

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und tumorassoziierten  
Fibroblasten und deren Einfluss auf die Therapie des  
Pankreaskarzinoms

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christopher Claudius Maximilian Neumann

aus Berlin

Datum der Promotion: 06.03.2020

# Vorwort

Die Dissertation basiert auf folgender Veröffentlichung:

**C. C.M. Neumann**, E. von Hörschelmann, A. Reutzel-Selke, E. Seidel, I.M. Sauer, J. Pratschke, M. Bahra, R.B. Schmuck. Tumor–stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2018, 17(5): 461-472

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	9
Abstrakt.....	11
<b>Kapitel 1</b> Einleitung.....	15
1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms .....	15
1.2 Therapie des Pankreaskarzinoms .....	17
1.3 Das Tumorstroma des Pankreaskarzinoms.....	24
1.4 In-vitro Modelle des Pankreaskarzinoms .....	31
1.5 Die Ziele der Arbeit.....	34
<b>Kapitel 2</b> Material und Methodik .....	35
2.1 Material.....	35
2.2 Zelllinien .....	35
2.3 Zelllinien primärer CAFs .....	36
2.4 Charakterisierung der CAFs .....	37
2.5 Kristallviolett-färbung der Zellkulturen.....	38
2.6 Untersuchung der Zellviabilität in Monokulturen .....	38
2.7 Untersuchung der Zellviabilität in indirekten Ko-Kulturen .....	39
2.8 Untersuchung der Zellviabilität in direkten Ko-Kulturen .....	40
2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse .....	41
<b>Kapitel 3</b> Ergebnisse.....	42
3.1 Isolierung der primären CAFs.....	42
3.2 Charakterisierung der CAFs .....	44

3.3	Kristallviolettffärbung der Zellkulturen.....	46
3.4	Effekt der Chemotherapie in Monokulturen .....	48
3.5	Effekt der Chemotherapie in indirekten Ko-Kulturen.....	56
3.6	Effekt der Chemotherapie in direkten Ko-Kulturen .....	60
3.7	Vergleich des Effektes der Chemotherapie in Mono-, indirekten und direkten Ko-Kulturen .....	61
<b>Kapitel 4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
<b>Kapitel 5</b>	<b>Protokolle.....</b>	<b>76</b>
5.1	Kultivierung, Umsetzen und Ernten von Zellen.....	76
5.2	Zelllinien primärer CAFs .....	77
5.3	Charakterisierung der CAFs .....	77
5.4	Untersuchung der Zellviabilität in Monokulturen .....	78
5.5	Untersuchung der Zellviabilität in indirekten Ko-Kulturen .....	79
5.6	Untersuchung der Zellviabilität in direkten Ko-Kulturen .....	81
<b>Kapitel 6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
	Eidesstattliche Versicherung .....	97
	Lebenslauf.....	99
	Publikationsliste .....	100
	Danksagung .....	102

# Abbildungsverzeichnis

Grafik 1: Prozentuale Verteilung der Tumorentitäten gemessen anhand aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 .....	15
Grafik 2: Prozentuale Verteilung der Tumorentitäten gemessen anhand aller Krebssterbefälle in Deutschland 2014 .....	16
Grafik 3: Vorhergesagte Krebssterbefälle nach Tumorentitäten beider Geschlechter für 2020 und 2030 .....	17
Grafik 4: Vereinfachter Wirkmechanismus von Gemcitabin.....	18
Grafik 5: Darstellung des Notch-Signalweges .....	23
Grafik 6: H&E Färbung von humanem normalem und tumorösem Pankreasgewebe.....	24
Grafik 7: Schematische Darstellung des Tumorstromas des Pankreaskarzinoms .....	25
Grafik 8: Zellulärer Ursprung von Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs), PSCs – Pankreatische Stellarzellen, EMT – Epithelial-Mesenchymale Transition.....	28
Grafik 9: Schematische Darstellung von zwei-dimensionalen Kultursystemen.....	31
Grafik 10: Schematische Darstellung von dreidimensionalen Ko-Kultursystemen von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs).....	33
Grafik 11: Native Primärkulturen gewonnen durch A mechanische Dissoziation und nach B der Outgrowth Methode.....	37
Grafik 12: Schematische Darstellung des experimentellen Set-Ups von Monokulturen.....	38

Grafik 13: Schematische Darstellung des experimentellen Set-Ups von indirekten Ko-Kulturen .....	39
Grafik 14: Schematische Darstellung des experimentellen Set-Ups von direkten Ko-Kulturen .....	40
Grafik 15: Repräsentative immunhistochemische Färbungen der primärgewonnenen CAFs .....	44 - 45
Grafik 16: Kristallviolettffärbung der CAF Monokulturen und direkten Ko-Kulturen von AsPC mit CAFs.....	46
Grafik 17: Kristallviolettffärbung der CAF Monokulturen und direkten Ko-Kulturen von Panc-1 mit CAFs .....	47
Grafik 18: XTT-Messungen der Zellviabilität der AsPC Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit A Gemcitabin, B nab-Paclitaxel und C GSI.....	49
Grafik 19: XTT-Messungen der Zellviabilität der Panc-1 Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit A Gemcitabin, B nab-Paclitaxel und C GSI.....	50
Grafik 20: XTT-Messungen der Zellviabilität der CAF Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit A Gemcitabin, B nab-Paclitaxel und C GSI.....	51
Grafik 21: XTT-Messungen der Zellviabilität der AsPC Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Ko-Therapien von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI .....	52
Grafik 22: XTT-Messungen der Zellviabilität der Panc-1 Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Ko-Therapien von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI .....	53

Grafik 23: XTT-Messungen der Zellviabilität der CAF Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Ko-Therapien von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI .....	54
Grafik 24: XTT-Messungen der Zellviabilität von Monokulturen .....	55
Grafik 25: XTT-Messungen der Zellviabilität von AsPC in indirekte Ko-Kulturen nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI .....	56
Grafik 26: XTT-Messungen der Zellviabilität von Panc-1 in indirekte Ko-Kulturen nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI .....	57
Grafik 27: XTT-Messungen der Zellviabilität von CAFs in indirekte Ko-Kulturen nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI .....	58
Grafik 28: XTT-Messungen der Zellviabilität von indirekten Ko-Kulturen.....	59
Grafik 29: XTT-Messungen der Zellviabilität von direkten Ko-Kulturen .....	60
Grafik 30: XTT-Messungen der Zellviabilität von Monokulturen, indirekten und direkten Ko-Kulturen nach 48 Stunden. Zellen wurden therapiert mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI.....	62-63
Grafik 31: Kristallviolett färbung einer direkten Ko-Kultur mit humanen CAFs der Lunge und humanen Karzinomzellen eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms .....	71

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick der randomisierten Phase-III-Studien bei adjuvanter Chemotherapie nach R0/R1 Resektion .....	19
Tabelle 2: Überblick der randomisierten Phase-III-Studien bei adjuvanter Chemotherapie bei metastasierten Pankreaskarzinom .....	22
Tabelle 3: Überblick der primärgewonnenen Zellkulturen und der entsprechende Vergleich von Literaturangaben .....	42
Tabelle 4: Überblick der primärgewonnenen Stromazellen (CAFs). Die gewonnenen Stromazellen der sechs markierten (*) Patienten 33, 39, 41, 44, 46 und 49 waren vital genug, um in entsprechenden Experimenten der Mono-, indirekten und direkten Ko-Kultursysteme verwendet zu werden	43

# Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
ANOVA	Analysis of Variance
ABC-Transporter	ATP Binding Cassette-Transporter
CAFs	Tumorassoziierte Fibroblasten
CDA	Cytidineaminase
Cotrim	Cotrimoxazol
CSL	C-Protein Binding Factor 1
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein, Oberflächenprotein auf T-Zellen
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, von Tumorzellen exprimierter Chemokinrezeptor
dCK	Deoxycytidinkinase
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FOLFIRINOX	Folsäure, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin
GFAP	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
GSI	$\gamma$ -Sekretaseinhibitor

H&E	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
MMP	Matrix-Metalloprotease
NEC	Notch extracellular subunit
NTM	Notch transmembrane subunit
NEXT	Notch extracellular truncated
NICD	Notch Intracellular Domain
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PSC	Pankreatische Stellarzelle
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-Derived Factor 1 $\alpha$ , von CAFs sezerniertes Chemokin
Shh	Sonic Hedgehog
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
TAMs	Tumorassoziierte Makrophagen
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# Abstrakt

