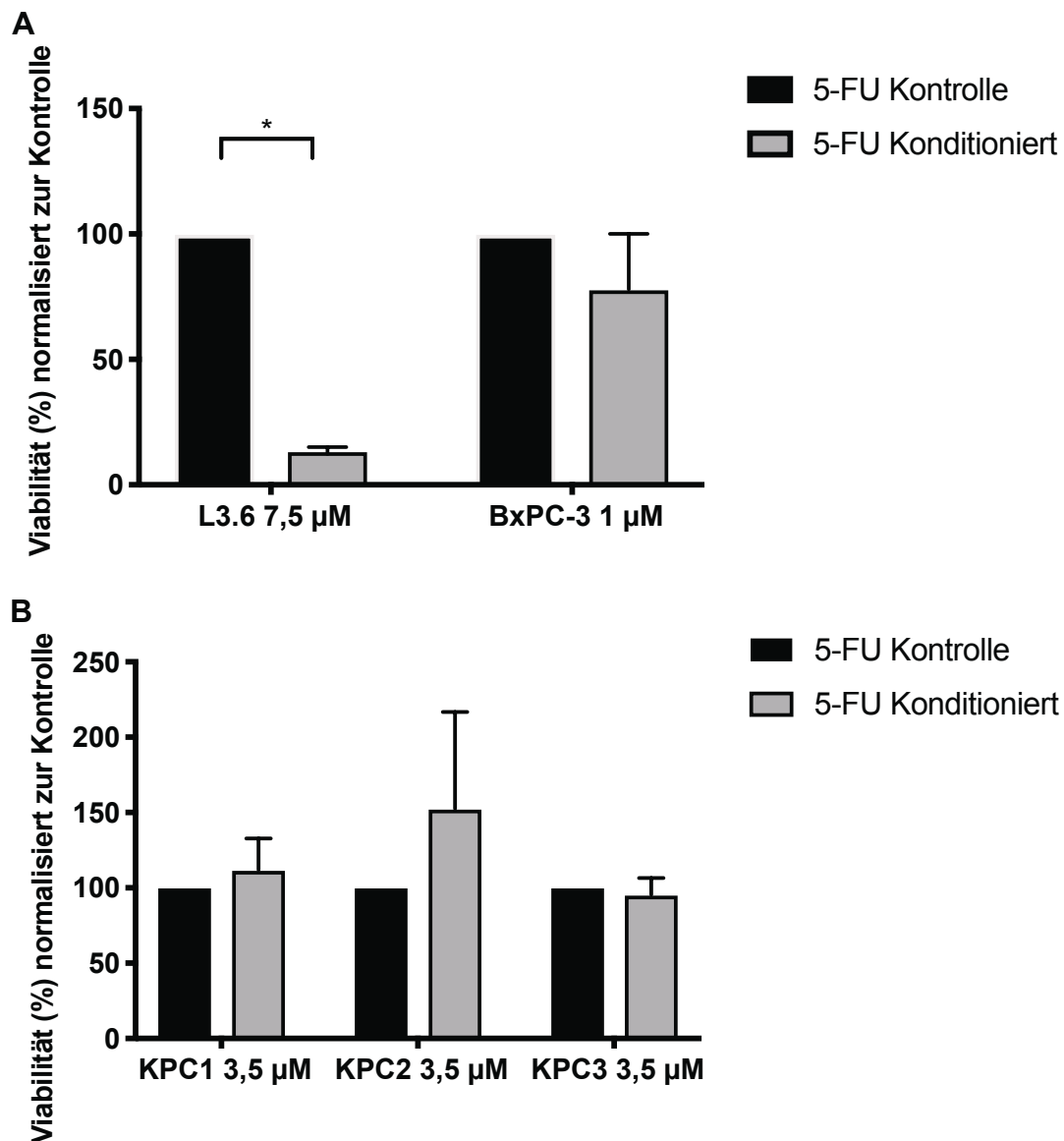
### 3.4 Makrophagen verändern nicht das Ansprechen von Tumorzellen auf 5-FU und Paclitaxel

Gemcitabin ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie des Pankreaskarzinoms (Nesse et al. 2019). Für Patienten in sehr gutem Allgemeinzustand wird jedoch,

wie in 1.1.2 beschrieben, das FOLFIRINOX-Schema zur medikamentösen Therapie des Pankreaskarzinoms angewandt (Conroy et al. 2011; Conroy et al. 2018). Dabei wird als Antimetabolit 5-FU und nicht Gemcitabin eingesetzt. Das Pyrimidinanalogon hemmt unter anderem durch die Fluor-Gruppe verschiedene Enzyme der DNA- und RNA-Synthese (Conroy et al. 2011; Heidelberger et al. 1957). In den nachfolgenden Experimenten wurde daher für 5-FU untersucht, ob es einen für Gemcitabin vergleichbaren Effekt von Makrophagen auf die Viabilität gegenüber Tumorzellen gibt. Dafür wurden der gleiche Versuchsaufbau und die gleichen Zelllinien wie in 3.3 gewählt, auch hier angepasst an die vorher ermittelte IC50 der jeweiligen Zelllinie für 5-FU.

Für 5-FU kam es bei der humanen Zelllinie L3.6 interessanterweise zu einer starken, reproduzierbaren und signifikanten Senkung der Viabilität, die wir mit den bestehenden Modellen nicht erklären können. Für die anderen untersuchten Zelllinien gab es keine signifikanten Unterschiede bei der Behandlung mit dem Makrophagen-inkubierten 5-FU (Abbildung 16). 5-FU ist zwar ebenfalls ein Nukleosidanalogon, wird aber hauptsächlich durch andere Transporter in die Zelle befördert und dort von anderen Enzymen metabolisiert (Alvarellos et al. 2014; Thorn et al. 2011).

Für Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand wird als palliative Therapie in der Regel Gemcitabin mit nab-Paclitaxel kombiniert (Von Hoff et al. 2013). Das Taxan Paclitaxel bindet während der Mitose an  $\beta$ -Tubuline und stört deren Abbau. Dadurch kommt es zu einer Störung der Zellteilung (Fuchs und Johnson 1978; Wani et al. 1971). Um das Medikament besser im Körper zu verteilen, die Toxizität zu verringern und die Löslichkeit zu verbessern, wird es an Albumin gebunden appliziert (Gradishar 2006; Von Hoff et al. 2013; Yardley 2013). Für die Zellkulturversuche haben wir ungebundenes Paclitaxel verwendet, da hier der Transport durch den Körper keine Rolle spielt.



**Abbildung 16: Makrophagen verschlechtern nicht das Ansprechen von 5-FU auf Tumorzellen:** 72 h MTT-Viabilitäts-Test von humanen und murinen Pankreastumorzelllinien entweder mit auf Makrophagen inkubiertem 5-FU oder Kontrollmedium behandelt. (A): Im Vergleich zur Kontrolle mit frischem 5-FU ist die Viabilität bei L3.6-Zellen um 87% gesunken ( $p = 0,00021$ ). Für BxPC-3 zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Viabilität ( $p > 0,05$ ). (B): Für die untersuchten murinen Zelllinien KPC1, KPC2 und KPC3 zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ).

Bei der Konditionierung von Paclitaxel auf Makrophagen und der anschließenden Behandlung von Tumorzellen gab es keine signifikanten Unterschiede der Viabilität zur Kontrolle (Abbildung 17). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Gemcitabin, nicht jedoch 5-FU oder Paclitaxel, durch Makrophagen innerhalb von 24 h metabolisiert und so weit inaktiviert wird, dass die antiproliferative Wirkung auf humane und murine Pankreaskarzinomzellen signifikant reduziert ist.

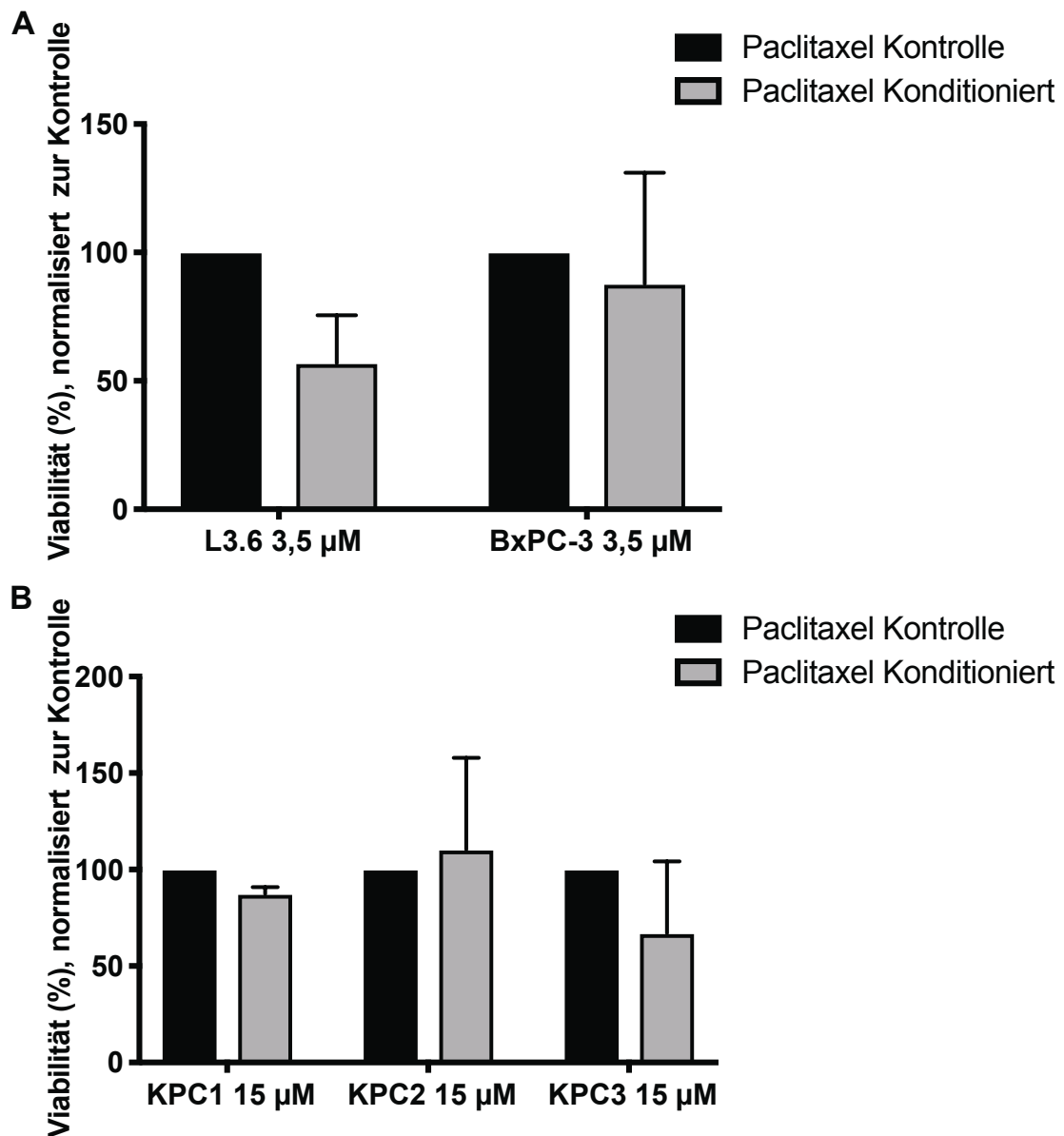


Abbildung 17: Makrophagen verändern nicht das Ansprechen von Paclitaxel auf Tumorzellen: (A) und (B): 72 h MTT-Viabilitäts-Test von humanen und murinen Pankreastumorzelllinien entweder mit auf Makrophagen inkubiertem Paclitaxel oder Kontrollmedium behandelt. Die Viabilität ist weder bei den humanen Tumorzelllinien L3.6 und BxPC-3, noch bei den murinen Linien KPC1, KPC2 und KPC3 signifikant verändert ( $p > 0,05$ ).

### 3.5 Auswirkungen der Depletion von TAM *in vivo*

#### 3.5.1 Langfristige Gabe von liposomalem Clodronat induziert Aszites und erhöht die Mortalität im KC-Mausmodell

Um die Auswirkung der Makrophagendepletion auf die Progression des Pankreaskarzinoms und dessen Vorläuferstufen zu untersuchen, wurden zehn bis zwölf

Wochen alte KC-Mäuse entweder mit Clodronat-Liposomen oder mit PBS-Liposomen als Kontrolle behandelt. KC-Mäuse haben ein mutiertes *Kras*-Allel, das mittels einer *Cre*-Rekombinase spezifisch im Pankreas aktiviert ist. Im Alter von drei Monaten entwickeln die Mäuse im Pankreas ADMs und *Low-grade*-PanINs, die sich nach etwa sechs Monaten zu fortgeschrittenen PanINs entwickeln (Hingorani et al. 2003; Ramu et al. 2019). Unbehandelte KC-Mäuse überleben in unserem Labor im Median 485 Tage (Ramu et al. 2019).

**Tabelle 24:** Klinische Daten der behandelten KC-Mäuse

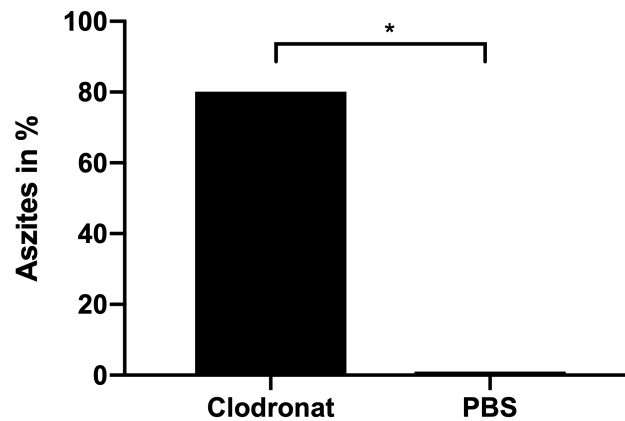
Symptom	Clo (n = 5)	PBS (n = 5)	p-Wert
Aszites	4 (80%)	0	<b>0,0476</b>
Ikterus	1 (20%)	0	> 0,9
Splenomegalie	2 (40%)	1 (20%)	> 0,9

Klinische Daten der mit liposomalem Clodronat (Clo) oder liposomalem PBS behandelten KC-Mäuse. Kachexie, Makrometastasen, Splenomegalie und abdominelle Blutungen traten nicht auf. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Auftreten von Aszites ( $p = 0,0476$ ; exakter Test nach Fisher).