## Hintergrund

Das Pankreaskarzinom ist mit einer sehr hohen Mortalität verbunden. Dies ist unter anderem durch die unspezifischen Symptome, den schnellen Krankheitsprogress und ein hohes Rezidivrisiko, resultierend in einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate von nur 7%, bedingt.<sup>1</sup> Prognosen weisen auf, dass bis zum Jahr 2030 das Pankreaskarzinom die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten in Deutschland sein wird.<sup>2,3</sup> Trotz wesentlicher Fortschritte in den letzten Jahren, sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Behandlung, stehen für das Pankreaskarzinom nur wenige Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Die einzige kurativ intendierte Therapie bietet die Resektion des Tumors mit anschließender adjuvanter Chemotherapie. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten haben die etablierten Chemotherapeutika nur einen begrenzten Effekt. Für die hohe Chemoresistenz verantwortlich gemacht wird unter anderem das Tumorstroma, welches bis zu 90% des Tumorumfanges ausmacht.<sup>4-6</sup> Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Stromazellen auf das Therapieansprechen von Pankreaskarzinomzellen in-vitro zu untersuchen.<sup>7</sup>

## Methodik

Sechs primäre tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs) wurden von insgesamt 50 Patienten gewonnen. Die Interaktion zwischen CAFs und zwei etablierten Tumorzelllinien (AsPC und Panc-1) wurde in indirekten und direkten Ko-Kulturen untersucht und mit den entsprechenden Monokulturen verglichen.<sup>7</sup> Die Zellen wurden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und einem Notch-Inhibitor ( $\gamma$ -Sekretaseinhibitor) behandelt und die Zellviabilität eines jeden Komponenten mittels eines Zellproliferationsassays, XTT, gemessen.<sup>7</sup>

## Ergebnisse

In den CAF Monokulturen zeigte sich eine wesentlich geringere Reduktion der Zellviabilität verglichen mit den Monokulturen der Tumorzelllinien. Es konnte für nicht-immortalisierte CAFs

gezeigt werden, dass diese durch eine Chemotherapie kaum beeinflusst werden und somit das Tumorstroma selbst als ein resistenter Bestandteil des Pankreaskarzinoms anzusehen ist.<sup>7</sup> Während die Zellviabilität in indirekten Ko-Kulturen denen der Monokulturen ähnelte, sprachen direkte Ko-Kulturen kaum auf die untersuchten Therapeutika an.<sup>7</sup> Die einzige effektive Therapie war die Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel.<sup>7</sup> Da genau dieses Therapieregime auch in klinischen Studien als eines der effektivsten beschrieben wurde<sup>8</sup>, reflektiert das System der direkten Ko-Kulturen am ehesten die klinische Realität. Zudem wurden in direkten Ko-Kulturen Tumorzellagglomerate von CAFs umschlossen und formierten sich so zu käfig-ähnliche Strukturen.<sup>7</sup> Obwohl der Notch-Signalweg bekanntermaßen in direkten Ko-Kulturen aktiviert ist<sup>9,10</sup>, konnte durch den Einsatz eines Notch-Inhibitors das Ansprechen auf die Chemotherapie in direkten Ko-Kulturen nicht verbessert werden.

### **Zusammenfassung**

Abschließend konnte diese Arbeit zeigen, dass die Tumorresistenz im Wesentlichen durch die Eigenschaften der direkten Ko-Kulturen bedingt ist. Hierzu zählen der direkte Zell-Zell-Kontakt, die Extrazellulärmatrix und die Kulturmorphologie der käfig-ähnlichen Strukturen.<sup>7</sup>

## **Background**

Pancreatic cancer is one of the most lethal types of cancer because of its non-specific symptoms, rapid progress, high risk of relapse, all resulting in a low five-year survival rate of 7%.<sup>1</sup> Moreover, pancreatic cancer is progressively gaining attention since it is predicted to be the second most common lethal cause of cancer in Germany by 2030.<sup>2,3</sup> Treatment options, however, are limited and resection and adjuvant chemotherapy offer the only curative way. Compared to other types of cancer, limited progress has been made and pancreatic cancer still remains highly chemoresistant to any chemotherapeutic treatment known. One of the major reasons for the high chemoresistance is thought to be the stroma component which makes up to 90% of the tumor volume.<sup>4-6</sup> The main aim of this project, therefore, was to investigate the in-vitro effect stromal cells have on the therapeutic response of cancer cells.<sup>7</sup>

## **Methods**

Six patient derived cancer associated fibroblasts (CAFs) were isolated from a cohort of 50 patients. The interaction between CAFs and two well established cancer cell lines (AsPC and Panc-1) was investigated in indirect and direct co-cultures and compared to the corresponding monocultures.<sup>7</sup> Cells were treated with gemcitabine, nab-paclitaxel and a Notch-inhibitor ( $\gamma$ -secretase inhibitor) and the cell viabilities of each component was measured via XTT.<sup>7</sup>

## **Results**

In CAF monocultures the reduction in cell viability was far less pronounced than in cultures of cancer cells. For the first time, non-immortalized CAFs were found to be highly chemoresistant indicating that the tumor stroma itself is a strongly resistant component of the tumor's microenvironment.<sup>7</sup> Whilst the therapeutic effect observed in indirect co-cultures was similar to that of monocultures, direct co-cultures hardly responded to any therapies.<sup>7</sup> The only effective therapy being the co-therapy of gemcitabine and nab-paclitaxel.<sup>7</sup> Since clinical studies have identified this co-therapy to be one of the most effective ones<sup>8</sup>, the system of direct co-cultures reflects clinical reality. Moreover, in direct co-cultures tumor cell

agglomerates were surrounded by CAFs, forming cage-like structures.<sup>7</sup> Even though the Notch signaling pathway is known to be amplified in direct co-cultures<sup>9,10</sup>, treating direct co-cultures with a Notch-inhibitor did not show any therapeutic effect.

## **Conclusion**

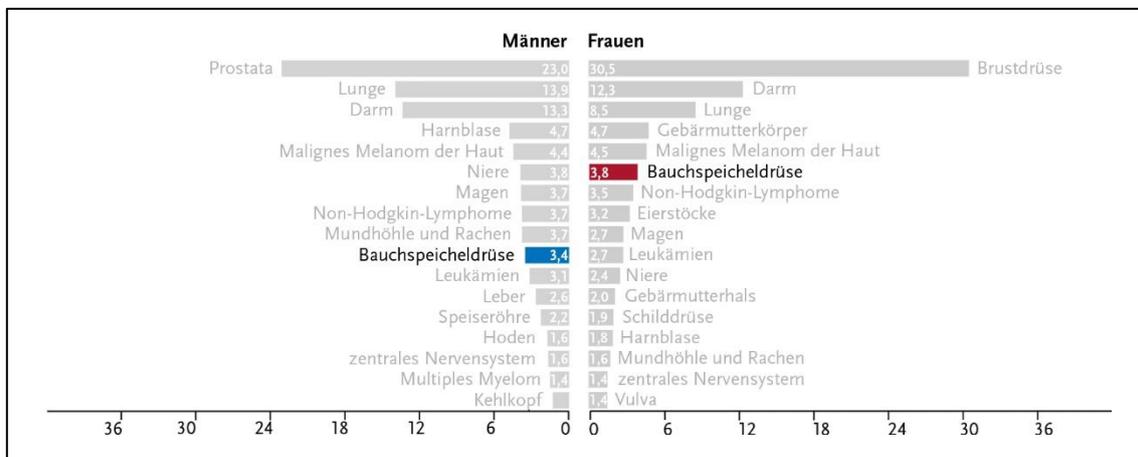
In conclusion, the results of this work have clearly linked the tumor's chemoresistance to the characteristics specific to direct co-cultures. Namely direct cell cell contact, the extracellular matrix and the morphology of cage-like structures.<sup>7</sup>

# Kapitel 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom nimmt unter den verschiedenen Krebsarten eine besondere Rolle ein, da die Erkrankung trotz derzeitiger Therapieansätze mit einer sehr geringen Überlebensrate einhergeht und laut der American Cancer Society 2016 93% aller Patienten binnen der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung versterben.<sup>11</sup>

Vergleicht man die Tumorzinzen unterschiedlicher Entitäten anhand der Krebssterbefälle, ist die des Pankreaskarzinoms verhältnismäßig niedrig. Während es bei Männern 2014 mit 3,4% nur das zehnthäufigste Karzinom war, stand es für Frauen mit 3,8% an sechster Stelle (siehe Grafik 1).<sup>12</sup> Wesentlich häufiger diagnostiziert wurden bei Männern u.a. Prostata-, Lungen- und Darmkrebs. Bei Frauen hingegen gehören Brustdrüsen-, Darm- sowie Gebärmutterkörperkrebs zu den häufigsten Tumorentitäten.<sup>12</sup>



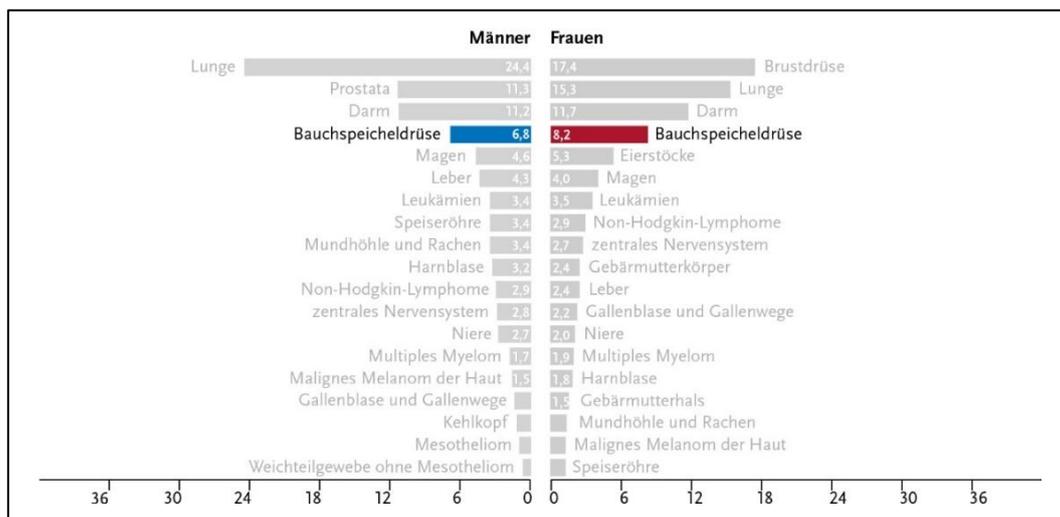
**Grafik 1** Prozentuale Verteilung der Tumorentitäten gemessen anhand aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014; Quelle: Zentrum Für Krebsregisterdaten 2014, Robert Koch Institut, modifiziert<sup>12</sup>

Entgegen vieler anderer Krebserkrankungen unterscheiden sich Inzidenz und Mortalität des Pankreaskarzinoms jedoch kaum. Während 2014 in Deutschland 17.100 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs erkrankten, betrug die Anzahl der Sterbefälle in selbigem Jahr

16.600.<sup>12</sup> Die Diagnose des Pankreaskarzinoms ist daher schwerwiegend und geht in den meisten Fällen mit dem Tod des Patienten einher.

Die hohe Mortalität ist hauptsächlich durch ein spätes Auftreten der Symptome und einen schnellen, therapieresistenten Progress der Erkrankung bedingt. 80% bis 85% aller Patienten haben bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes, nicht mehr resezierbares Pankreaskarzinom.<sup>13</sup> Die klinische Symptomatik ist meist unspezifisch und kann aus Oberbauch- und Rückenschmerzen, B-Symptomatik und ggf. einem schmerzlosen Ikterus durch Verlegung des Gallenganges im Rahmen eines Pankreaskopfkarzinoms bestehen. Bekannte Risikofaktoren sind u.a. Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus, sowie chronische Pankreatitis.<sup>14</sup> Auch eine familiäre Häufung wird beobachtet.<sup>14</sup>

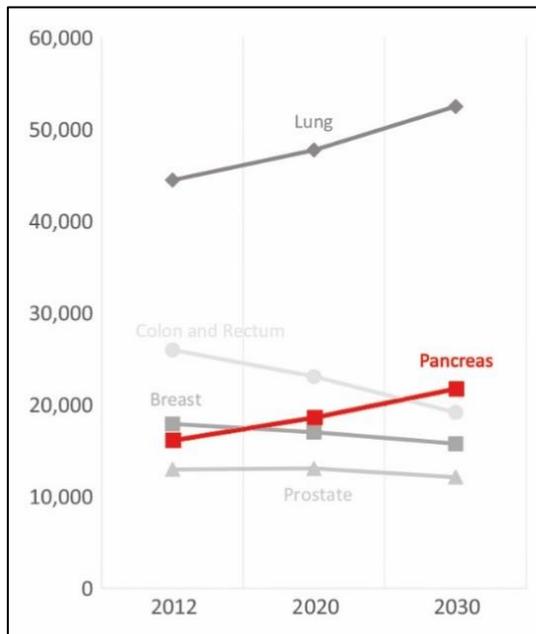
Bei direktem Vergleich der Krebssterbefälle in prozentualer Verteilung liegt das Pankreaskarzinom sowohl bei Männern (6,8% aller Krebssterbefälle), als auch bei Frauen (8,2% aller Krebssterbefälle) auf dem vierten Platz (siehe Grafik 2).<sup>12</sup>



**Grafik 2** Prozentuale Verteilung der Tumorentitäten gemessen anhand aller Krebssterbefälle in Deutschland 2014; Quelle: Zentrum Für Krebsregisterdaten 2014, Robert Koch Institut, modifiziert<sup>12</sup>

Trotz intensiver Forschung konnte die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Pankreaskarzinom in den letzten dreißig Jahren kaum gesteigert werden.<sup>1</sup> Zudem wird erwartet, dass das Pankreaskarzinom bis 2030 die zweithäufigste Todesursache nach dem

Lungenkarzinom bei Krebspatienten sein wird (siehe Grafik 3), häufiger als Brust- oder kolorektale Karzinome.<sup>2,3</sup> Auf dieser Grundlage kommt dem Pankreaskarzinom eine zentrale Rolle zuteil und es bedarf weiterer Forschung, um die Biologie des Tumors besser zu verstehen und effektive therapeutische Möglichkeiten entwickeln zu können.



**Grafik 3**

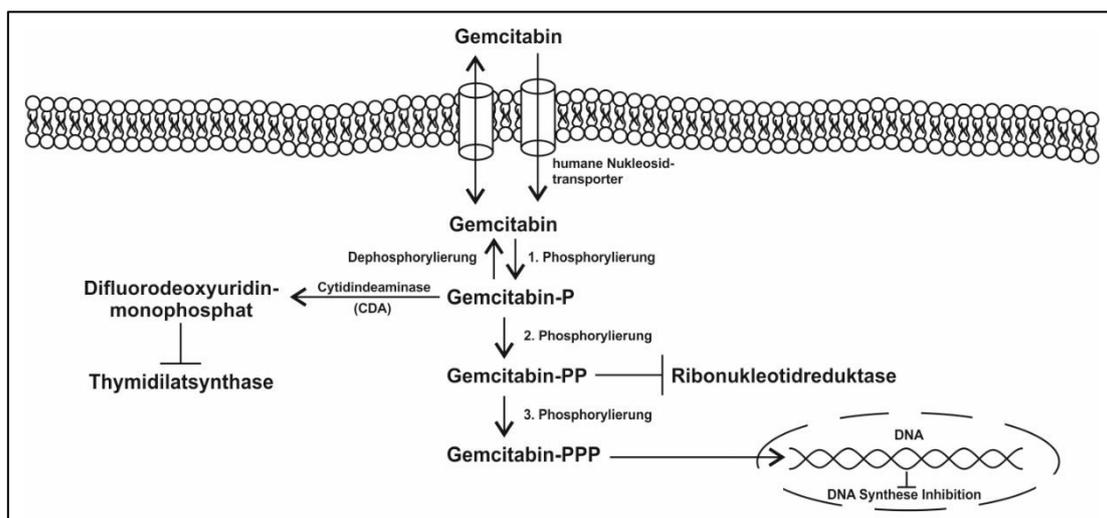
Vorhergesagte Krebssterbefälle nach Tumorentitäten beider Geschlechter für 2020 und 2030; Quelle: Quante AS, Ming C, Rottmann M, Engel J, Boeck S, Heinemann V, Westphalen CB, Strauch K. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Med* 2016;5:2649-2656, modifiziert<sup>3</sup>

## 1.2 Therapie des Pankreaskarzinoms

Die einzige kurative Therapie des Pankreaskarzinoms besteht in der radikalen chirurgischen Resektion des gesamten Tumors. Histopathologisch darf hierfür kein Tumorgewebe am Resektionsrand nachweisbar sein (R0-Resektion). Im Fall einer erfolgreichen R0-Resektion kann eine 5-Jahres-Überlebensrate von 24,2% erreicht werden, die bei einer R2-Resektion drastisch abfällt.<sup>15</sup>

Chemotherapeutisch wird das Pankreaskarzinom in der Regel sowohl adjuvant, als auch palliativ behandelt. 5-Fluorouracil (5-FU), ein Pyrimidinanalogon, welches als Antimetabolit anstelle von Uracil in die DNA eingebaut wird und somit die DNA-Synthese inhibiert, war das erste Therapeutikum, das bereits in den 1950ern bei der onkologischen Behandlung des Pankreaskarzinoms zur Behandlung kam.<sup>16</sup> Des Weiteren konnte für 5-FU eine Hemmung der Thymidilatsynthese, einem Schlüsselenzym der de-novo Synthese des Nukleotids Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), nachgewiesen werden.<sup>17</sup>

Erst Mitte der 1990er wurde ein weiteres Therapeutikum für die Behandlung des Pankreaskarzinoms entdeckt. Das Nucleosidanalogen Gemcitabin inhibiert die DNA Synthese und stoppt den Zellzyklus in der G1/S-Phase.<sup>18,19</sup> Über verschiedene Nucleosidtransporter wird es teils reversibel in die Zelle transportiert und mehrmals phosphoryliert.<sup>18,19</sup> Die erste Phosphorylierung ist reversibel. Das Triphosphat ist der eigentlich aktive Metabolit. Es wird in die DNA eingebaut, hemmt die DNA Polymerase und stoppt so die Synthese der DNA.<sup>18,19</sup> Zudem inhibiert das Diphosphat die Ribonucleotidreduktase, die die Synthese des konkurrierenden Nucleosidanalogs Desoxycytidintriphosphat (dCTP) hemmt und somit die Wirkung von Gemcitabin amplifiziert.<sup>18,19</sup> Intrazellulär abgebaut wird Gemcitabin von der Cytidineaminase (CDA) durch eine Deaminierung von Gemcitabinmonophosphat zu Difluorodeoxyuridinmonophosphat, das die Thymidilatsynthase inhibiert (siehe Grafik 4).<sup>18,19</sup>



**Grafik 4** Vereinfachter Wirkmechanismus von Gemcitabin; C.C.M. Neumann, Grafik basierend auf Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabin. Cancers (Basel) 2017;9.