Obwohl eine Behandlung über zehn Wochen mit anschließender Opferung und Untersuchung der Gewebe vorgesehen war, musste der Versuch nach etwa sechs Wochen Behandlungsdauer abgebrochen werden, da die meisten Mäuse in der mit Clodronat-Liposomen behandelten Kohorte Aszites entwickelten (Abbildung 18). Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war signifikant (Tabelle 24). Bei den Mäusen fanden sich erwartungsgemäß keine Primärtumoren oder Makrometastasen.

Aus diesen Gründen führten wir im KPC-Modell nur einen Interventionsversuch über zehn Tage durch und verzichteten auf einen Versuch zum Vergleich der Gesamtüberlebenszeiten abhängig von den Therapieschemata.

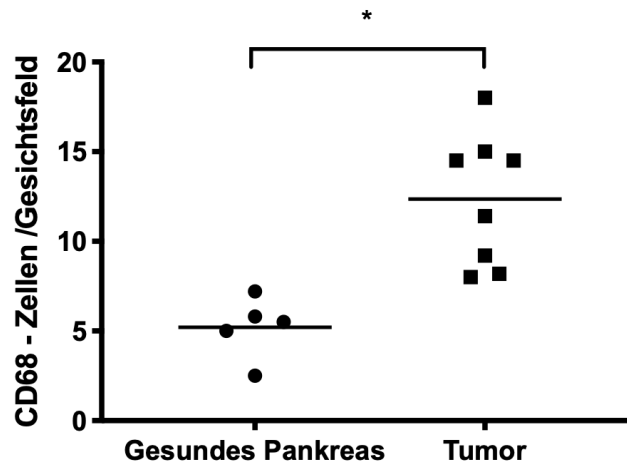




**Abbildung 18: Behandlung mit liposomalem Clodronat führt nach sechs Wochen zu Aszites:** KC-Mäuse wurden entweder mit Clodronat-Liposomen ( $n = 5$ ) oder PBS-Liposomen ( $n = 5$ ) behandelt. Der Therapieversuch musste nach sechs Wochen abgebrochen werden, da 80% der mit Clodronat behandelten Tiere trüben Aszites entwickelten. Dies war bei der Kontrollgruppe nicht der Fall ( $p = 0,0467$ ; exakter Test nach Fischer).

### 3.5.2 In KPC-Tumorgewebe kommt es zu einer Akkumulation von TAM

Da die *In-vitro*-Daten zeigten, dass Makrophagen Gemcitabin metabolisieren und schnell inaktivieren, sollte im Anschluss untersucht werden, ob auch Auswirkungen auf die Behandlung *in vivo* nachweisbar sind. Im murinen und humanen Pankreaskarzinom sind mehr Makrophagen vorhanden als in gesundem Pankreasgewebe. Kürzlich wurde sogar gezeigt, dass Makrophagen mit Monozyten den größten Teil der Zellen im Pankreaskarzinom ausmachen (Clark et al. 2007; Cui et al. 2016; Elyada et al. 2019). Vor der Durchführung weiterer *In-vivo*-Experimente wurde diese Annahme auch für das hier verwendete KPC-Mausmodell experimentell überprüft. Dafür wurden Makrophagen mittels CD68-Immunhistochemie im murinen Pankreas quantifiziert. Im Tumorgewebe waren signifikant mehr Makrophagen nachweisbar als im gesundem Pankreasgewebe (Abbildung 19). Das spricht dafür, dass Makrophagen im Tumor einen stärkeren Einfluss auf den Gemcitabinstoffwechsel nehmen können.



**Abbildung 19: In Tumorgewebe sind signifikant mehr Makrophagen vorhanden als im gesunden Pankreas:** Es wurden gesundes Pankreasgewebe (n = 5) sowie Pankreaskarzinome (n = 8) mit je fünf zufälligen Gesichtsfeldern auf CD68-positive Zellen untersucht. Im Tumor sind signifikant mehr Makrophagen vorhanden ( $p < 0,002$ ).

### 3.5.3 Liposomales Clodronat depletiert Makrophagen im KPC-Mausmodell

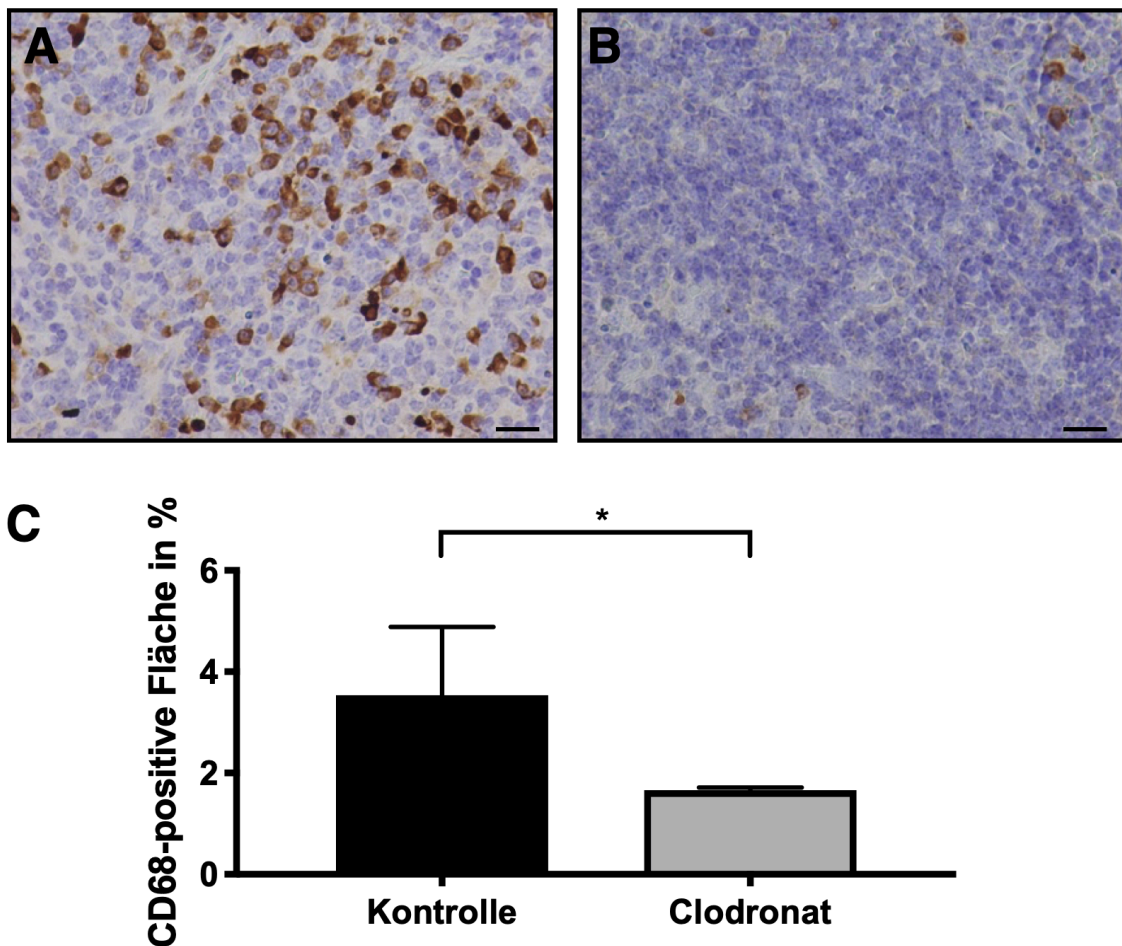
Liposomales Clodronat ist in präklinischen Versuchen zur Depletion von Makrophagen etabliert. Dabei werden abhängig von der Applikationsform bestimmte Makrophagenpopulationen gezielt angegriffen. Das geschieht etwa bei intranasaler Applikation zur Depletion von Alveolarmakrophagen oder bei Synovialphagozyten durch intraartikuläre Injektion (van Rooijen und Sanders 1994; van Rooijen und van Kesteren-Hendriks 2003). Für eine globale Depletion von Makrophagen werden diese entweder i. v. oder i. p. appliziert. Die Depletion von TAM wurde außer im Pankreaskarzinom u. a. im NSCLC, im Rhabdomyosarkom und im Ovarialkarzinom angewendet, um die Interaktion von TAM und Tumorzellen zu untersuchen (Baert et al. 2019; Downey et al. 2014; Griesmann et al. 2017; Krug et al. 2018; van Rooijen und van Kesteren-Hendriks 2003; Zeisberger et al. 2006). Im KPC-Mausmodell führt die durch Clodronat-Liposomen vermittelte Depletion von Makrophagen zu weniger Metastasen (Griesmann et al. 2017). Die Auswirkungen der Makrophagendepletion auf die Gemcitabintherapie im Pankreaskarzinom wurde bisher nicht untersucht.

Liposomales Clodronat wird von Makrophagen mittels Endozytose aufgenommen. Im Anschluss fusionieren die Liposomen mit Lysosomen, die aus Phospholipiden aufgebaute Liposomenwand wird durch Phospholipasen aufgelöst und das wasserlösliche Clodronat wird freigesetzt (Naito et al. 1996; van Rooijen und Sanders 1994). Der genaue Wirkmechanismus der Makrophagendepletion

durch das freigesetzte Clodronat ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird jedoch diskutiert, dass durch die Bindung von intrazellulärem Calcium und Eisen durch das Clodronat die Apoptose induziert wird (Naito et al. 1996; van Rooijen et al. 1996).

Um die Auswirkung von liposomalem Clodronat und Gemcitabin bei fortgeschrittenen Karzinomen experimentell zu untersuchen, wurden KPC-Mäuse wöchentlich palpiert und bei tumorverdächtigem Tastbefund dieser sonografisch detektiert und volumetrisch vermessen. Wenn Tumore mit einer Ausdehnung von mindestens 5 mm in einer Achse diagnostiziert wurden, erfolgte der Studieneinschluss (siehe 2.15.2). Die Behandlung fand entweder mit Clodronat-Liposomen und Gemcitabin kombiniert oder als Monotherapie mit Clodronat-Liposomen oder Gemcitabin statt.

Die Depletion wurde über zehn Tage mit insgesamt vier Dosen Clodronat-Liposomen durchgeführt (siehe 2.15.3). Zur Überprüfung der systemischen Depletion in den behandelten Mäusen wurde der Anteil von Makrophagen in der Milz immunhistochemisch untersucht und quantifiziert. Erwartungsgemäß induzierte liposomales Clodronat eine signifikante Depletion von TAM (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Liposomales Clodronat depletiert Makrophagen in der Milz im KPC-Mausmodell:** KPC-Mäuse wurden über zehn Tage entweder mit Clodronat-Liposomen i. p. (n = 4) behandelt oder in der Kontrollgruppe im gleichen Stadium geopfert (n = 4). (A) und (B): Repräsentative Bilder der CD-68-Färbung der Kontrolle (A) und der behandelten Tiere (B). Maßstab: 50  $\mu$ m. (C): Nach Behandlung mit liposomalem Clodronat kam es gegenüber der Kontrolle zu einer Senkung der makrophagenspezifischen CD-68-positiven Fläche um 52,9% (p = 0,0321).

### 3.5.4 Klinische Auswirkungen der Depletion von Makrophagen im KPC-Mausmodell

Zu Beginn der Behandlung an Tag eins, im Verlauf der Behandlung an Tag fünf und vor der Opferrung der Tiere an Tag zehn wurde das Tumolvolumen sonografisch bestimmt (siehe 2.15.2). Bei den nicht mit Gemcitabin behandelten Mäusen wurden öfter die Abbruchkriterien erreicht, sodass sie vor Erreichen des letzten Behandlungstages geopfert werden mussten. Von den acht nur mit liposomalem Clodronat behandelten Mäusen wurden drei wegen des Erreichens der Abbruchkriterien vor Ende der geplanten Behandlungsdauer getötet, eine Maus

starb a. e. an einer unerwarteten abdominalen Blutung, bevor der letzte Behandlungstag erreicht war. Zwischen den Gruppen zeigten sich hinsichtlich der Symptome und des Abbruchs keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 25).

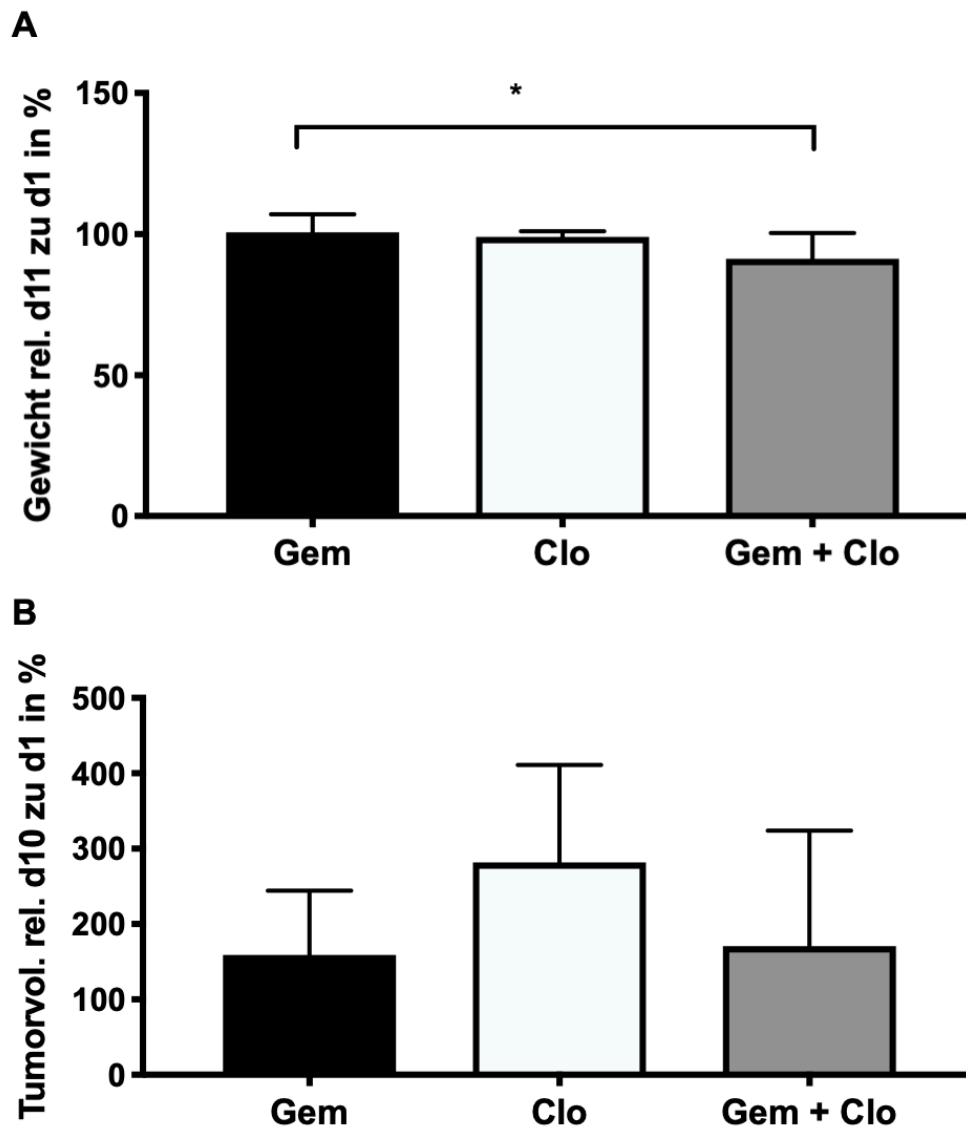
**Tabelle 25:** Klinische Daten der behandelten KPC-Mäuse

	<b>Gem (n = 10)</b>	<b>Clo (n = 8)</b>	<b>Gem + Clo (n = 9)</b>
Abbruch vor Tag zehn	4 (40%)	4 (50%)	2 (22%)
Aszites	2 (20%)	2 (25%)	1 (11%)
Ikterus	1 (10%)	2 (25%)	0
Intraabdominelle Blutungen	1 (10%)	2 (25%)	1 (11%)
Kachexie	1 (10%)	2 (26%)	0
Makrometastasen	5 (50%)	4 (50%)	3 (33%)
Splenomegalie	2 (20%)	1 (13%)	1 (11%)

Klinische Daten der KPC-Mäuse, die mit Gemcitabin (Gem), Clodronat-Liposomen (Clo) oder einer Kombination behandelt wurden. Zwischen den Kohorten gibt es keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ; Exakter Test nach Fisher).