In einer Studie mit 126 Patienten, die an einem nichtresezierbaren Pankreaskarzinom erkrankt waren, konnten *Burris et al.* 1997 eine geringe Lebensverlängerung von 4,41 Monaten (5-FU) auf 5,65 Monaten durch die palliative Behandlung mit Gemcitabin feststellen ( $P = 0,0022$ , siehe Tabelle 2). Neben der längeren Lebensdauer war das verbesserte klinische Wohlbefinden der Patienten ein entscheidender Vorteil bei der Behandlung mit Gemcitabin. Diese berichteten über geringere Schmerzen, einen besseren physischen Zustand und geringerem Gewichtsverlust.<sup>20</sup>

Auch in der adjuvanten Situation mit kurativer Intention nach R0 oder R1 Resektion konnte ein deutlicher Vorteil von Gemcitabin im Vergleich zu einer unbehandelten Gruppe von 722 Patienten in der CONKO-001 Phase-III-Studie nachgewiesen werden. Sowohl das mediane Überleben (22,8 versus 20,2 Monate,  $P = 0,01$ ), als auch das mediane krankheitsfreie Überleben (13,4 versus 6,7 Monate,  $P < 0,001$ ) wurden signifikant verbessert.<sup>22</sup> Jedoch konnte kein Vorteil von Gemcitabin gegenüber 5-FU bei der adjuvanten Behandlung nach R0 und R1 Resektion in einer anderen Phase-III-Studie mit 1088 Patienten (ESPAC-3) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1).<sup>21</sup>

Studie	Name der Studie	Patientenanzahl	Vergleich	R1 Resektion (%)	Medianes Überleben	P-Wert
Neoptolemos <i>et al.</i> (2009) <sup>21</sup>	ESPAC-3	1088	Gemcitabin vs. 5-FU	35	23,6 vs. 23,0	0,39
Oettle <i>et al.</i> (2013) <sup>22</sup>	CONKO-001	368	Gemcitabin vs. unbehandelt	19	22,8 vs. 20,2	0,01

**Tabelle 1** Überblick der randomisierten Phase-III-Studien bei adjuvanter Chemotherapie nach R0/R1 Resektion

In Folge der positiven Ergebnisse von Gemcitabin in der adjuvanten und palliativen Therapie folgten Studien, bei denen Gemcitabin mit anderen Chemotherapeutika, wie z.B. cis-Platin, kombiniert wurde.<sup>16</sup> Diese Studien ergaben jedoch keinen zusätzlichen Überlebensvorteil für die behandelten Patienten.<sup>16</sup>

Eine 2011 veröffentlichte Phase-III-Studie von *Conroy et al.* brachte weitere Erkenntnisse für die palliative Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms. Durch die Behandlung mit FOLFIRINOX (Folsäure, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin) konnte das mediane Überleben signifikant von 6,8 auf 11,1 Monate erhöht werden ( $P < 0,001$ , siehe Tabelle 2). Auch das mediane krankheitsfreie Überleben stieg von 3,3 Monate auf 6,4 Monate ( $P < 0,001$ ).<sup>23</sup> Bei diesem Behandlungsregime wurden jedoch starke Nebenwirkungen festgestellt, u.a. Zytopenie, Fatigue, Übelkeit, Diarrhö, periphere Neuropathie und ein erhöhtes

Thromboserisiko. Daher wird FOLFIRINOX nur als Erstlinientherapie bei der palliativen Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms für Patienten in gutem klinischen Zustand empfohlen (ECOG Performance Status 0 oder 1, Alter < 76, keine kardiale Ischämie, normale Bilirubinwerte).

Als alternativer Behandlungsplan bei Patienten in schlechtem klinischem Zustand steht derzeit die Kombinationstherapie von Gemcitabin mit nab-Paclitaxel zur Verfügung. Bei der Behandlung von 861 Patienten in einer Phase-III-Studie konnte bei der Kombinationstherapie eine deutliche Steigerung des medianen Überlebens im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin aufgezeigt werden (8,5 vs. 6,7,  $P < 0,001$ ). Auch das mediane krankheitsfreie Überleben stieg von 3,7 auf 5,5 Monate ( $P < 0,001$ , siehe Tabelle 2).<sup>8</sup> Obwohl nab-Paclitaxel in der Klinik mittlerweile routinemäßig eingesetzt wird, ist der genaue Wirkmechanismus nur teilweise verstanden. Nab-Paclitaxel ist ein an Albumin gebundenes Taxol, das ein besseres Verteilungsvolumen und eine höhere Bioverfügbarkeit hat, als konventionelles Paclitaxel, das als Spindelgift bzw. Mitoseinhibitor wirkt.<sup>24</sup> In einem Mausmodell konnte nachweislich gezeigt werden, dass sich nab-Paclitaxel besonders im Stroma des Pankreaskarzinoms anreichert und somit die in einer kleinen klinischen Studie mit 16 Patienten beobachtete Stromareduktion (geringere Anzahl von krebsassoziierten Fibroblasten) bei der Behandlung mit Gemcitabin mit nab-Paclitaxel erklärt.<sup>25,26</sup> Die sogenannte desmoplastische bzw. Bindegewebe-bildende Reaktion im Pankreaskarzinom führt zu einem sehr dichten Stroma, das durch die nachfolgende Hypovaskularisierung zur Chemoresistenz des Tumors beiträgt. Es wird vermutet, dass die durch nab-Paclitaxel hervorgerufene Stromareduktion das Tumorgewebe auflockert, die Barrierefunktion des Stromas durchbricht und somit eine Anreicherung von Gemcitabin in den Krebszellen begünstigt.<sup>26</sup> Obwohl in den klinischen Studien und in mehreren Mausmodellen von einer Stromareduktion bei der Therapie mit nab-Paclitaxel berichtet wurde<sup>25,27,28</sup>, konnte in anderen Mausmodellen keine Stromareduktion bei identischer Therapie beobachtet werden.<sup>26,29</sup> Ursprünglich wurde angenommen, dass sich nab-Paclitaxel durch den Albumintransporter SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) in den Stromazellen anreichert. Andere Untersuchungen widersprachen jedoch dieser Theorie und konnten eine

SPARC-unabhängige Aufnahme von nab-Paclitaxel in die Zelle nachweisen.<sup>26,29</sup> Zudem konnte in einer Phase-III-Studie (MPACT Trial) mit 256 Patienten gezeigt werden, dass die SPARC-Expression nicht mit dem Therapieansprechen von nab-Paclitaxel korreliert.<sup>30</sup> Auf Grund dieser sich widersprechenden klinischen und experimentellen Ergebnissen bleibt der genaue Wirkmechanismus von nab-Paclitaxel bis auf Weiteres unklar. Zudem ist bekannt, dass nab-Paclitaxel das Gemcitabin-abbauende Enzym, die Cytidineaminase (siehe Grafik 4), hemmt und somit die intrazelluläre Konzentration von Gemcitabin und dessen Wirkungsgrad erhöht.<sup>31</sup>

Ein neuer Ansatz in der Behandlung von onkologischen Erkrankungen stellt die Immuntherapie dar, die in den letzten Jahren wesentlicher Bestandteil onkologischer Forschung und onkologischen Fortschritts gewesen ist. Analog zu anderen Tumorentitäten kann das Pankreaskarzinom Strategien zur sogenannten Immunevasion entwickeln. Durch gezielte Antikörper kann die Evasion inhibiert und dadurch eine stärkere Immunreaktion des Körpers gegen den Tumor hervorgerufen werden. Entsprechende Studien mit Immunantikörpern, wie z.B. Ipilimumab, sind jedoch noch in ihrer Anfangsphase. Schlüsse hinsichtlich eines Behandlungserfolgs können zu diesem Zeitpunkt noch nicht gezogen werden. Da 90% aller Pankreastumoren eine Überexpression des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGFR) aufweisen und dieser Rezeptor entscheidend für die Zellproliferation der Tumorzellen ist<sup>16</sup>, war es naheliegend den Tumor durch eine Inhibition dieses Rezeptors gezielt zu therapieren. In einer Phase-III-Studie mit 569 Patienten mit dem EGFR-Antikörper Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin konnte allerdings nur ein moderater Anstieg des medianen Überlebens verzeichnet werden (6,24 vs. 5,91 Monate,  $P = 0,038$ , siehe Tabelle 2).