Im Weiteren wurden die Tiere, die die komplette Dauer des Experiments überlebten, analysiert. Die Mäuse, die mit der Kombination von Gemcitabin und liposomalem Clodronat behandelt wurden, hatten am Ende der Behandlung 10% ihres Gewichtes verloren, während das Gewicht der nur mit Gemcitabin behandelten Tiere im Mittel nahezu unverändert blieb (Abbildung 21).

Das Tumolvolumen der Tiere, die entweder mit der Monotherapie Gemcitabin oder mit der Kombination von Clodronat-Liposomen und Gemcitabin behandelt wurden, war kleiner als in der Vergleichsgruppe mit alleiniger Clodronat-Liposomen-Behandlung. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 21).



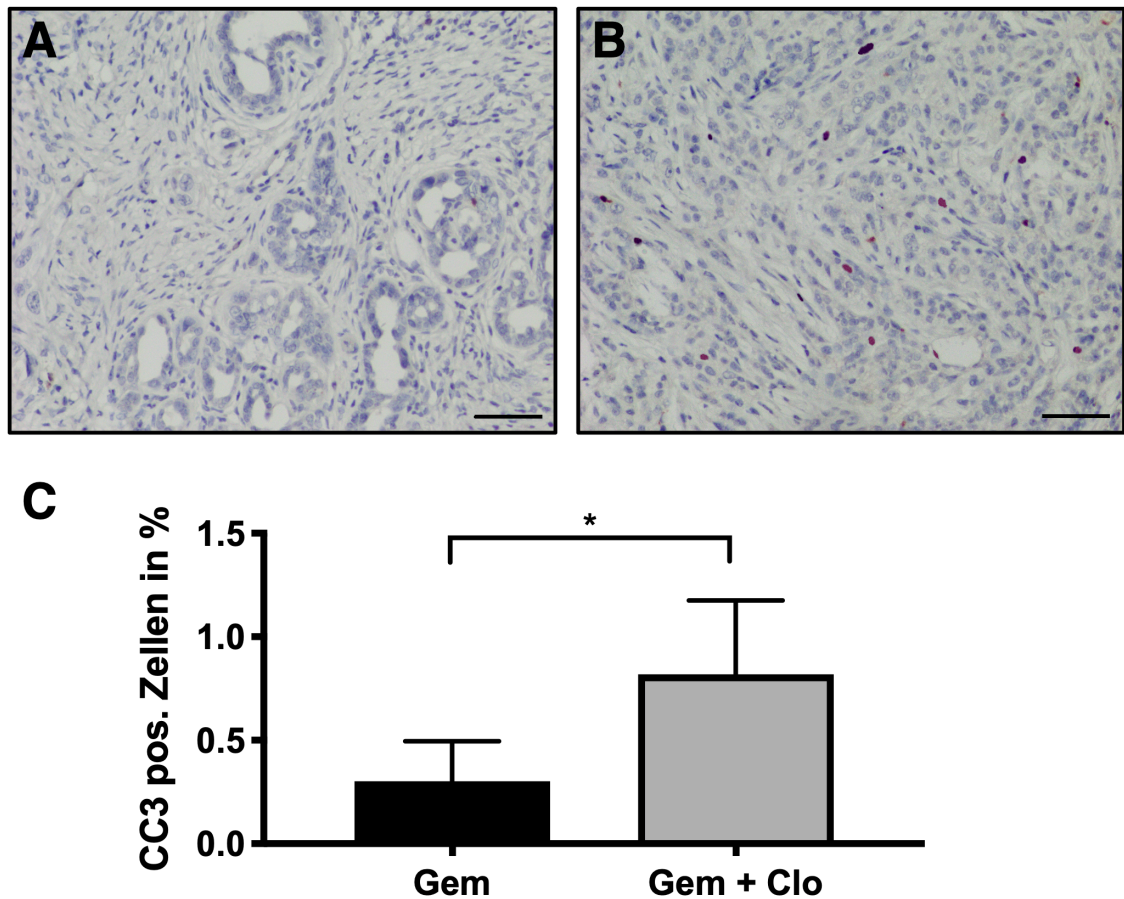
**Abbildung 21: Vergleich klinischer Parameter zwischen liposomalem Clodronat, Gemcitabin und der Kombinationstherapie:** KPC-Mäuse wurden entweder mit Gemcitabin-Monotherapie ( $n = 6$ ), einer Kombination aus Gemcitabin und Clodronat ( $n = 7$ ) oder Clodronat ( $n = 4$ ) behandelt. (A): Während die Mäuse der Gemcitabin-Kohorte ihr Gewicht hielten, verloren die Mäuse, die mit Gemcitabin und Clodronat behandelt wurden, etwa 10% Gewicht; der Unterschied zwischen den beiden Kohorten ist signifikant ( $p = 0,0379$ ), die Unterschiede zwischen den anderen Kohorten sind nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). (B): Die mit Gemcitabin behandelten Tiere zeigen ein relativ zum Beginn der Behandlung kleineres Tumolvolumen verglichen mit der Clodronat-Liposomen-Kohorte. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

### 3.5.5 Makrophagendepletion führt zu verstärkter Gemcitabin-induzierter Apoptose

Um die Auswirkungen der Makrophagendepletion auf die Gemcitabinbehandlung *in vivo* zu untersuchen, wurde die Apoptose- und Proliferationsrate nach

Beendigung der Therapie in den murinen KPC-Tumoren immunhistochemisch bestimmt.

Gemcitabin wird als Antimetabolit in die DNA aufgenommen, wodurch die DNA-Synthese unterbrochen wird (Alvarellos et al. 2014; Burris et al. 1997). Anschließend wird durch verschiedene Signalwege Caspase 3 gespalten und so aktiviert. Das Produkt CC3 zeigt, welche Zellen sich in Apoptose befinden (Alnemri et al. 1996; Perry et al. 1997). Eine CC3-Färbung zeigt also das histologische Korrelat dieses Prozesses. Nach der Färbung wurden Bilder aus zufällig ausgewählten Abschnitten des Tumors mikroskopisch aufgenommen. Zur semiautomatischen Auswertung wurden alle Zellen eines Gesichtsfelds mit ImageJ quantifiziert und anschließend die CC3-positiven Zellen manuell gezählt. Die Auswertung war verblindet, sodass die Zuordnung der Behandlungskohorten durch den Untersucher nicht möglich war. Bei den behandelten KPC-Mäusen zeigte sich, dass die Kombination von Gemcitabin mit liposomalem Clodronat einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen induzierte (Abbildung 22). Dieses Ergebnis bestätigt den günstigen Therapieeffekt der Makrophagendepletion in Kombination mit Gemcitabin im genetisch modifiziertem Mausmodell des Pankreaskarzinoms.



**Abbildung 22: Makrophagendepletion verstärkt Gemcitabin-induzierte Apoptose:** (A) und (B): Immunhistochemische Quantifikation von CC3 in KPC-Tumorgewebe, die entweder mit Gemcitabin (A) ( $n = 6$ ) oder einer Kombination aus Gemcitabin und Clodronat-Liposomen (B) ( $n = 4$ ) behandelt wurden. Maßstab  $50 \mu\text{m}$ . (C): Die Doppelbehandlung führt zu einer signifikanten Erhöhung der CC3-positiven Zellen ( $p = 0,0215$ ).

Ein weiterer Parameter, um die Wachstumsaktivität von Tumoren und das Ansprechen von Chemotherapie zu ermitteln, ist der Proliferationsindex, der als Quotient aus Ki-67 positiven Zellen und allen vorhandenen Zellen definiert ist. Ki-67 ist ein kernständiges Protein, das eine wichtige Rolle für die Zellproliferation spielt. Es ist während aller aktiven Phasen des Zellzyklus nachweisbar, aber in der S-Phase nicht vorhanden (Gerdes et al. 1984). Dadurch ist es hervorragend für den immunhistochemischen Nachweis von Proliferation geeignet. Ki-67 wird auch im klinischen Alltag zur Messung der Proliferationsaktivität von Pankreaskarzinomen verwendet (Stanton et al. 2003).

Beim Vergleich der Proliferationsrate nach Gemcitabin-Monotherapie und Kombinationstherapie mit liposomalem Clodronat konnte man jedoch keinen signifikanten Unterschied feststellen (Abbildung 23).



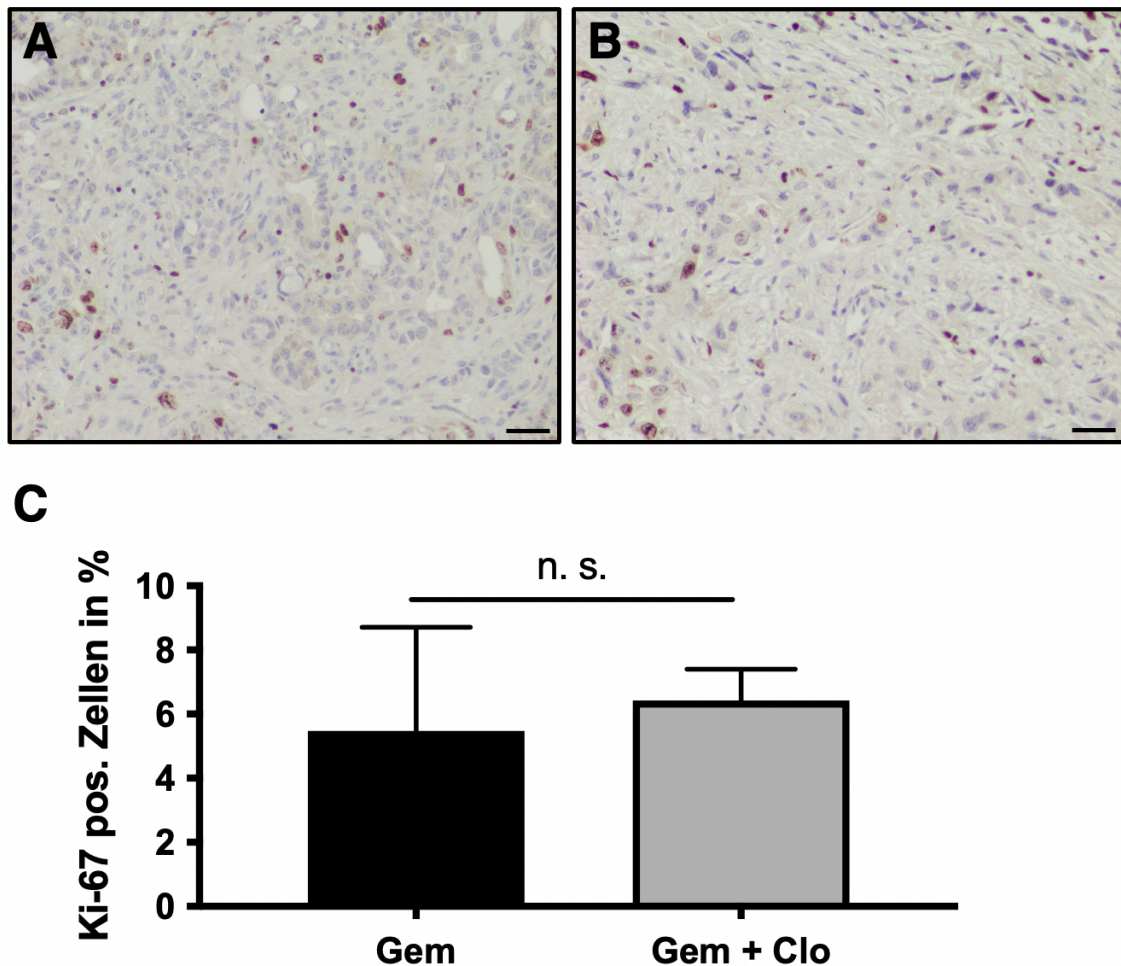
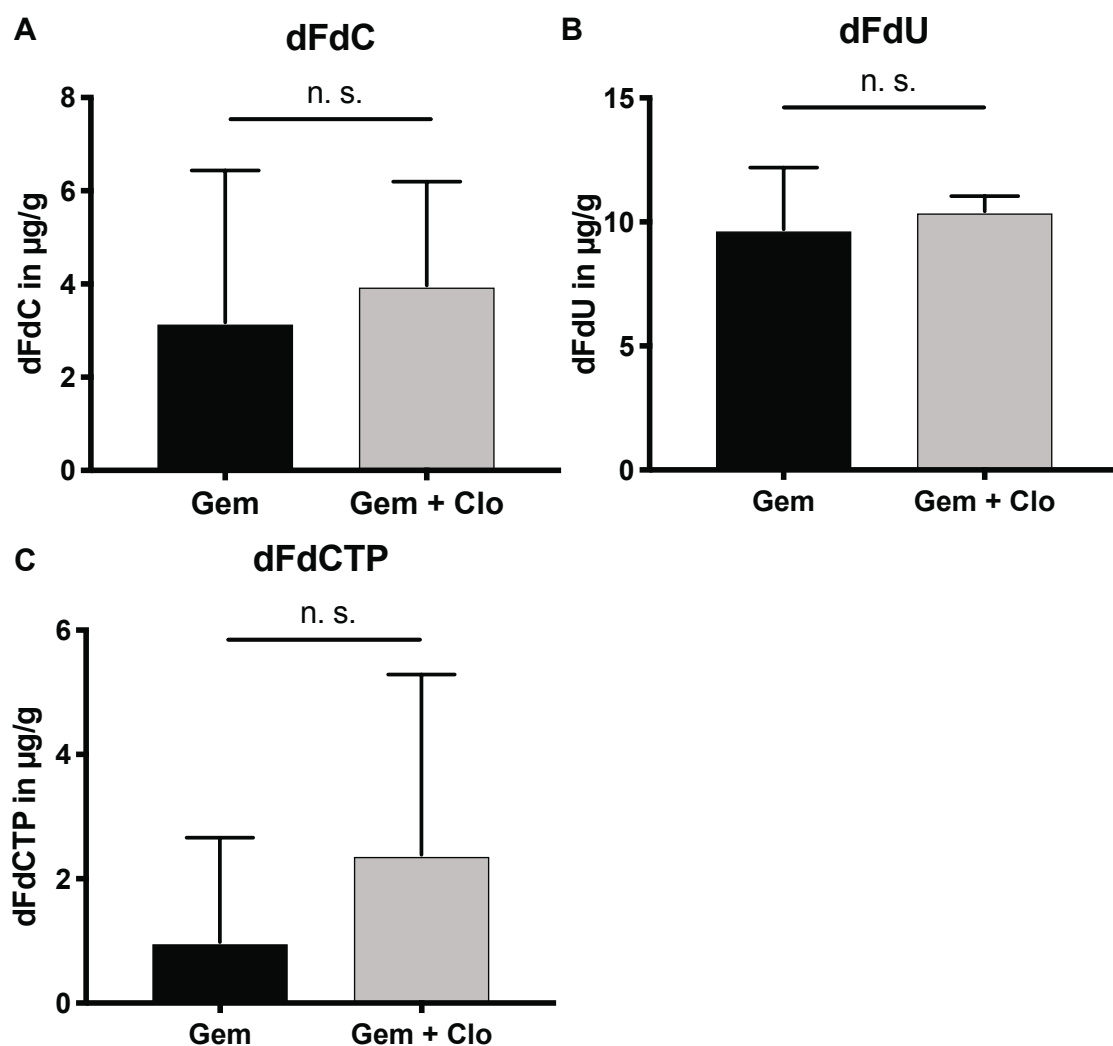


Abbildung 23: Makrophagendepletion führt zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferation bei Gemcitabinbehandlung: (A) und (B): Immunhistochemische Quantifikation von Ki-67 in KPC-Tumoren, die entweder mit Gemcitabin (A) ( $n = 6$ ) oder einer Kombination aus Gemcitabin und Clodronat-Liposomen (B) ( $n = 4$ ) behandelt wurden. Maßstab  $50 \mu\text{m}$ . (C): Quantifikation der Ki-67-positiven Zellen: Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate ( $p > 0,05$ ).

### 3.5.6 Quantitative Bestimmung von Gemcitabinmetaboliten nach Clodronat-Therapie *in vivo* mittels LC-MS/MS

Im *In-vitro*-Versuch mit konditioniertem Medium konnten wir zeigen, dass Makrophagen Gemcitabin so metabolisieren, dass es den Tumorzellen nicht mehr zur Verfügung steht und diese infolgedessen stärker proliferieren. Für den Metabolismus von Gemcitabin spielen allerdings auch zahlreiche andere Faktoren im Tumor und im Organismus eine Rolle, die sich in einem Co-Kultur-Modell nicht nachbilden lassen. Folglich sollte untersucht werden, ob dieser Einfluss auch in der Zusammensetzung der Gemcitabinmetaboliten *in vivo* nachweisbar ist. Dazu wurde 2 h vor der Opfierung der Mäuse eine Standarddosis von  $100 \text{ mg/kg}$  Gemcitabin *i. p.* appliziert (siehe 2.15.3). Untersuchungen im KPC-Mausmodell

haben gezeigt, dass nach 2 h die höchsten Konzentrationen von aktiviertem Gemcitabin (dFdCTP) intratumoral erreicht werden und auch die antineoplastische Wirksamkeit nach dieser Zeit ihren Höhepunkt erreicht (Bapiro et al. 2011; Neesse et al. 2013). In den hier durchgeführten Behandlungen führte die therapeutische Depletion von Makrophagen zu einer Erhöhung sowohl von nativem Gemcitabin (dFdC) als auch von dessen aktivem Metaboliten dFdCTP. Der Unterschied war bei je sechs untersuchten Mäusen pro Kohorte jedoch nicht signifikant. Bei den Werten von intratumoralem dFdU, einem inaktivierten Metaboliten von Gemcitabin, war ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellbar (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Untersuchung von Tumorbiospien nach Makrophagendepletion mittels LC-MS/MS:** (A), (B) und (C): Tumorbiospien von mit Gemcitabin (n = 6) oder Gemcitabin und liposomalem Clodronat (n = 6) behandelten KPC-Mäusen wurden 2 h nach der letzten Injektion von 100 mg/kg Gemcitabin massenspektrometrisch auf dFdC (A), dFdU (B) und dFdCTP (C) untersucht. Gemcitabin, die inaktivierte Form dFdU und die aktivierte Form dFdCTP waren zwischen den Kohorten nicht signifikant verändert ( $p > 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Chemotherapieresistenz im Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist einer der tödlichsten soliden Tumore. Eine kurative Chemotherapie ist nicht verfügbar. Die Fortschritte, die in den letzten Jahren und Jahrzehnten in der klinischen medikamentösen Therapie gemacht wurden, sind überschaubar. Die Überlebenszeit von Patienten mit nicht resektablen Tumoren im Stadium 4 beträgt mit der seit 1997 etablierten Gemcitabin-Therapie im Median 6,8 Monate. Das heute aktuelle FOLFIRINOX-Schema verlängert diesen Zeitraum auf 11,1 Monate (Conroy et al. 2011). Daher überrascht es nicht, dass die Frage nach den Ursachen der Chemotherapieresistenz dieses Tumors immer mehr Forschungsgruppen beschäftigt.

#### 4.1.1 Das *tumor microenvironment* als biophysikalische Barriere

Bei der Betrachtung von Studien zur Wirkung von Chemotherapie auf das Pankreaskarzinom fällt auf, dass das schlechte Ansprechen im Menschen und im Mausmodell im Widerspruch zur guten Wirkung der klassischen Chemotherapeutika wie Gemcitabin *in vitro* steht (Burris et al. 1997; Marten et al. 2008; Schwarz et al. 1999). Aus diesem Grund rückte in den vergangenen Jahren die Rolle des TME immer stärker in den Fokus. Zahlreiche Gruppen untersuchten die Rolle des Stromas als biophysikalische Barriere. Kernhypothese war, dass die desmoplastische Reaktion durch PSCs und azelluläre Komponenten wie Hyaluronsäure und Kollagen sowie eine Erhöhung des interstitiellen Drucks durch Verminderung der Blutversorgung eine effektive Behandlung verhindern (Neesse et al. 2019; Olive et al. 2009; Provenzano et al. 2012). Präklinische Versuche, das Stroma durch den Angriff auf den Sonic-Hedgehog-Signalweg mittels Inhibition des membranständigen Proteins Smoothed zu depletieren und so den Transport der Medikamente zu verbessern, zeigten anfangs Wirkung. Spätere Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, dass eine Inhibition von Smoothed sogar zu einer Verkürzung der Lebensdauer im Mausmodell führt (Olive et al. 2009; Rhim et al. 2014). Klinische Studien, die die Wirksamkeit dieses Ansatzes untersuchten, fanden keinen zusätzlichen therapeutischen Nutzen. Eine Studie musste aufgrund einer verschlechterten Überlebensrate sogar vorzeitig abgebrochen werden (Catenacci et al. 2015; Kim et al. 2014).

Dazu kommt, dass Gemcitabin im Vergleich zu zielgerichteten Therapeutika wie monoklonalen Antikörpern sehr klein ist ( $< 1$  nm) (Alvarellos et al. 2014; Neesse et al. 2019). In Xenograft-Mäusen konnte gezeigt werden, dass bei einem Partikeldurchmesser von 30 nm Pankreaskarzinome ähnlich effektiv die Substanz anreichern wie gut durchblutete Kolonkarzinome (Cabral et al. 2011). Diese Daten implizieren, dass ein reduzierter Transport von Gemcitabin zur Tumorzelle nicht das führende Problem für dessen Unwirksamkeit *in vivo* zu sein scheint.

Insgesamt scheint die Funktion des Stromas als biophysikalische Barriere ein möglicher Faktor für die Chemotherapieresistenz zu sein; das Phänomen ist allerdings noch nicht vollständig verstanden.

#### **4.1.2 Die Metabolisierung von Gemcitabin durch Zellen des *tumor microenvironment***

Die Metabolisierung von Chemotherapeutika, insbesondere Gemcitabin, durch das TME ist bisher nur wenig erforscht. In den letzten Jahren gab es jedoch neue Erkenntnisse, die darauf hindeuten, dass die Aufnahme von Gemcitabin in Fibroblasten oder sogar Bakterien für die Resistenz eine große Rolle spielen (Geller et al. 2017; Hessmann et al. 2018). Außerdem wurde gezeigt, dass Makrophagen durch Enzymregulation sowie die Exkretion von Pyrimidinen die Wirksamkeit von Gemcitabin auf Pankreastumorzellen senken (Halbrook et al. 2019; Weizman et al. 2014).

Da Gemcitabin ein Nukleosidanalogue ist, kann es von jeder Zelle metabolisiert werden. Die Expression von verschiedenen aktivierenden und inaktivierenden Enzymen sowie Nukleosidtransportern in Tumorzellen ist relevant für die Prognose des Pankreaskarzinoms; die Expression von hENT1, dCK und CDA vor Therapiebeginn korreliert mit dem Gesamtüberleben bei Gemcitabintherapie (Amrutkar und Gladhaug 2017; Frese et al. 2012; Kroep et al. 2002; Spratlin et al. 2004).

Unsere Arbeitsgruppe konnte im KPC-Mausmodell bereits zeigen, dass CAFs Gemcitabin intrazellulär aufnehmen und nicht mehr freisetzen und so das Therapieansprechen im Pankreaskarzinom möglicherweise abschwächen. Gemcitabin (dFdC) wird über Transportproteine wie hENT1 und hENT2 in die Zellen aufgenommen und zum Nukleotidanalogue dFdCMP phosphoryliert, das die Zelle nicht mehr über Transportproteine verlassen kann. Während bei anderen Zellarten die Enzymfamilie NT5C eine Hydrolyse von dFdCMP zurück zu dFdC

katalysiert, sind diese Enzyme in CAFs kaum exprimiert, sodass die Gemcitabinmetabolite nicht mehr aus den Zellen transportiert werden können und sich anreichern (Abbildung 1). Zum Nachweis dieses Mechanismus wurde NT5C1A in CAFs rekombinant überexprimiert; anschließend war der beschriebene *Scavenging*-Mechanismus nicht mehr vorhanden (Hessmann et al. 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, wie sich eine rekombinante Expression von NT5C1A in Makrophagen auswirkt. Dieses Experiment sowie eine ausführliche Charakterisierung des Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen ist zur weiteren Überprüfung der hier vorgestellten Thesen notwendig.

#### 4.1.3 Makrophagen und Gemcitabinresistenz

Einige Studien zeigen, wie Makrophagen die Gemcitabinresistenz im Pankreaskarzinom erhöhen. Ireland und Kollegen beschreiben, dass Makrophagen und Myofibroblasten im Pankreaskarzinom *insulin like growth factors* (IGFs) sezernieren und dadurch die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Gemcitabin erhöhen. *In vivo* reduzierten die Autoren mittels antikörpervermittelter Blockade von IGF diese Wirkung und konnten zeigen, dass das Tumorwachstum nach Gemcitabinbehandlung stärker gehemmt wird (Ireland et al. 2016). Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Makrophagen, nicht aber Myofibroblasten depletiert wurden, ist davon auszugehen, dass die Tumorzellen weiterhin durch IGFs beeinflusst werden und der beschriebene Effekt, wenn überhaupt, nur teilweise eintritt. Der isolierte Effekt einer Makrophagendepletion auf die IGF-Blockade *in vivo* wurde bisher nicht untersucht.

Eine weitere Studie zeigt, wie Makrophagen mittels Sekretion von etwa 90 nm großen Vesikeln mit Pankreaskarzinomzellen kommunizieren. Über diese Vesikel wird microRNA (miRNA) transferiert, die den Pyrimidinmetabolismus in Tumorzellen beeinflusst und so die Gemcitabinresistenz des Tumors erhöht (Binenbaum et al. 2018). Andere Untersuchungen zeigen, dass Makrophagen direkt Pyrimidine sezernieren, welche kompetitiv die Phosphorylierung von Gemcitabin durch dCK hemmen und so dessen Wirksamkeit im Pankreaskarzinom senken (Halbrook et al. 2019).

## 4.2 Auswirkungen von Makrophagen auf die Gemcitabintherapie *in vitro*

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Analyse des Ansprechens von Tumorzellen auf durch von Makrophagen konditioniertes Medium *in vitro*. Darüber hinaus wurde *in vivo* untersucht, wie sich die pharmakologische Depletion von Makrophagen auf die Gemcitabintherapie der murinen Pankreaskarzinome auswirkt.

Makrophagen bilden im Tumorstroma des Pankreas, verglichen etwa mit angrenzendem Gewebe oder Tumorstufen, einen großen Anteil der vorhandenen Zellen; in humanen Pankreaskarzinomproben waren myeloide Zellen wie Makrophagen die größte Subpopulation aller Zellen (Clark et al. 2007; Elyada et al. 2019; Hu et al. 2016). Zudem konnte *in vivo* gezeigt werden, dass die Behandlung mit Gemcitabin zu einer verstärkten Einwanderung von Makrophagen führt (Amrutkar und Gladhaug 2017). Die direkte Metabolisierung von Gemcitabin durch Makrophagen wurde bisher nicht beschrieben.