Studie	Patientenanzahl	Vergleich	Medianes Überleben	P-Wert	Medianes Krankheitsfreies Überleben	P-Wert
Burris, <i>et al.</i> (1997) <sup>20</sup>	126	Gemcitabin vs. 5-FU	5,65 vs. 4,41	0,0022	2,3 vs. 1,0	0,0002
Conroy <i>et al.</i> (2011) <sup>23</sup>	342	FOLFIRINOX vs. Gemcitabin	11,1 vs. 6,8	< 0,001	6,4 vs. 3,3	< 0,001
Von Hoff <i>et al.</i> (2013) <sup>8</sup>	861	Gemcitabin + nab-Paclitaxel vs. Gemcitabin	8,5 vs. 6,7	< 0,001	5,5 vs. 3,7	< 0,001
Moore, <i>et al.</i> (2007) <sup>32</sup>	569	Gemcitabin + Erlotinib vs. Gemcitabin	6,24 vs. 5,91	0,038	3,75 vs. 3,55	0,004

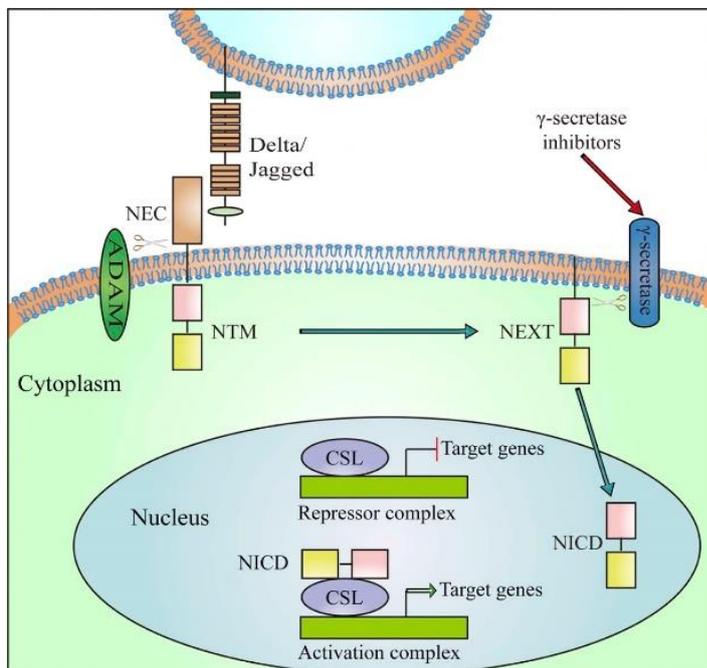
**Tabelle 2** Überblick der randomisierten Phase-III-Studien bei adjuvanter Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom

Signalwegsinhibitoren verfolgen dagegen einen anderen Therapieansatz. Durch die Inhibition von hochregulierten Signalwegen im Pankreaskarzinom, die die Proliferation, Metastasierung und Resistenz des Tumors begünstigen, wird versucht dem Effekt dieser Signalwege entgegenzuwirken und somit aufzuheben. Ein bekannter Signalweg ist der Sonic Hedghog (Shh)-Signalweg.<sup>16</sup> Während im Mausmodell die Inhibitoren des Shh-Signalweges zu einer Auflockerung des Stromas und einer höheren Wirksamkeit von Gemcitabin führten, musste eine Phase-II-Studie mit einem Shh-Inhibitor (IPI-926) aufgrund eines deutlich reduzierten Überlebens abgebrochen werden.<sup>16</sup>

Ein weiterer im Pankreaskarzinom entscheidender Signalweg ist der Notch-Signalweg (siehe Grafik 5).<sup>33</sup> Dieser ist vor allem für Zellproliferation, Differenzierung und Zellentwicklung von großer Bedeutung. Durch Ligandenbindung an unterschiedlichen Notch-Rezeptoren kommt es zu zwei aufeinanderfolgenden proteolytischen Spaltungen des Rezeptors. Die erste proteolytische Spaltung erfolgt durch sogenannte ADAM-Proteasen, die zweite durch die membrangebundene  $\gamma$ -Sekretase. Das proteolytische Produkt der Spaltung wandert

anschließend in den Zellkern und beeinflusst die Exprimierung unterschiedlicher Gene, die das Tumorwachstum (C-myc, Cyclin D1, Hes, Hey, Cox-2), die Invasion, Metastasierung und Migration (VEGF, MMP9) beeinflussen.<sup>34</sup> Ein potentieller therapeutischer Ansatz zur Inhibition des Notch-Signalweges ist der  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (GSI), dessen Einsatz bereits in Mausmodellen des Pankreaskarzinoms zu einem signifikant reduzierten Tumorwachstum führte.<sup>35,36</sup>

Cook *et al.* publizierten im März 2018 eine Phase-I-Studie, in der 44 Pankreaskarzinompatienten mit Gemcitabin und einem  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (MK-0752) behandelt wurden. Insgesamt wurde bei 13 Patienten ein verlängertes stabiles Krankheitsbild und bei einem Patienten ein Therapieansprechen beobachtet. Das mediane Überleben betrug 8,2 Monate, allerdings ohne Vergleichsgruppe mit einer Gemcitabin Monotherapie.<sup>37</sup> Größere klinische Studien zur Untersuchung von  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms wurden bislang noch nicht durchgeführt.



**Grafik 5**

Darstellung des Notch-Signalweges;

NEC – Notch ExtraCellular subunit,

NTM – Notch TransMembrane subunit,

NEXT – Notch extracellular truncated,

NICD – Notch Intracellulär Domain,

CSL – C Protein Binding Factor 1

Quelle: Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H,

Chu Q, Yu S, Wu GS, Wu K. Notch

signaling: An emerging therapeutic

target for cancer treatment. Cancer

Letters 2015;369:20-27, modifiziert<sup>33</sup>

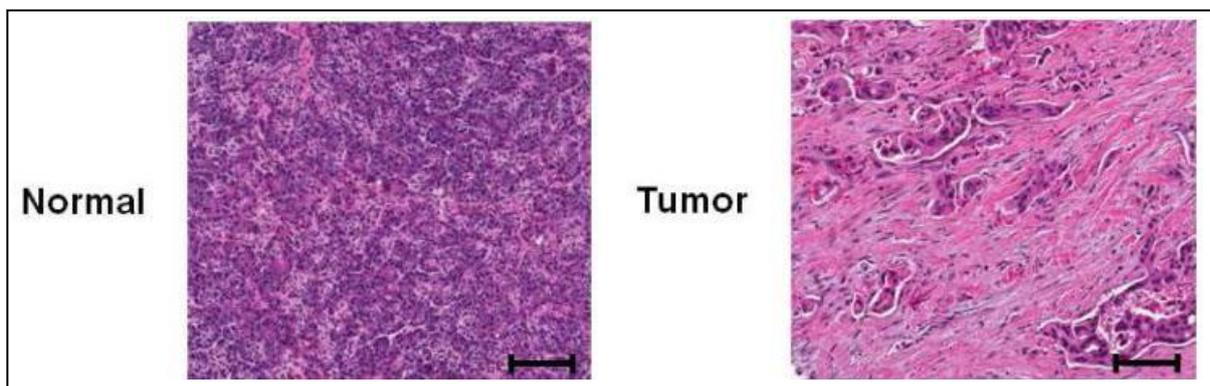
Neben der adjuvanten und palliativen Chemotherapie wird seit einigen Jahren auch die Möglichkeit einer neoadjuvanten Therapie für das Pankreaskarzinom diskutiert. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass eine neoadjuvante Behandlung zu höheren R0 Resektionsraten

bei Patienten mit Borderline- oder lokal fortgeschrittenem Tumor führt und somit das mediane Überleben verlängert werden kann.<sup>38</sup> Eine neoadjuvante Behandlung wird derzeit in zahlreichen Studien durchgeführt, ist allerdings noch kein Bestandteil der Leitlinientherapie des Pankreaskarzinoms.<sup>38</sup>

Basierend auf den bisherigen Forschungsergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass innerhalb der letzten 10 Jahre deutliche Fortschritte in der Therapie des Pankreaskarzinoms gemacht werden konnten. Dennoch sind die Therapieergebnisse meist noch immer nicht zufriedenstellend und viele Patienten versterben frühzeitig. Weitere Erkenntnisse und intensive Forschung sind daher essentiell für die Entwicklung besserer Behandlungsmöglichkeiten.