Gemcitabin wird sowohl in DNA als auch in RNA inkorporiert; der zytotoxische Effekt ist allerdings in erster Linie auf die Inhibierung der DNA-Synthese im Rahmen der Replikation zurückzuführen (Huang et al. 1991). Studien zeigen, dass Gemcitabin nur in geringen Mengen in RNA inkorporiert wird und dass der Effekt auf die RNA-Synthese vernachlässigbar gering ist (Huang et al. 1991; Ruiz van Haperen et al. 1993). Die hier untersuchten differenzierten und polarisierten THP-1-Makrophagen proliferieren nach der Differenzierung nicht mehr. Daher ist davon auszugehen, dass sich die Wirkung von Gemcitabin auf diese in Grenzen hält. Untersuchungen dazu gibt es jedoch nicht.

### 4.2.1 Stoffwechselprofil und LC-MS/MS-Untersuchungen von Makrophagen

In den hier durchgeführten Experimenten wurde erstmalig der Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen und Tumorzellen mittels LC-MS/MS charakterisiert. Als Messzeitpunkt wurde 2 h nach Inkubationsbeginn gewählt, analog zum Tötungszeitpunkt der mit Gemcitabin behandelten Mäuse. Verglichen mit den humanen Tumorzelllinien L3.6 und BxPC-3 haben M1- und M2-Makrophagen nach LC-MS/MS-Messung mehr Gemcitabin aufgenommen. Das ist beachtlich, da die differenzierten Makrophagen im Gegensatz zu kultivierten Tumorzelllinien nicht mehr proliferieren.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen massenspektrometrischen Analysen sind zwar auf der einen Seite sehr genau und nutzen ein etabliertes Verfahren (Bapiro et al. 2011; Bapiro et al. 2014), auf der anderen Seite handelt es sich dabei immer um eine Momentaufnahme eines definierten Zeitpunktes. Die Untersuchung mit höherer zeitlicher Auflösung bei gleicher Genauigkeit ist nur durch eine Wiederholung der Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten möglich; der Aufwand wird damit vervielfacht. Daher haben wir in dieser Arbeit nur die im Zentrum der Untersuchung stehenden Makrophagen und deren Medium nach 24 h noch einmal untersucht. Während nach 2 h kein inaktiviertes dFdU messbar ist, zeigen sich nach 24 h größere Mengen im behandelten Medium. Reziprok zeigt sich weniger natives Gemcitabin (dFdC) im Medium nach 24 h als Ausdruck einer schnellen Aktivierung von Gemcitabin durch die THP-1-Makrophagen.

Die mittels LC-MS/MS gemessene Konzentration der verschiedenen Gemcitabinmetabolite nach Inkubation über 24 h mit 1  $\mu$ M Gemcitabin ähneln sich für M1- und M2-polarisierte Makrophagen stark. Das ist interessant, da M2-Makrophagen als eher tumorfördernd beschrieben werden, M1-Makrophagen eher als tumorhemmend (Cui et al. 2016; Mantovani et al. 2002; Mantovani et al. 2004). Außerdem führt das im klinischen Alltag häufig mit Gemcitabin kombinierte nab-Paclitaxel zu mehr nachweisbaren M1-Makrophagen *in vitro* und *in vivo* (Cullis et al. 2017). Das ist neben der Reduktion von CDA in Tumorzellen einer der Mechanismen, die für die synergistische Wirkung der Kombination von Gemcitabin und nab-Paclitaxel verantwortlich gemacht werden (Cullis et al. 2017; Frese et al. 2012). Scheinbar ist die Metabolisierung von Gemcitabin durch M1- und M2-Makrophagen nicht relevant für deren unterschiedliche Rolle im Pankreaskarzinom.

#### 4.2.2 Versuche mit makrophagenkonditioniertem Medium

Makrophagen spielen in der Immunreaktion und für die Metastasierung des Pankreaskarzinoms eine große Rolle (Brown et al. 2017; Griesmann et al. 2017; Karnevi et al. 2014; Mielgo und Schmid 2013). Außerdem haben Untersuchungen bereits eine Verschlechterung des Ansprechens von auf Tumorzellen auf Gemcitabin durch Makrophagen gezeigt. Dabei handelte es sich aber um die Induktion oder Hemmung von Enzymen in Pankreastumorzellen durch Makrophagen, nicht jedoch um direkte metabolische Effekte (Binenbaum et al. 2018; Halbrosk et al. 2019; Weizman et al. 2014).

Um den Effekt der Metabolisierung von Gemcitabin durch Makrophagen möglichst isoliert zu betrachten, wurden Tumorzellen mit auf Makrophagen inkubiertem Medium behandelt. Der einzige Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war, dass das Gemcitabin entweder zu Beginn der Inkubation oder erst direkt vor der Behandlung der Tumorzellen dem Medium hinzugefügt wurde (Abbildung 14). So wirkte sich etwa eine Beeinflussung von cytokinvermittelten Signalwegen auf beide Gruppen aus. Einzig Effekte, die durch die direkte Wirkung von Gemcitabin auf Makrophagen entstehen, werden mit diesem Versuchsaufbau nicht ausgeschlossen. Solche Effekte von Gemcitabin auf Makrophagen sind ohne weitere Co-Faktoren bisher nicht beschrieben, sie erfolgen lediglich indirekt durch eine Ausschüttung von IL-8 durch Tumorzellen (Deshmukh et al. 2018). Insgesamt sind die im Weiteren diskutierten Versuche mit konditionierten Medien vergleichsweise einfach gehalten, was die Untersuchung der Auswirkung verschiedener Medikamente und verschiedener Zelllinien mit geringerem Aufwand erlaubte.

In diesen zunächst mit humanen THP-1-Zellen in M1-Polarisation durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass eine Vorinkubation von Gemcitabin mit Makrophagen weniger toxisch auf Tumorzellen der Linien BxPC-3 und L3.6 wirkt als die direkte Zugabe von Gemcitabin auf unbehandeltes Makrophagenmedium. Dabei ist der Effekt in der L3.6-Zelllinie am stärksten ausgeprägt, was möglicherweise auf die geringere Behandlungsdosis zurückzuführen ist. Das initial in geringerer Dosis vorhandene Gemcitabin wurde wahrscheinlich anteilig stärker von Makrophagen gespeichert oder inaktiviert und stand so nicht mehr zur Verfügung.

Interessanterweise konnten wir keine vergleichbaren Effekte feststellen, wenn 5-FU mit Makrophagen inkubiert wurde. 5-FU ist ebenso wie Gemcitabin ein Pyrimidinanalogon, das im Rahmen des FOLFIRINOX-Schemas eingesetzt wird (Conroy et al. 2011). Es wird trotz der Ähnlichkeit zu Gemcitabin durch andere Transportproteine in die Zelle aufgenommen und auch innerhalb der Zelle durch andere Enzyme metabolisiert. Sowohl die Phosphorylierung und damit Aktivierung des Medikaments als auch die Inaktivierung finden durch andere Enzymgruppen statt. Bemerkenswert ist, dass es hier zwar Analogien zum Gemcitabin-metabolismus gibt, aber keine Enzymgruppe ähnlich NT5C beschrieben ist, die eine einmal stattgehabte Phosphorylierung mittels Hydrolyse rückgängig macht



und so den Transport des Medikaments im Ursprungszustand aus der Zelle erlaubt (Thorn et al. 2011). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Medikamenten ist der Wirkmechanismus. Während Gemcitabin in erster Linie die Zellproliferation über die Inhibierung der DNA-Synthese hemmt und außerdem die natürlichen dNTPs depletiert, wirkt 5-FU auch über den Einschluss seiner Metabolite in die RNA der Tumorzellen, was dann zum Zelltod führt (Alvarellos et al. 2014; Brody et al. 2009; Thorn et al. 2011). Andere Studien, die eine Wirkung von Makrophagen auf die Gemcitabintherapie beschreiben, konnten ebenso keine Auswirkung einer Depletion von Makrophagen auf die Wirkung von 5-FU *in vivo* feststellen (Halbrook et al. 2019).

Während der unterschiedliche Metabolismus der Medikamente erklärt, dass die Inkubation auf Makrophagen keine Auswirkung auf 5-FU hat, zeigt sich bei Durchführung dieses Experiments mit L3.6-Zellen sogar eine dem Gemcitabin entgegengesetzte Wirkung: Die Tumorzellen reagierten deutlich empfindlicher auf das mit Makrophagen inkubierte 5-FU. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Makrophagen in M1-Polarisation unter 5-FU-Einfluss Zytokine sezernieren, die die zytotoxische Wirkung von 5-FU augmentieren. Dieser Effekt wurde bisher nicht beschrieben; das Medium von M1-Makrophagen, die nicht mit 5-FU inkubiert wurden, induzierte sogar eine 5-FU-Resistenz von Kolonkarzinomzelllinien (Hedbrant et al. 2015). Eine weitere Erforschung dieses unbekanntes Phänomens, etwa durch den Vergleich von Zytokinprofilen von Makrophagen unter 5-FU-Behandlung, ist sicher interessant.

Für Paclitaxel konnten durch die Co-Kultur-Behandlung mit Makrophagen ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der Viabilität der Tumorzellen gezeigt werden. Das Taxan wirkt im Gegensatz zu 5-FU und Gemcitabin nicht als Antimetabolit, sondern als Spindelgift (Spratlin und Sawyer 2007). Paclitaxel ist lipophil und wird im klinischen Alltag in einem polyethylierten Lipid und Ethanol verabreicht, um eine Emulsion zu ermöglichen. Dadurch ist der Transport zu den Zielzellen jedoch deutlich erschwert. Bei nab-Paclitaxel ermöglicht die Bindung an Albumin, dass das Paclitaxel *in vivo* schneller durch Transzytose aus dem Blut ins Interstitium übertritt (Gradishar 2006). Für unsere *In-vitro*-Versuche gaben wir Paclitaxel in DMSO gelöst. Durch die relativ hohen Behandlungskonzentrationen sowie den lipophilen Charakter ist der Übertritt von ungebundenem Paclitaxel in den intrazellulären Raum unproblematisch (Tsushima et al. 2020).

In Vorbereitung auf mögliche *In-vivo*-Experimente wurden die Co-Kultur-Untersuchungen auch mit murinen Zelllinien durchgeführt, um auszuschließen, dass die Effekte nur in humanen Zellen vorhanden sind. Hier zeigten sich bei zwei von drei Zelllinien vergleichbare Effekte.

Die murinen Makrophagen wurden primär aus dem Knochenmark isoliert. Die Isolation von TAMs direkt aus murinen Pankreastumoren war für diesen Versuchsaufbau ungeeignet, da die Zellen nicht mehr proliferieren und unverhältnismäßig viele Mäuse für diese Versuche hätten geopfert werden müssen (Mühlberg et al. 2016). Die Zellen wurden für diesen Versuch zu Makrophagen differenziert, jedoch nicht spezifisch zu M1- oder M2-Makrophagen polarisiert, da wir für den Gemcitabinstoffwechsel keine gravierenden Unterschiede zwischen den beiden Polarisierungen in humanen Zellen festgestellt haben. Insgesamt ist die Verwendung entweder von M1-polarisierten THP-1-Zellen oder murinen, aus Knochenmark isolierten Makrophagen eine Limitation dieser Arbeit, da TAM eine sehr heterogene Gruppe bilden und durch die beschriebenen Zellen nur ein Ausschnitt dieses Spektrums abgebildet werden kann (Cassetta und Kitamura 2018; Mosser und Edwards 2008; Murray und Wynn 2011). Bei der Isolation von TAMs aus humanen Pankreaskarzinomen wird mit großem Aufwand eine geringe Menge an Zellen isoliert, sodass sich diese Methode für unsere Versuche nicht eignete (Helm et al. 2014).

Zusammengefasst zeigen unsere Co-Kultur-Untersuchungen, dass der Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen sich sowohl in humanen als auch in murinen Zellen direkt auf die Viabilität von Pankreastumorzellen auswirkt. Viele der Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies über ein *scavenging* des Gemcitabins durch Makrophagen geschieht. Auch wenn dieser Effekt nachweisbar ist, weisen die Zellkulturversuche zahlreiche Limitationen auf. In den letzten Jahren wird neben der 2D-Zellkultur die Verwendung von Zellkultur-Organoiden zur *In-vitro*-Erforschung von Tumoren immer populärer (Boj et al. 2015). In den von uns durchgeführten Experimenten wurden in erster Linie die Auswirkung der direkten Metabolisierung von Gemcitabin durch Makrophagen durch den Vergleich verschieden konditionierter Zellmedien auf 2D-Zellkulturen untersucht. Wir haben auf eine Übertragung der Versuche in 3D-Organoidmodelle verzichtet und die *in vitro* beobachteten Effekte der Gemcitabinmetabolisierung *in vivo* im KC- und KPC-Mausmodell des Pankreaskarzinoms durch eine präklinische Studie überprüft.

### 4.3 Makrophagendepletion und Gemcitabintherapie *in vivo*

#### 4.3.1 Stärken und Limitationen der verwendeten Mausmodelle

Für die *In-vivo*-Untersuchungen zum Pankreaskarzinom kommen zahlreiche transgene Mausmodelle zum Einsatz. Diese haben gegenüber Xenograft-Modellen den großen Vorteil, dass die Vaskularisation und vor allem das TME mit Entzündungszellen, Fibroblasten, Makrophagen und ECM die Verhältnisse beim Menschen deutlich besser nachbilden (Clark et al. 2007; Olive und Tuveson 2006; Ponz-Sarvise et al. 2015). Das liegt daran, dass sich der Tumor endogen im Pankreas entwickelt und auch die Vorstufen wie ADM und PanIN durchläuft (Ponz-Sarvise et al. 2015).

Wir verwendeten für die Interventionsstudie das etablierte KPC-Mausmodell (Hingorani et al. 2005). Ein Nachteil dieses Modells ist, dass häufig kein lokalisierter Tumor in einem Teil des Pankreas entsteht (Kopf, Corpus oder Schwanz), sondern das Organ häufig mit verschiedenen Tumoren und Vorläuferläsionen durchsetzt ist. Bei dem Vergleich von jeweils nicht behandeltem gesundem Pankreasgewebe mit murinen Pankreastumoren sahen wir signifikant mehr Makrophagen im Tumorgewebe. Andere Publikationen beschreiben ähnliche Ergebnisse (Clark et al. 2007).