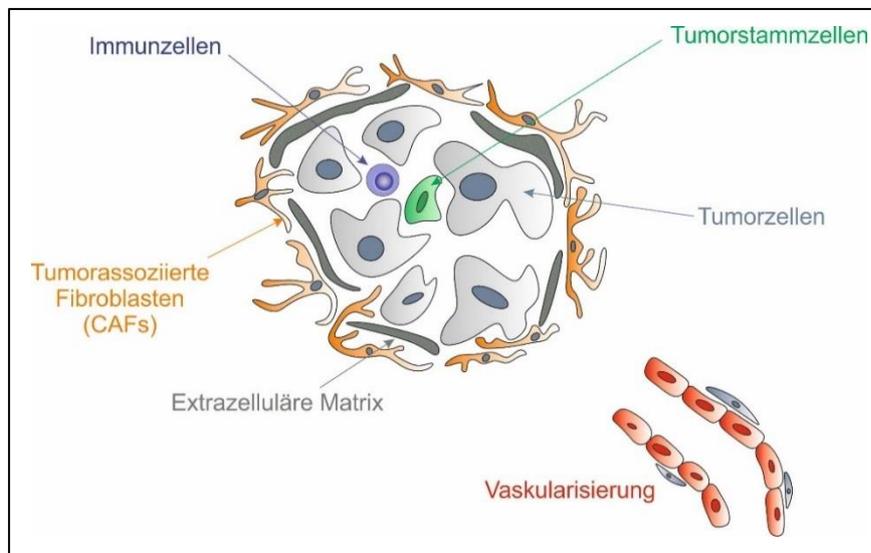
### 1.3 Das Tumorstroma des Pankreaskarzinoms

Die Heterogenität und Komplexität des Pankreaskarzinoms ist eine große Hürde für eine effektive Therapie. Eine der wichtigsten Komponenten des Pankreaskarzinoms stellt das Tumorstroma dar. Es kann bis zu 90% des Tumorumfanges ausmachen<sup>4-6</sup> und ist histologisch gut abgrenzbar (siehe Grafik 6).



**Grafik 6** H&E Färbung von humanem normalem und tumorösem Pankreasgewebe; Quelle: Whatcott CJ, Han H, Posner RG, et al. Tumor-Stromal Interactions in Pancreatic Cancer. Crit Rev Oncog 2013;18:135–151<sup>39</sup>

Das tumorassoziierte Stroma setzt sich aus extrazellulären Matrixproteinen, Fibroblasten, Stellarzellen, Endothelzellen, Immunzellen und Neuronen zusammen (siehe Grafik 7).<sup>40</sup>



**Grafik 7**

Schematische Darstellung des Tumorstromas des Pankreaskarzinoms;

Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

Es wird vermutet, dass das Tumorstroma mitverantwortlich für die hohe Chemoresistenz, das schnelle Tumorwachstum, sowie für die frühe Metastasierung des Pankreaskarzinoms ist.<sup>41</sup> Es dient den Tumorzellen als physikalische Barriere, die die Diffusion und Perfusion von Sauerstoff aber auch Chemotherapeutika einschränkt.<sup>41</sup> Inflammatorische Reaktionen im Tumor führen zu einer Fibrosierung, die den interstitiellen Flüssigkeitsdruck im Tumor erhöhen und somit die Diffusion von Substanzen verlangsamen.<sup>42</sup> Zeitgleich werden Gefäße komprimiert, was zu einer Minderperfusion des Tumors führt.<sup>42</sup> Ein wichtiger Bestandteil des Tumorstromas, der zur Barrierefunktion beiträgt, ist die Hyaluronsäure. In einem Mausmodell konnten *Provenzano et al.* durch eine Hyaluronidase (PEGPH20) das Stroma deutlich reduzieren und die Barrierefunktion des Tumorstromas durchbrechen.<sup>42</sup> Sowohl die Perfusion, als auch die Diffusion wurden so deutlich verbessert. Dadurch konnte bei einer Ko-Therapie Gemcitabin zu den Tumorzellen durchdringen und seine chemotherapeutische Wirkung entfalten. Dies führte zu einem 1,6-fachen Anstieg des medianen Überlebens der Mäuse von 55,5 auf 91,5 Tage ( $P = 0,004$ ).<sup>42</sup> In einer im Februar 2018 veröffentlichten Phase-II-Studie mit 279 Patienten wurde PEGPH20 zusammen mit nab-Paclitaxel und Gemcitabin verabreicht und mit der alleinigen Ko-Therapie nab-Paclitaxel und Gemcitabin verglichen.<sup>43</sup> Auch hier konnte

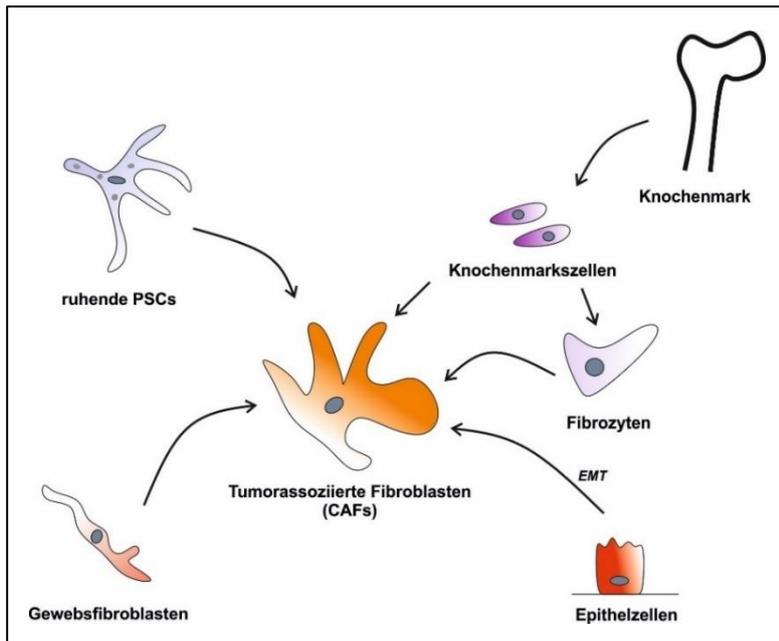
ein besseres Therapieansprechen und ein höheres medianes Überleben der Patienten mit hyaluronreichen Tumoren beobachtet werden (11,7 vs. 7,8 Monate,  $P = 0,13$ ).<sup>43</sup>

Sowohl die eingeschränkte Perfusion und Diffusion von Sauerstoff in das Tumorgewebe<sup>44</sup>, als auch der erhöhte metabolische Umsatz der Tumorzellen<sup>45</sup> tragen zu einem hypoxischen Tumormilieu bei. *Masamune et al.* konnten zeigen, dass tumorassoziierte Fibroblasten (Cancer Associated Fibroblasts, CAFs) unter hypoxischen Bedingungen zur Synthese von extrazellulären Matrixproteinen stimuliert werden.<sup>46</sup> Die daraus resultierende desmoplastische Reaktion schränkt die Diffusion und Perfusion weiter ein und reduziert zusätzlich die Sauerstoffzufuhr. Zudem ist bekannt, dass die hypoxische Umgebung einen starken Migrationsreiz für Tumorzellen darstellt.<sup>47</sup> Das hypoxische Milieu begünstigt die epithelial-mesenchymale Transition, reduziert Zell-Zell-Kontakte und erhöht die Interaktionen der Zellen mit Integrinen und anderen Zelladhäsionsmolekülen.<sup>48</sup> Die Folge ist ein erhöhtes Metastasierungspotential. Ferner werden in den Tumorzellen durch die sauerstoffarme Umgebung Transkriptionsfaktoren (u.a. HIF-1 $\alpha$ ) hochreguliert.<sup>49</sup> Diese Transkriptionsfaktoren aktivieren nachweislich Signalwege, die eine Chemoresistenz gegenüber Medikamenten wie Gemcitabin begünstigen.<sup>49</sup> Somit kann festgehalten werden, dass das hypoxische Tumorstroma die Physiologie des Tumors auf entscheidende Weise beeinflusst und zu einer erhöhten Fibrosierung, Metastasierung und Chemoresistenz beiträgt.

Ein weiterer Bestandteil des Tumors sind die Tumorstammzellen, die weniger als 5% des Tumolvolumens ausmachen, jedoch aufgrund ihres hohen Proliferationspotentials von entscheidender Bedeutung sind<sup>50,51</sup> und zu Tumorzellen differenzieren können.<sup>52,53</sup> Sie exprimieren in der Regel vermehrt ATP Binding Cassette (ABC)-Transporter, die zu einem erhöhten Efflux von Chemotherapeutika und einer dadurch resultierenden Chemoresistenz führen. Subgruppen von Tumorstammzellen exprimieren weniger E-Cadherin, was die Metastasierung dieser Zellen begünstigt.<sup>52</sup> Eine klinische Studie von *Ischenko et al.* konnte zeigen, dass eine höhere Tumorstammzellpopulation im Pankreaskarzinom mit einer deutlich geringeren 5-Jahres-Überlebensrate korreliert.<sup>54</sup> Hierbei wurden Tumorresektate von 80

Patienten hinsichtlich des für Tumorstammzellen spezifischen Markers CD133 untersucht.<sup>54</sup> Bei Patienten ohne nachweisliche CD133-positive Stammzellfraktion lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei 23,5%.<sup>54</sup> Bereits ein Anstieg der CD133-positiven Tumorstammzellen auf bis zu 5% aller Tumorzellen ging mit einer deutlich geringeren 5-Jahres-Überlebensrate von 3,4% einher. Bei über 5% fiel die 5-Jahres-Überlebensrate auf 0%.<sup>54</sup> Daher kann geschlussfolgert werden, dass eine alleinige Tumorregression nicht unbedingt mit einem besseren Überleben korrelieren muss, da der Anteil der Tumorstammzellen entscheidend für die hohe Proliferations-, Metastasierungs- und Rezidivrate des Pankreaskarzinoms ist. Drei sehr wichtige und evolutionär konservierte Signalwege Wnt, Hedgehog und Notch sind nachweislich für die Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen von großer Bedeutung.<sup>55</sup> Eine Inhibition einer dieser Wege bietet daher eine gezielte Therapie gegen Tumorstammzellen. Am Beispiel des Notch-Signalweges konnte in-vitro gezeigt werden, dass eine Signalwegsinhibition durch einen  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor zu einer Reduktion der Tumorstammzellpopulation führt und das Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen deutlich einschränkt.<sup>56</sup> Des Weiteren konnten *Abel et al.* in einem Mausmodell durch den Einsatz eines  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors das Tumorwachstum aufhalten und nachweislich die Stammzellpopulation in-vivo reduzieren.<sup>57</sup>

Die zelluläre Komponente des desmoplastischen Stromas bilden die tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs). Sie entstammen aus unterschiedlichen Ursprungszellen, vor allem aber aus ruhenden pankreatischen Stellarzellen (PSCs).<sup>58</sup> Gewebsfibroblasten, Knochenmarkszellen und Fibrozyten können ebenfalls zu CAFs differenzieren.<sup>58</sup> Es wird zudem angenommen, dass CAFs über Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) von Epithelzellen entstammen können (siehe Grafik 8).<sup>58</sup> Allen CAFs gemeinsam ist die Expression des Proteins  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA).<sup>58</sup>



**Grafik 8**

Zellulärer Ursprung von Tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs), PSCs – Pankreatische Stellarzellen, EMT – Epithelial-Mesenchymale Transition; Quelle: Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated

fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. World J Gastroenterol 2016;22:2678-2700, modifiziert<sup>58</sup>

Die Differenzierung zu CAFs wird durch inflammatorische Mediatoren, wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-10, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und TNF- $\beta$  begünstigt.<sup>58</sup> Ruhende PSCs verlieren ihre intrazellulären Vitamin-A-Speicher und beginnen  $\alpha$ -SMA zu exprimieren.<sup>58</sup> Im aktivierten Zustand produzieren CAFs selbst inflammatorische Botenstoffe und sind Hauptproduzenten extrazellulärer Matrixproteine und parakriner Mediatoren, die die Proliferation, Inflammation, Zellmotilität, Migration und Invasion stimulieren.<sup>49,58</sup>

Über Zytokine und Wachstumsfaktoren kommunizieren CAFs mit Tumorzellen und beeinflussen selbige. Ein exemplarisches Beispiel für die Tumor-Stroma-Interaktion ist die Stromal cell-Derived Factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) / CXCR-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) Achse. CAFs sezernieren das Chemokin SDF-1 $\alpha$ , das mit dem von Tumorzellen exprimierten Chemokinrezeptor CXCR4 interagiert.<sup>59</sup> Die Aktivierung von CXCR4 führt nachweislich zu einer autokrinen Sekretion von IL-6, das die Expression von Apoptosegenen in den Tumorzellen herunterreguliert und damit die Apoptose inhibiert.<sup>59</sup> Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibition dieser Kaskade zu einer gesteigerten Wirksamkeit von Gemcitabin in in-vitro Experimenten führte.<sup>59</sup> Die Tumor-Stroma-Interaktion ist äußerst komplex, da neben IL-6 auch andere Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und PDGF, die Proliferation, Zellinvasion, Migration und Fibrosierung beeinflussen.<sup>60-65</sup>

Auch die extrazelluläre Matrix selbst hat einen Effekt auf die Tumorzellen und die Resistenzentwicklung gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutika. *Miyamoto et al.* konnten in in-vitro Experimenten zeigen, dass die alleinige Interaktion von Tumorzellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Kollagen I und IV) ein vermindertes Therapieansprechen der Tumorzellen gegenüber Gemcitabin, cis-Platin und 5-FU zur Folge hat.<sup>66</sup>

Nicht immer führt jedoch eine Stromareduktion zu einer Tumorreduktion. In einem Experiment untersuchten *Özdemir et al.* genetisch modifizierte Mäuse, bei denen eine Expression der Thymidinkinase des Herpes-simplex-Virus mit dem Promotor des  $\alpha$ -SMA-Gens gekoppelt war.<sup>67,68</sup> Bei der Behandlung mit Ganciclovir konnte das Virostatikum durch die Thymidinkinase in eine aktive Form, die die Zellreplikation inhibiert, umgewandelt werden und somit  $\alpha$ -SMA-positive Fibroblasten abtöten.<sup>67</sup> Die so behandelten Tumoren zeigten eine deutliche Reduktion des Stromas. Entgegen den ursprünglichen Erwartungen führte die Reduktion des Stromavolumens zu gesteigertem Tumorwachstum, geringerer Differenzierung, erhöhter Metastasierungstendenz und verfrühter Mortalität.<sup>67</sup> In einem anderen Mausmodell wurde eine Stromareduktion durch die genetische und pharmakologische Inhibition des Shh-Signalweges hervorgerufen. Einem Schlüsselsignalweg, der für die desmoplastischen Reaktionen im Pankreastumor verantwortlich gemacht wird. Auch in diesem Fall führte die Reduktion des Stromas zu einem schnellen Progress des Pankreaskarzinoms und einer erhöhten Mortalität.<sup>69</sup> Des Weiteren musste eine Phase-II-Studie mit dem Shh-Inhibitor Saridegib abgebrochen werden, da die Reduktion des Stromas durch die Therapie mit einer deutlich reduzierten Lebenserwartung der Patienten einherging.<sup>70</sup> Auch eine erhöhte Stromadichte bei humanen Tumorresektaten konnte mit einer signifikant erhöhten Lebenserwartung korreliert werden.<sup>71</sup>

Ein Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Ergebnisse birgt die zelluläre Komponente des Stromas, die hauptsächlich aus krebsassoziierten Fibroblasten (CAFs) besteht. *Öhlund et al.* konnten nachweisen, dass CAFs sowohl in-vitro, als auch in-vivo Subpopulationen von inflammatorischen und myofibroblastischen CAFs bilden. Während in inflammatorischen CAFs

eine reduzierte Expression von  $\alpha$ -SMA und eine gesteigerte IL-6 Sekretion beobachtet wurde, verhielten sich myofibroblastische CAFs genau gegenteilig ( $\alpha$ -SMA Expression erhöht, IL-6 Sekretion verringert).<sup>72</sup> In dem von *Özdemir et al.* bereits erwähnten Mausmodell wurde eine prognostisch ungünstige Stromareduktion durch die Reduktion von  $\alpha$ -SMA-positiven Fibroblasten herbeigeführt. In diesem Fall kann angenommen werden, dass die Stromareduktion wahrscheinlich mit einer selektiven Reduktion der myofibroblastischen CAFs, einer bevorzugten Selektion inflammatorischer CAFs und einer gesteigerten IL-6 Sekretion einhergegangen ist und mit einer schlechteren klinischen Prognose korreliert. Mit der Stromareduktion einhergehend konnte in selbigem Mausmodell eine veränderte Komposition von Immunzellen im Tumorstroma beobachtet werden. Die Konzentration von zytotoxischen T-Zellen fiel ab, die regulatorischer T-Zellen stieg an. Auch eine Amplifikation von CTLA-4, einem Oberflächenprotein auf T-Zellen, konnte beobachtet werden.<sup>67</sup> Durch eine gezielte Reduktion der T-Zellen durch den humanen CTLA-4 Antikörper Iplimumab konnte der negative Effekt der Stromareduktion in diesem Mausmodell aufgehoben werden.<sup>67</sup>