Bei der Behandlung von KC-Mäusen mit liposomalem Clodronat über einen längeren Zeitraum fanden wir heraus, dass diese nach einigen Wochen zur Entwicklung von Aszites führt. Da die Tiere im Alter von etwa 16 bis 18 Wochen in der Regel Vorläuferläsionen wie ADMs oder frühe PanINs, aber keine Karzinome entwickeln, ist der Aszites nicht auf eventuelle Karzinome zurückzuführen (Hingorani et al. 2003). Die mit PBS-Liposomen behandelten Tiere entwickelten kein Aszites. Unseres Wissens wurde Aszites als Komplikation einer langfristigen i. p.-Behandlung mit liposomalem Clodronat bisher nicht beschrieben. Um die Ursachen dafür näher einzugrenzen, sind weitere Untersuchungen erforderlich; unter anderem müsste die Zusammensetzung des Aszites analysiert werden. Die weißlich-trübe Färbung spricht am ehesten für einen hohen Anteil an Leukozyten.

#### 4.3.2 Untersuchungen des Gemcitabinmetabolismus *in vivo* mittels LC-MS/MS

Untersuchungen mittels LC-MS/MS durch unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Gemcitabin (dFdC) sowie der aktive Metabolit dFdCTP in murinen Tumoren um ein Vielfaches stärker verfügbar sind als in PanIN-Gewebe oder gesundem Pankreas (Buchholz et al. 2020). Bisher wurden keine massenspektrometrischen *In-vivo*-Analysen von Gemcitabin nach Makrophagendepletion durchgeführt. Während sich weder für das native (dFdC) noch für das aktivierte Gemcitabin (dFdCTP) signifikante Unterschiede durch die liposomale Clodronattherapie ergaben, ist es trotzdem bemerkenswert, dass im Mittel mehr als doppelt so viel dFdCTP nach Clodronatgabe nachweisbar war. Möglicherweise war die Kohortengröße mit je 4 untersuchten Tieren für einen signifikanten Effekt zu klein; vergleichbare Studien, die signifikante Ergebnisse zeigen konnten, untersuchten Kohortengrößen von 12 oder sogar 16 Tieren (Frese et al. 2012; Hessmann et al. 2018). Das erhöhte dFdCTP-Level im Tumorgewebe ist möglicherweise mit fehlender Gemcitabin-Inaktivierung durch die depletierten Makrophagen erklärbar.

Eine mit ähnlichen Methoden von unserer Gruppe durchgeführte Studie untersuchte den Effekt einer durch genetische Osteonectin-Ablation vermittelten Kollagendepletion auf die Gemcitabintherapie. Dabei konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Menge der Gemcitabinmetabolite zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden (Ramu et al. 2019).

Da bei der Untersuchung des Gewebes durch LC-MS/MS die Tumormasse mit Tumorzellen, Immunzellen, Fibroblasten und zahlreichen Komponenten des azellulären TME analysiert wurde, ist eine genauere Zuordnung der jeweiligen Subkompartimente nicht möglich. Eine vorherige Sortierung der Zellen, etwa mittels Durchflusszytometrie ist in diesem Fall nicht geeignet, da das Gemcitabin schnell zerfällt und das Gewebe so schnell wie möglich gefroren werden muss, um diesen Prozess zu unterbinden (Bapiro et al. 2011). Außerdem beginnt unmittelbar nach dem Opfern der Tiere die Autolyse des Pankreas durch dessen Verdauungsenzyme. Da eine Zuordnung der gemessenen Gemcitabinmetabolite zu den einzelnen Zelltypen so nicht möglich ist, führten wir zur Evaluation der Wirksamkeit des Medikaments verschiedene immunhistochemische Färbungen durch.

### 4.3.3 Klinische und Immunhistochemische Daten

Wir konnten zeigen, dass die Kombination von Gemcitabin mit liposomalem Clodronat zu einer erhöhten Expression von CC3 im Tumorgewebe führt, also dass die Kombination eine höhere Apoptoserate induziert. Eine Monotherapie mit Gemcitabin führt im KPC-Mausmodell nicht zu einer Erhöhung der CC3-Expression (Frese et al. 2012). Die Erhöhung der Apoptoserate zeigt die erhöhte Wirksamkeit von Gemcitabin durch die Kombination mit Clodronat-Liposomen. Ob die Ursache des besseren Ansprechens die Metabolisierung bzw. das *scavenging* des Gemcitabins durch Makrophagen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht klar gesagt werden. Wahrscheinlich ist von einer Kombination verschiedener, unter 4.2 diskutierter Mechanismen auszugehen; eine Zuordnung der Resultate zu den verschiedenen Mechanismen ist mit den aktuell zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich. Da die Depletion oder zumindest das gezielte Angreifen von Makrophagen in der Therapie des Pankreaskarzinoms aussichtsreich erscheint, ist eine weitere Untersuchung der Interaktion von Makrophagen mit dem Tumor und Chemotherapeutika in jedem Fall sinnvoll.

Die Kombination von Gemcitabin mit Clodronat-Liposomen führt zu keiner signifikanten Veränderung der durch Ki-67-Expression immunhistochemisch bestimmten Proliferationsrate der Tumorzellen. Dies war auch nicht zu erwarten; auch die Kombination von Gemcitabin mit nab-Paclitaxel, die im klinischen Alltag der Gemcitabin-Monotherapie überlegen ist, führt nicht zu einer Veränderung der Ki-67-Expression (Frese et al. 2012).

Ebenso führt die Kombination von Gemcitabin mit liposomalem Clodronat verglichen mit der Monotherapie nicht zu einer Verminderung des Tumorumfanges. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Depletion der Makrophagen durch Clodronat einige Tage benötigt und nach elf Tagen zwar schon ein Anstieg der Apoptoserate nachweisbar ist, sich jedoch noch keine Auswirkung auf das Tumorumfang zeigt. Außerdem wurden hier nur die Tiere verglichen, die bis zum Ende des Versuches überlebten. In der mit der Kombinationstherapie behandelten Kohorte überlebten mehr Tiere, bei relativ kleinen Gruppengrößen konnte jedoch keine Signifikanz gezeigt werden. Eine längere Gabe von liposomalem Clodronat, etwa vor Tumordiagnose und Beginn der Chemotherapie, war aufgrund der Nebenwirkungen wie Aszites nicht möglich.

Wir konnten in dieser Arbeit erstmals zeigen, dass die clodronatvermittelte Depletion von Makrophagen *in vivo* zu einer erhöhten Apoptoserate im Pankreaskarzinom unter Gemcitabintherapie führt. In Kombination mit den *In-vitro*-Resultaten, die einen *Scavenging*-Mechanismus der Makrophagen nahelegen, und den massenspektrometrischen Analysen zeigt dieses Ergebnis, dass der Gemcitabinmetabolismus von Makrophagen einen relevanten Beitrag zur Gemcitabinresistenz des Pankreaskarzinoms leistet.

#### **4.4 Präklinische und klinische Makrophagendepletion als therapeutische Optionen beim Pankreaskarzinom**

##### **4.4.1 Makrophagendepletion mit liposomalem Clodronat**

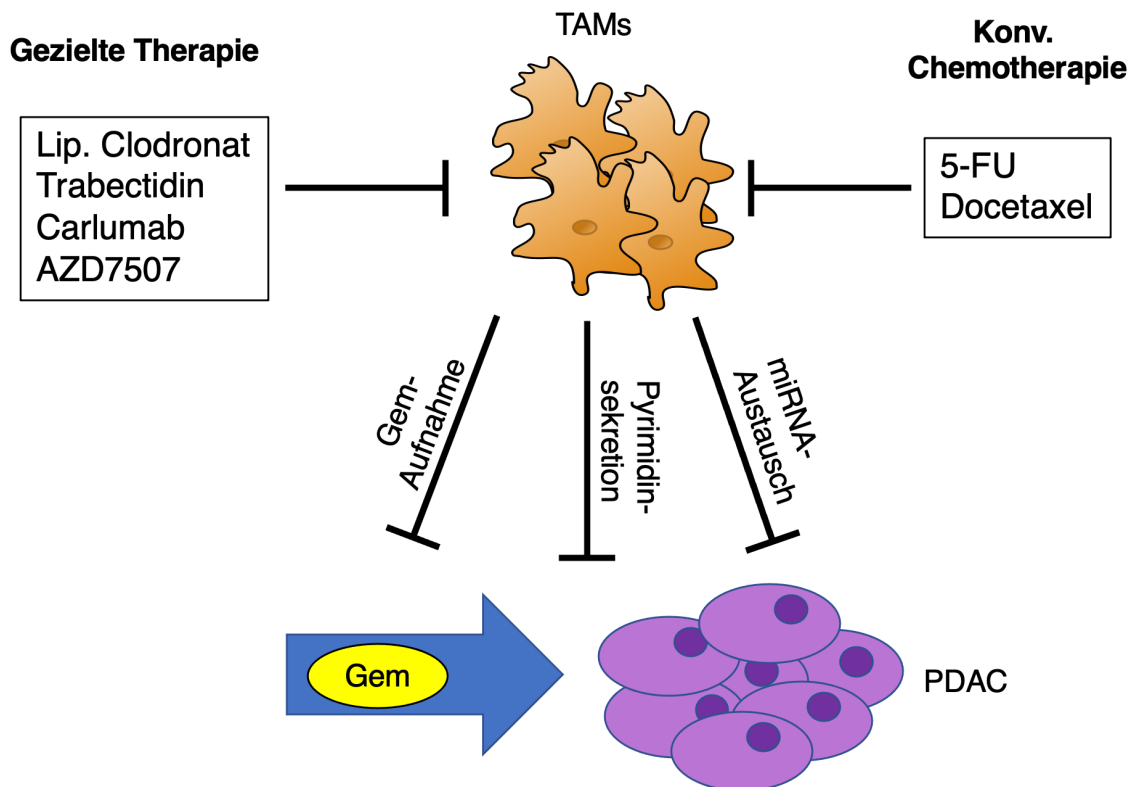
Die Auswirkung der Depletion von Makrophagen im KPC-Mausmodell mittels liposomalem Clodronat wurde bereits in anderen Zusammenhängen untersucht. Griesmann und Kollegen zeigten, dass dies zu einer signifikanten Minderung von Metastasen in Lunge und Leber führt und brachten dies mit einer verminderten Angiogenese durch weniger verfügbares VEGF in Verbindung (Griesmann et al. 2017). In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass die clodronatvermittelte Depletion von Makrophagen zu einer T-Zell-Infiltration des Tumors führte, die durch die Kombination mit Gemcitabin sogar noch verstärkt wurde. Das Therapieregime umfasste hier jedoch jeweils zusätzlich den monoklonalen Antikörper FGK45 gegen CD40, durch den Natürliche-Killer(NK)-Zellen aktiviert und antitumorale und antimetastatische Effekte erreicht wurden (Beatty et al. 2015). Daher sind die Effekte nicht eindeutig auf unser Modell übertragbar. In klinischen Studien wurde liposomales Clodronat bisher nur als intraartikuläre Injektion zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis eingesetzt.

##### **4.4.2 Alternative Ansätze zur Makrophagendepletion**

Ein weiterer Ansatz, Makrophagen anzugreifen, ist Trabectedin, das mittels Caspase-8-abhängiger Apoptose gezielt mononukleare Phagozyten tötet und so die Rekrutierung von Makrophagen inhibiert (Cui et al. 2016). Das Medikament wurde in einer klinischen Phase-II-Studie beim metastasierten Pankreaskarzinom als Monotherapie schon 2011 untersucht, zeigte jedoch trotz nachgewiesener immunmodulatorischer Prozesse keine Wirksamkeit (Belli et al. 2016).

Auch andere medikamentöse Möglichkeiten, Makrophagen zu inhibieren, sind entweder nicht geeignet für den klinischen Einsatz oder zeigten keine ausreichende Wirksamkeit in klinischen Studien. So wurde etwa die Entwicklung des monoklonalen CCL2-Antikörpers Carlumab nach enttäuschenden Ergebnissen einer Phase-II-Studie zur Behandlung des Prostatakarzinoms eingestellt (Pienta et al. 2013). Während Gemcitabin zwar die Polarisation von Makrophagen eher zugunsten des M1-Typs verändert, depletieren die zytotoxischen Chemotherapeutika 5-FU und Docetaxel neben ihrer eigentlichen Wirkung auf Tumorzellen M2-Makrophagen und tragen damit möglicherweise auch zu einem verbesserten Ansprechen bei (Kodumudi et al. 2010; Vincent et al. 2010).

Zur präklinischen Untersuchung der Rolle von Makrophagen kommt auch der CSF-1-Rezeptor(CSF-1R)-Inhibitor AZD7507 zum Einsatz. Während andere CSF-1R-Inhibitoren kardiotoxisch wirken, scheint dies bei AZD7507 nicht der Fall zu sein (Scott et al. 2013). Im KPC-Mausmodell führt die Behandlung zu einer Makrophagendepletion, vermindertem Tumorwachstum sowie verlängertem Überleben der Tiere (Candido et al. 2018). Bisher gibt es jedoch noch keine klinischen Studien zur weiteren Evaluation des Medikaments.



**Abbildung 25: TAM-induzierte Gemcitabinresistenz und therapeutische Optionen:** Makrophagen erhöhen die Resistenz von Tumorzellen durch miRNA-abhängige CDA-Hochregulation

und Pyrimidinsekretion. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, wie Makrophagen selbst Gemcitabin aufnehmen und verstoffwechseln. Neben liposomalem Clodronat können Makrophagen durch Trabectedin und Carlumab gezielt angegriffen werden; zudem wirken 5-FU und Docetaxel toxisch auf Makrophagen.

Außerdem wird beschrieben, dass Gemcitabin zu einer Einwanderung von Makrophagen in das Pankreaskarzinom führt (Mitchem et al. 2013). Die Rolle dieser Infiltration für die Wirkung von Gemcitabin ist bisher nicht untersucht; gerade in Hinblick auf die neuen, gezielt angreifenden Therapieansätze sind weitere Experimente notwendig.

In Anbetracht der beschriebenen Ergebnisse, die zeigen, dass Makrophagen durch verschiedene Mechanismen zu einer Erhöhung der Gemcitabinresistenz beitragen und auch durch eine Induktion der Metastasierung die Prognose verschlechtern, liegt es nahe, Makrophagen therapeutisch zu depletieren (Abbildung 25). Die zusätzliche Überwindung der Gemcitabinresistenz würde, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, eine Depletion insbesondere in Kombination mit Gemcitabin zu einer attraktiven therapeutischen Option machen. Bisher wurde nur die Wirkung von Trabectedin als Monotherapie für das Pankreaskarzinom im Rahmen einer klinischen Studie getestet. Neue *targeted therapies* gegen Makrophagen sind also eine spannende und aussichtsreiche Option für die Zukunft.



## 5 Zusammenfassung

Trotz großer wissenschaftlicher und klinischer Anstrengungen hat das Pankreaskarzinom weiterhin eine fatale Prognose. Dafür ist neben der meist erst spät gestellten Diagnose vor allem die Chemotherapieresistenz des Tumors verantwortlich. Gemcitabin und an Albumin gebundenes Paclitaxel sind mit dem FOLFIRINOX-Schema die etabliertesten Protokolle in der Therapie des nicht resektablen Pankreaskarzinoms.

In den letzten Jahren rückte die Rolle des *tumor microenvironment* in der Chemotherapieresistenz immer stärker in den Vordergrund. Vieles deutet darauf hin, dass das Tumorstroma nicht nur eine biophysikalische Barriere bildet, sondern primär durch epigenetische und metabolische Prozesse zur Chemotherapieresistenz beiträgt. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass *cancer associated fibroblasts* Gemcitabin aufnehmen und so für den Tumor die Verfügbarkeit reduzieren. Makrophagen bilden die größte Zellpopulation im Pankreaskarzinom; für sie ist ein gemcitabinmetabolisierender Effekt bisher nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde zunächst *in vitro* mit Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie untersucht, in welchem Maß humane und murine Makrophagen Gemcitabin aufnehmen und metabolisieren. Mittels Co-Kultur-Versuchen wurden anschließend die Auswirkung dieser Metabolisierung auf humane und murine Pankreaskarzinomzellen analysiert. Außerdem wurden die Auswirkung einer Makrophagendepletion durch liposomales Clodronat auf die Gemcitabintherapie in den murinen *In-vivo*-Pankreaskarzinommodellen KPC und KC untersucht.

Massenspektrometrisch zeigte sich, dass humane und murine Makrophagen Gemcitabin aufnehmen, teilweise inaktivieren und teilweise speichern. Das führt zu einer erhöhten Viabilität von Tumorzellen, wenn das Gemcitabin vorher auf Makrophagen inkubiert wurde. Ein vergleichbarer Effekt kann für 5-FU und Paclitaxel nicht gezeigt werden.

Eine Kombination von Gemcitabin mit liposomalem Clodronat zeigte im KPC-Mausmodell keine signifikanten klinischen Unterschiede im Vergleich zur Behandlung nur mit Gemcitabin. Histologisch zeigte sich bei Erhöhung des Anteils der *cleaved-caspase-3*-positiven Zellen eine signifikante Erhöhung der Apoptose-rate, während die durch Ki-67-Färbung gemessene Zellproliferation unverändert

ist. Die Langzeitbehandlung von KC-Mäusen mit liposomalem Clodronat führte jedoch zur Bildung von Aszites.

Unsere Versuche konnten zeigen, dass Makrophagen Gemcitabin aufnehmen und metabolisieren und ihre Depletion *in vivo* zu einem besseren Ansprechen von Gemcitabin führt. Andere Studien zeigen weitere positive Effekte einer Depletion von Makrophagen, etwa weniger Metastasierung und eine verbesserte Immunantwort auf den Tumor. Makrophagen sind Teil der größten Zellpopulation im Pankreaskarzinom. Ihre Depletion, kombiniert mit klassischer Chemotherapie, ist ein vielversprechender Ansatz, der in naher Zukunft durch klinische Studien überprüft werden wird.

## 6 Literaturverzeichnis

Aglietta M, Barone C, Sawyer MB, Moore MJ, Miller WH, Jr., Bagala C, Colombi F, Cagnazzo C, Gioeni L, Wang E et al. (2014): A phase I dose escalation trial of tremelimumab (CP-675,206) in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* 25, 1750-1755

Aichler M, Seiler C, Tost M, Siveke J, Mazur PK, Da Silva-Buttkus P, Bartsch DK, Langer P, Chiblak S, Durr A et al. (2012): Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol* 226, 723-734

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

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* 87, 171

Alvarellos ML, Lamba J, Sangkuhl K, Thorn CF, Wang L, Klein DJ, Altman RB, Klein TE (2014): PharmGKB summary: gemcitabine pathway. *Pharmacogenet Genomics* 24, 564-574

Amrutkar M, Gladhaug IP (2017): Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)* 9, 157

Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA et al. (2004): Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29, 179-187

Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G (2005): Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128, 907-921

Baert T, Vankerckhoven A, Riva M, Van Hoylandt A, Thirion G, Holger G, Mathivet T, Vergote I, Coosemans A (2019): Myeloid Derived Suppressor Cells: Key Drivers of Immunosuppression in Ovarian Cancer. *Front Immunol* 10, 1273

Bailey P, Chang DK, Forget MA, Lucas FA, Alvarez HA, Haymaker C, Chattopadhyay C, Kim SH, Ekmekcioglu S, Grimm EA et al. (2016a): Exploiting the neoantigen landscape for immunotherapy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 6, 35848

Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, Miller DK, Christ AN, Bruxner TJ, Quinn MC et al. (2016b): Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531, 47-52

Bapiro TE, Richards FM, Goldgraben MA, Olive KP, Madhu B, Frese KK, Cook N, Jacobetz MA, Smith DM, Tuveson DA et al. (2011): A novel method for quantification of gemcitabine and its metabolites 2',2'-difluorodeoxyuridine and gemcitabine triphosphate in tumour tissue by LC-MS/MS: comparison with  $(^{19}\text{F})$  NMR spectroscopy. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 1243-1253

Bapiro TE, Frese KK, Courtin A, Bramhall JL, Madhu B, Cook N, Neesse A, Griffiths JR, Tuveson DA, Jodrell DI et al. (2014): Gemcitabine diphosphate choline is a major metabolite linked to the Kennedy pathway in pancreatic cancer models in vivo. *Br J Cancer* 111, 318-325

Barrera P, Blom A, Van Lent PLEM, Van Bloois L, Beijnen JH, Van Rooijen N, De Waal Malefijt MC, Van De Putte LBA, Storm G, Van Den Berg WB (2000): Synovial macrophage depletion with clodronate - containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43, 1951-1959

Beatty GL, Winograd R, Evans RA, Long KB, Luque SL, Lee JW, Clendenin C, Gladney WL, Knoblock DM, Guirnalda PD et al. (2015): Exclusion of T Cells From Pancreatic Carcinomas in Mice Is Regulated by Ly6C(low) F4/80(+) Extratumoral Macrophages. *Gastroenterology* 149, 201-210

Belli C, Piemonti L, D'Incalci M, Zucchetti M, Porcu L, Cappio S, Doglioni C, Allavena P, Ceraulo D, Maggiora P et al. (2016): Phase II trial of salvage therapy with trabectedin in metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 77, 477-484

Binenbaum Y, Fridman E, Yaari Z, Milman N, Schroeder A, Ben David G, Shlomi T, Gil Z (2018): Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res* 78, 5287-5299

Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio, II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvisé M, Tiriác H, Spector MS et al. (2015): Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160, 324-338

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E et al. (2015): Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373, 1627-1639

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K et al. (2012): Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366, 2455-2465

Brody JR, Hucl T, Costantino CL, Eshleman JR, Gallmeier E, Zhu H, van der Heijden MS, Winter JM, Wikiewicz AK, Yeo CJ et al. (2009): Limits to thymidylate synthase and TP53

genes as predictive determinants for fluoropyrimidine sensitivity and further evidence for RNA-based toxicity as a major influence. *Cancer Res* 69, 984-991

Brown JM, Recht L, Strober S (2017): The Promise of Targeting Macrophages in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 23, 3241-3250

Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ (1999): In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1, 50-62

Buchholz SM, Goetze RG, Singh SK, Ammer-Herrmenau C, Richards FM, Jodrell DI, Buchholz M, Michl P, Ellenrieder V, Hessmann E et al. (2020): Depletion of Macrophages Improves Therapeutic Response to Gemcitabine in Murine Pancreas Cancer. *Cancers* 12, 1978

Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P et al. (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15, 2403-2413

Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M et al. (2011): Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol* 6, 815-823

Candido JB, Morton JP, Bailey P, Campbell AD, Karim SA, Jamieson T, Lapienyte L, Gopinathan A, Clark W, McGhee EJ et al. (2018): CSF1R(+) Macrophages Sustain Pancreatic Tumor Growth through T Cell Suppression and Maintenance of Key Gene Programs that Define the Squamous Subtype. *Cell Rep* 23, 1448-1460

Cassetta L, Kitamura T (2018): Macrophage targeting: opening new possibilities for cancer immunotherapy. *Immunology* 155, 285-293

Catenacci DV, Junttila MR, Karrison T, Bahary N, Horiba MN, Nattam SR, Marsh R, Wallace J, Kozloff M, Rajdev L et al. (2015): Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* 33, 4284-4292

Cavaillon JM (2011): The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol* 90, 413-424

Chang Q, Jurisica I, Do T, Hedley DW (2011): Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer. *Cancer Res* 71, 3110-3120

Chomczynski P, Mackey K (1995): Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem* 225, 163-164

Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH (2007): Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res* 67, 9518-9527

Clark CE, Beatty GL, Vonderheide RH (2009): Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Lett* 279, 1-7

Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, Cooc J, Weinkle J, Kim GE, Jakkula L et al. (2011): Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 17, 500-503

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364, 1817-1825

Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, Chone L, Francois E, Artru P, Biagi JJ et al. (2018): FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 379, 2395-2406

Cui R, Yue W, Lattime EC, Stein MN, Xu Q, Tan XL (2016): Targeting tumor-associated macrophages to combat pancreatic cancer. *Oncotarget* 7, 50735-50754

Cullis J, Siolas D, Avanzi A, Barui S, Maitra A, Bar-Sagi D (2017): Macropinocytosis of Nab-paclitaxel Drives Macrophage Activation in Pancreatic Cancer. *Cancer Immunol Res* 5, 182-190

Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, Akkad N, Mohan N, Werba G, Barilla R, Torres-Hernandez A, Hundeyin M, Mani VRK et al. (2016): gammadelta T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining alphabeta T Cell Activation. *Cell* 166, 1485-1499

de Sousa Cavalcante L, Monteiro G (2014): Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol* 741, 8-16

Deshmukh SK, Tyagi N, Khan MA, Srivastava SK, Al-Ghadhban A, Dugger K, Carter JE, Singh S, Singh AP (2018): Gemcitabine treatment promotes immunosuppressive microenvironment in pancreatic tumors by supporting the infiltration, growth, and polarization of macrophages. *Sci Rep* 8, 12000

Ding Y, Cravero JD, Adrian K, Grippo P (2010): Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas* 39, 283-292

Downey CM, Aghaei M, Schwendener RA, Jirik FR (2014): DMXAA causes tumor site-specific vascular disruption in murine non-small cell lung cancer, and like the endogenous non-canonical cyclic dinucleotide STING agonist, 2'3'-cGAMP, induces M2 macrophage repolarization. *PLoS One* 9, e99988

Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goere D, Seufferlein T, Haustermans K, Van Laethem JL, Conroy T et al. (2015): Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 26 Suppl 5, v56-68

Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, Teinor JA, Belleau P, Biffi G, Lucito MS et al. (2019): Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov* 9, 1102-1123

Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser-Erkan C, Abiatari I, Kolb A, Giese NA, Esposito I, Friess H, Kleeff J (2008): The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6, 1155-1161

Eser S, Messer M, Eser P, von Werder A, Seidler B, Bajbouj M, Vogelmann R, Meining A, von Burstin J, Algul H et al. (2011): In vivo diagnosis of murine pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer by molecular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9945-9950

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

Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA (2012): The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18, 4266-4276

Ferrone CR, Marchegiani G, Hong TS, Ryan DP, Deshpande V, McDonnell EI, Sabbatino F, Santos DD, Allen JN, Blaszkowsky LS et al. (2015): Radiological and surgical implications of neoadjuvant treatment with FOLFIRINOX for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer. *Ann Surg* 261, 12-17

Filipponi P, Pedetti M, Fedeli L, Cini L, Palumbo R, Boldrini S, Massoni C, Cristallini S (1995): Cyclical clodronate is effective in preventing postmenopausal bone loss: a comparative study with transcutaneous hormone replacement therapy. *J Bone Miner Res* 10, 697-703

Frediani B, Bertoldi I (2015): Clodronate: new directions of use. *Clin Cases Miner Bone Metab* 12, 97-108

Frese KK, Tuveson DA (2007): Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7, 645-658

Frese KK, Neesse A, Cook N, Bapiro TE, Lolkema MP, Jodrell DI, Tuveson DA (2012): nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov* 2, 260-269

Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ (1997): Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 12, 1358-1367

Froeling FE, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR, Kocher HM (2011): Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-beta-catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology* 141, 1486-1497, 1497 e1481-1414

Fuchs DA, Johnson RK (1978): Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison. *Cancer Treat Rep* 62, 1219-1222

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

Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, Jonas OH, Shental N, Nejman D, Gavert N, Zwang Y, Cooper ZA, Shee K et al. (2017): Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* 357, 1156-1160

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710-1715

Goetze RG, Buchholz SM, Patil S, Petzold G, Ellenrieder V, Hessmann E, Neesse A (2018): Utilizing High Resolution Ultrasound to Monitor Tumor Onset and Growth in Genetically Engineered Pancreatic Cancer Models. *J Vis Exp* 134, e56979

Gradishar WJ (2006): Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. *Expert Opin Pharmacother* 7, 1041-1053



Griesmann H, Drexel C, Milosevic N, Sipos B, Rosendahl J, Gress TM, Michl P (2017): Pharmacological macrophage inhibition decreases metastasis formation in a genetic model of pancreatic cancer. *Gut* 66, 1278-1285

Halbrook CJ, Pontious C, Kovalenko I, Lapienyte L, Dreyer S, Lee HJ, Thurston G, Zhang Y, Lazarus J, Sajjakulnukit P et al. (2019): Macrophage-Released Pyrimidines Inhibit Gemcitabine Therapy in Pancreatic Cancer. *Cell Metab* 29, 1390-1399

Han X, Li Y, Xu Y, Zhao X, Zhang Y, Yang X, Wang Y, Zhao R, Anderson GJ, Zhao Y et al. (2018): Reversal of pancreatic desmoplasia by re-educating stellate cells with a tumour microenvironment-activated nanosystem. *Nat Commun* 9, 3390

Hasselluhn MC, Klein L, Patzak MS, Buchholz SM, Strobel P, Ellenrieder V, Maisonneuve P, Neesse A (2020): Stromal Features of the Primary Tumor Are Not Prognostic in Genetically Engineered Mice of Pancreatic Cancer. *Cells* 9, 58

Hedbrant A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J (2015): Conditioned media from human macrophages of M1 phenotype attenuate the cytotoxic effect of 5-fluorouracil on the HT29 colon cancer cell line. *Int J Oncol* 46, 37-46

Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J (1957): Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179, 663-666

Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I, Kruger U, Becker T, Ebsen M, Rocken C et al. (2014): Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* 135, 843-861

Hessmann E, Patzak MS, Klein L, Chen N, Kari V, Ramu I, Bapiro TE, Frese KK, Gopinathan A, Richards FM et al. (2018): Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* 67, 497-507

Hessmann E, Buchholz SM, Demir IE, Singh SK, Gress TM, Ellenrieder V, Neesse A (2020): Microenvironmental Determinants of Pancreatic Cancer. *Physiol Rev* 100, 1707-1751

Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA et al. (2003): Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437-450

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005): Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote

chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469-483

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280

Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143, 545-554

Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T et al. (2004): An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28, 977-987

Hruban RH, Maitra A, Goggins M (2008): Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 1, 306-316

Hu H, Hang JJ, Han T, Zhuo M, Jiao F, Wang LW (2016): The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 37, 8657-8664

Huang C, Li Z, Li N, Li Y, Chang A, Zhao T, Wang X, Wang H, Gao S, Yang S et al. (2018): Interleukin 35 Expression Correlates With Microvessel Density in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Recruits Monocytes, and Promotes Growth and Angiogenesis of Xenograft Tumors in Mice. *Gastroenterology* 154, 675-688

Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W (1991): Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51, 6110-6117

Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008): Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68, 918-926

Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang C, Hashida H, Takabayashi A, Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M et al. (1999): Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 79, 1553-1563

Ireland L, Santos A, Ahmed MS, Rainer C, Nielsen SR, Quaranta V, Weyer-Czernilofsky U, Engle DD, Perez-Mancera PA, Coupland SE et al. (2016): Chemoresistance in Pancreatic

Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. *Cancer Res* 76, 6851-6863

Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA (2001): Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248

Jesnowski R, Furst D, Ringel J, Chen Y, Schrodel A, Kleeff J, Kolb A, Schareck WD, Lohr M (2005): Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 85, 1276-1291

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K (2016): Pancreatic cancer. *Lancet* 388, 73-85

Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH (2014): Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol* 92, 543-552

Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmana J, Mitchell G, Fried G, Stemmer SM, Hubert A et al. (2015): Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J Clin Oncol* 33, 244-250

Kim EJ, Sahai V, Abel EV, Griffith KA, Greenson JK, Takebe N, Khan GN, Blau JL, Craig R, Balis UG et al. (2014): Pilot clinical trial of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 (vismodegib) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 20, 5937-5945

Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, Innocenti F, Mulcahy MF, O'Reilly E, Wozniak TF et al. (2010): Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 28, 3617-3622

Knudsen ES, Vail P, Balaji U, Ngo H, Botros IW, Makarov V, Riaz N, Balachandran V, Leach S, Thompson DM et al. (2017): Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Combinatorial Genetic, Stromal, and Immunologic Markers. *Clin Cancer Res* 23, 4429-4440

Kocher HM, Basu B, Froeling FEM, Sarker D, Slater S, Carlin D, deSouza NM, De Paepe KN, Goulart MR, Hughes C et al. (2020): Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun* 11, 4841

Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY (2010): A Novel Chemoimmunomodulating Property of Docetaxel: Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearers. *Clinical Cancer Research* 16, 4583-4594

Konstantinidis IT, Warshaw AL, Allen JN, Blaszkowsky LS, Castillo CF, Deshpande V, Hong TS, Kwak EL, Lauwers GY, Ryan DP et al. (2013): Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a "true" R0 resection? *Ann Surg* 257, 731-736

Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A (2008): Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 8, 110-125

Kranenburg O (2005): The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* 1756, 81-82

Kroep JR, Loves WJ, van der Wilt CL, Alvarez E, Talianidis I, Boven E, Braakhuis BJ, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Peters GJ (2002): Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 1, 371-376

Krug S, Abbassi R, Griesmann H, Sipos B, Wiese D, Rexin P, Blank A, Perren A, Haybaeck J, Huttelmaier S et al. (2018): Therapeutic targeting of tumor-associated macrophages in pancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Cancer* 143, 1806-1816

Li C, Levin M, Kaplan DL (2016): Bioelectric modulation of macrophage polarization. *Sci Rep* 6, 21044

Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G (1975): Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 15, 741-747

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 in Immunology* 23, 549-555

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686

Marten A, Zeiss N, Serba S, Mehrle S, von Lilienfeld-Toal M, Schmidt J (2008): Bortezomib is ineffective in an orthotopic mouse model of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 7, 3624-3631

Maurer C, Holmstrom SR, He J, Laise P, Su T, Ahmed A, Hibshoosh H, Chabot JA, Oberstein PE, Sepulveda AR et al. (2019): Experimental microdissection enables functional harmonisation of pancreatic cancer subtypes. *Gut* 68, 1034-1043

Mielgo A, Schmid MC (2013): Impact of tumour associated macrophages in pancreatic cancer. *BMB Rep* 46, 131-138

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000): M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166-6173

Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T (2006): Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 17 Suppl 5, v7-12

Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, Belaygorod L, Carpenter D, Collins L, Piwnica-Worms D et al. (2013): Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* 73, 1128-1141

Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SG, Hoadley KA, Rashid NU, Williams LA, Eaton SC, Chung AH et al. (2015): Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 47, 1168-1178

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA et al. (2007): Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25, 1960-1966

Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63

Mosser DM, Edwards JP (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969

Mühlberg L, Kühnemuth B, Costello E, Shaw V, Sipos B, Huber M, Griesmann H, Krug S, Schober M, Gress TM et al. (2016): miRNA dynamics in tumor-infiltrating myeloid cells modulating tumor progression in pancreatic cancer. *Oncoimmunology* 5, e1160181

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273

Murphy JE, Wo JY, Ryan DP, Jiang W, Yeap BY, Drapek LC, Blaszkowsky LS, Kwak EL, Allen JN, Clark JW et al. (2018): Total Neoadjuvant Therapy With FOLFIRINOX Followed by Individualized Chemoradiotherapy for Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol* 4, 963-969

Murray PJ, Wynn TA (2011): Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737

Naito M, Nagai H, Kawano S, Umezumi H, Zhu H, Moriyama H, Yamamoto T, Takatsuka H, Takei Y (1996): Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol* 60, 337-344

Neesse A, Frese KK, Bapiro TE, Nakagawa T, Sternlicht MD, Seeley TW, Pilarsky C, Jodrell DI, Spong SM, Tuveson DA (2013): CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12325-12330

Neesse A, Algul H, Tuveson DA, Gress TM (2015): Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* 64, 1476-1484

Neesse A, Bauer CA, Ohlund D, Lauth M, Buchholz M, Michl P, Tuveson DA, Gress TM (2019): Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation? *Gut* 68, 159-171

Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, Faluyi O, O'Reilly DA, Cunningham D, Wadsley J et al. (2017): Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 389, 1011-1024

Nicolle R, Blum Y, Marisa L, Loncle C, Gayet O, Moutardier V, Turrini O, Giovannini M, Bian B, Bigonnet M et al. (2017): Pancreatic Adenocarcinoma Therapeutic Targets Revealed by Tumor-Stroma Cross-Talk Analyses in Patient-Derived Xenografts. *Cell Rep* 21, 2458-2470

Oberstein PE, Olive KP (2013): Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therap Adv Gastroenterol* 6, 321-337

Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C et al. (2007): Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297, 267-277

Olive KP, Tuveson DA (2006): The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 12, 5277-5287

Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T (2004): Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 847-860

Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D et al. (2009): Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461

Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu CC, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV et al. (2014): Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25, 719-734

Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA (1997): Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 18530-18533

Phillips PA, McCarroll JA, Park S, Wu MJ, Pirola R, Korsten M, Wilson JS, Apte MV (2003): Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut* 52, 275-282

Pienta KJ, Machiels JP, Schrijvers D, Alekseev B, Shkolnik M, Crabb SJ, Li S, Seetharam S, Puchalski TA, Takimoto C et al. (2013): Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* 31, 760-768

Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, Lyons E, DeArbeloa P, Hendifar A, Mikhail S, Chung V, Sahai V, Sohal DPS et al. (2020): Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol* 21, 508-518

Ponz-Sarvisé M, Tuveson DA, Yu KH (2015): Mouse Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 29, 609-617

Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jarrod M, Costafreda S, Coll S et al. (2005): Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 7, 189-197

Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR (2012): Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 418-429

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM (2014): Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913-2921

Ramu I, Buchholz SM, Patzak MS, Goetze RG, Singh SK, Richards FM, Jodrell DI, Sipos B, Strobel P, Ellenrieder V et al. (2019): SPARC dependent collagen deposition and gemcitabine delivery in a genetically engineered mouse model of pancreas cancer. *EBioMedicine* 48, 161-168

Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, Dekleva EN, Saunders T, Becerra CP, Tattersall IW et al. (2014): Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25, 735-747

Robert-Koch-Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2015/2016. Robert-Koch-Institut, Berlin 2019

Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Lowy I et al. (2010): Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother* 33, 828-833

Ruiz van Haperen VWT, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ (1993): 2', 2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochemical Pharmacology* 46, 762-766

Schneider G, Schmid RM (2003): Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2, 15

Schwarz RE, McCarty TM, Peralta EA, Diamond DJ, Ellenhorn JDI (1999): An orthotopic in vivo model of human pancreatic cancer. *Surgery* 126, 562-567

Scott DA, Dakin LA, Daly K, Del Valle DJ, Diebold RB, Drew L, Ezhuthachan J, Gero TW, Ogoe CA, Omer CA et al. (2013): Mitigation of cardiovascular toxicity in a series of CSF-1R inhibitors, and the identification of AZD7507. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 4591-4596

Sebastiani V, Ricci F, Rubio-Viqueira B, Kulesza P, Yeo CJ, Hidalgo M, Klein A, Laheru D, Jacobuzio-Donahue CA (2006): Immunohistochemical and genetic evaluation of deoxycytidine kinase in pancreatic cancer: relationship to molecular mechanisms of gemcitabine resistance and survival. *Clin Cancer Res* 12, 2492-2497

Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K (2000): High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 88, 2239-2245

Sessa F, Solcia E, Capella C, Bonato M, Scarpa A, Zamboni G, Pellegata NS, Ranzani GN, Rickaert F, Kloppel G (1994): Intraductal papillary-mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and K-ras, p53 and c-erbB-2 abnormalities in 26 patients. *Virchows Arch* 425, 357-367



Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriach H, Collisson EA, Connor F, Van Dyke T, Kozlov S et al. (2014): Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* 159, 80-93

Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL (1971): Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2843-2845

Spratlin J, Sawyer MB (2007): Pharmacogenetics of paclitaxel metabolism. *Crit Rev Oncol Hematol* 61, 222-229

Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R, Mackey JR (2004): The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 6956-6961

Stanton KJ, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Schmidt CM, Howard TJ, Wiebke EA (2003): Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am J Surg* 186, 486-492

Stromnes IM, Brockenbrough JS, Izeradjene K, Carlson MA, Cuevas C, Simmons RM, Greenberg PD, Hingorani SR (2014): Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut* 63, 1769-1781

Stromnes IM, Burrack AL, Hulbert A, Bonson P, Black C, Brockenbrough JS, Raynor JF, Spartz EJ, Pierce RH, Greenberg PD et al. (2019): Differential Effects of Depleting versus Programming Tumor-Associated Macrophages on Engineered T Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res* 7, 977-989

Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, Pickren JW, Berjian R, Douglass HO, Jr., Chu TM (1986): Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* 4, 15-23

Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB (2011): PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics* 21, 237-242

Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000): Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29, 52, 54

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171-176

Tsushima T, Kasai H, Tanigawara Y (2020): Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of neutropenia following nab-paclitaxel administration in Japanese patients with metastatic solid cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 86, 487-495

van Rooijen N, van Nieuwmegen R (1984): Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res* 238, 355-358

van Rooijen N, Sanders A (1994): Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83-93

van Rooijen N, van Kesteren-Hendriks E (2003): "In vivo" depletion of macrophages by liposome-mediated "suicide". *Methods Enzymol* 373, 3-16

van Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK (1996): Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 193, 93-99

Vezeridis MP, Tzanakakis GN, Meitner PA, Doremus CM, Tibbetts LM, Calabresi P (1992): In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. *Cancer* 69, 2060-2063

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2011): Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607-620

Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F (2010): 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 70, 3052-3061

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN et al. (2013): Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 369, 1691-1703

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

Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971): Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93, 2325-2327

Weizman N, Krelin Y, Shabtay-Orbach A, Amit M, Binenbaum Y, Wong RJ, Gil Z (2014): Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* 33, 3812-3819

Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, Hostetter G, Shepard HM, Von Hoff DD, Han H (2015): Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 21, 3561-3568

Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, Clendenin C, Stanger BZ, Furth EE, Wherry EJ et al. (2015): Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol Res* 3, 399-411

Xie K, Wei D, Huang S (2006): Transcriptional anti-angiogenesis therapy of human pancreatic cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 147-156

Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA, Fiala-Beer E, Zhang X, Yang L, Biankin AV, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS et al. (2010): Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 177, 2585-2596

Yardley DA (2013): nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *J Control Release* 170, 365-372

Yeo TP (2015): Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol* 42, 8-18

Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjallman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA (2006): Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 95, 272-281

Zeng S, Pottler M, Lan B, Grutzmann R, Pilarsky C, Yang H (2019): Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* 20, 4504

## Danksagung

Ich bedanke mich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes und der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, die mich sowohl finanziell als auch durch die Möglichkeit zur Vernetzung mit anderen Forschenden bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Für die Hilfe beim Einstieg in die experimentelle wissenschaftliche Arbeit und für die praktische Hilfe während der Durchführung zahlreicher Experimente bedanke ich mich bei Jutta Blumberg, Robert Goetze, Marie Hasselluhn, Lukas Klein, Shilpa Patil, Iswarya Ramu, Geske Schmidt, Ulrike Wegner und Laurin Wolf.

Viele Teile dieser Arbeit konnten nur durch Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen und der Hilfe erfahrener Wissenschaftler entstehen. Dafür bedanke ich mich bei Malte Buchholz, Volker Ellenrieder, Heidi Griesmann, Elisabeth Hessmann, Duncan Jodrell, Patrick Michl, Frances Richards und Shiv Singh.

Für die professionelle und anregende Betreuung im Betreuungsausschuss bedanke ich mich bei Michael Zeisberg.

Durch die hervorragende wissenschaftliche Betreuung von Albrecht Neeße, mit dem das Projekt erarbeitet wurde, habe ich in den letzten Jahren unglaublich viel auch abseits des hier behandelten Themenfeldes gelernt. Vielen Dank für die freundliche, gewissenhafte und immer zeitnahe Hilfe bei Fragen und Problemen.