Immunzellen sind ein zentraler Bestandteil des Tumorstromas. Es ist bekannt, dass Leukozyteninfiltrate prinzipiell mit einer schlechteren Prognose korrelieren.<sup>40</sup> Durch den inflammatorischen Prozess innerhalb des Tumorstromas kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die die Aktivierung von CAFs und die daraus resultierende Fibrosierung und Chemoresistenzentwicklung begünstigt.<sup>49</sup> Untersuchungen von *Amit et al.* zeigten zudem, dass auch tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) einen Effekt auf Tumorzellen haben. Über parakrine Faktoren wurde die Expression der Cytidineaminase, des Abbauenzym von Gemcitabin (siehe Grafik 4), in Tumorzellen amplifiziert und eine entsprechende Chemoresistenz hervorgerufen.<sup>73</sup> Eine andere wichtige Funktion der Immunzellen ist die Ausschüttung eines spezifischen Zytokinprofils, das eine Immunsuppression des Tumors ermöglicht.<sup>74</sup>

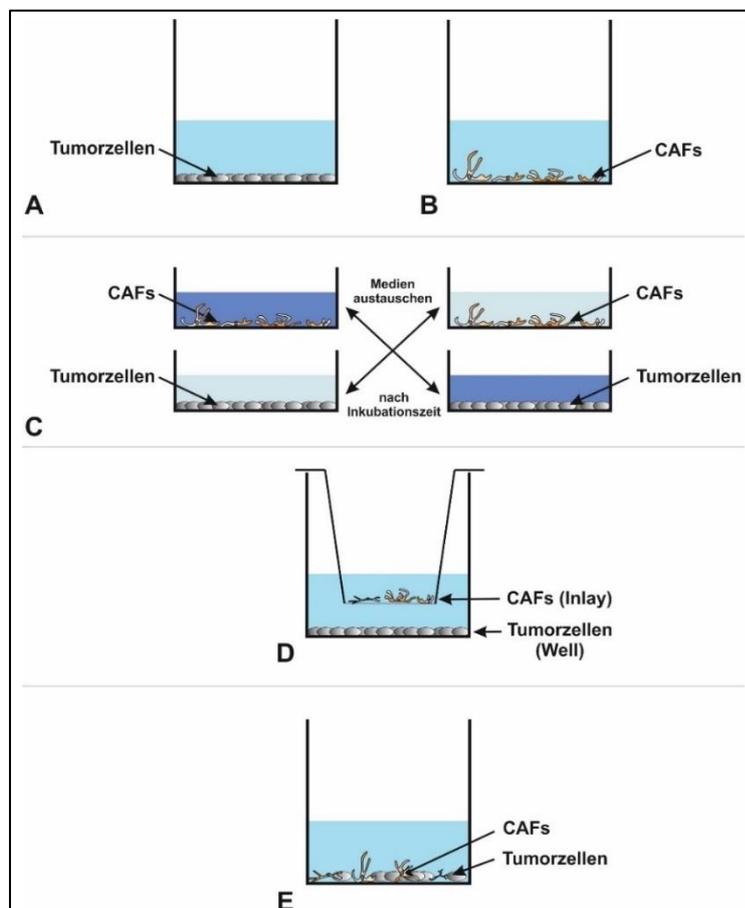
Somit lässt sich festhalten, dass einerseits ein besseres Ansprechen einer Therapie durch eine Stromareduktion möglich ist, andererseits jedoch eine Reduktion des Stromas durch die Verringerung seiner protektiven Elemente genau gegenteilige Effekte herbeiführen kann.

## 1.4 In-vitro Modelle des Pankreaskarzinoms

Die ersten in-vitro Untersuchungen des Pankreaskarzinoms basierten auf einfachen zweidimensionalen Zellkulturen von standardisierten und immortalisierten Tumorzelllinien, um das Wachstumsverhalten neoplastischer Zellen zu untersuchen und zu normalem Pankreasgewebe zu differenzieren (siehe Grafik 9 A und B).<sup>75,76</sup> Dies ermöglichte genomische Analysen dieser Zelllinien und funktionelle Untersuchungen von Migration, Invasion, Tumorgenität und Chemoresistenz.<sup>77</sup>

Allerdings ist inzwischen akzeptiert, dass nicht nur die Untersuchung von Tumorzellen, sondern auch die von Tumorstromazellen essentiell ist. Als Resultat wurden neue in-vitro

Systeme entwickelt, in denen Tumor- und Stromazellen miteinander interagieren und sich gegenseitig beeinflussen konnten (siehe Grafik 9 C bis E).



**Grafik 9** Schematische Darstellung von zwei-dimensionalen Kultursystemen, Monokulturen von **A** Tumorzellen und **B** Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs), **C** System der präkonditionierten Medien, **D** indirekter Ko-Kulturen und **E** direkter Ko-Kulturen; Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

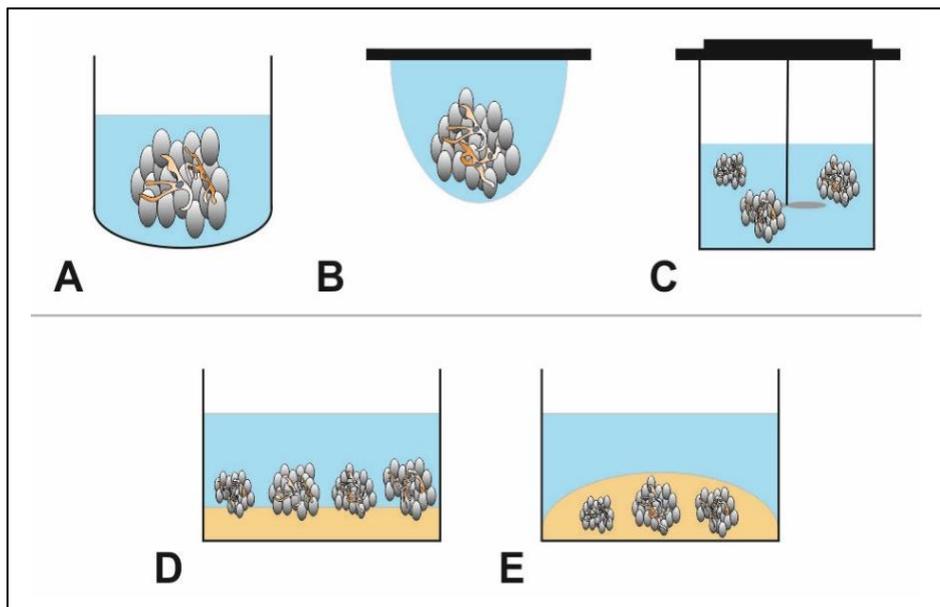
Das mit Abstand einfachste und immer noch häufig verwendete Kultursystem ist das der präkonditionierten Medien (siehe Grafik 9 C).<sup>9,59,78,79</sup> Hierbei wird eine Zellart für eine bestimmte Zeit inkubiert, das Medium anschließend abgenommen und in eine andere Kulturflasche, die einen anderen Zelltyp enthält, überführt. Somit kann auf einfachstem Weg untersucht werden, inwieweit die einen Zellen die anderen über lösliche Faktoren beeinflussen. Klarer Nachteil dieser Methode ist eine unidirektionale Interaktion, welche die Tumor-Stroma-Interaktion sehr vereinfacht.

Ein etwas komplexeres System, das eine Interaktion zwischen Tumor- und Stromazellen zulässt, sind Transwell-Systeme (siehe Grafik 9 D).<sup>80,81</sup> In Transwell-Versuchen wächst eine Zellart im unteren Well, die andere auf der Membran des Inlays. Geteilt werden die zwei Kompartimente durch eine poröse Membran, die einen Austausch des Mediums und der darin enthaltenen löslichen Faktoren ermöglicht. Eine größere Porengröße der Membran kann die Migration der Zellen im Inlay durch die Membran in das untere Kompartiment zulassen. Diese Variante findet als Boyden-Chamber breite Anwendung für die in-vitro Untersuchung von Migration.<sup>82-84</sup>

In direkten Ko-Kulturen werden unterschiedliche Zelltypen zusammen in einem gemeinsamen Kompartiment ausgesetzt (siehe Grafik 9 E).<sup>10</sup> Hierbei sind direkte Zell-Zell-Kontakte möglich und erlauben eine kontaktspezifische Interaktionskomponente zusätzlich zur parakrinen Kommunikation.

Innerhalb der letzten Jahre wurde der Fokus zunehmend auf dreidimensionale in-vitro Kulturen gerichtet. Durch die dritte Dimension werden die Zell-Zell-Kontakte erhöht und die Interaktion zwischen den Zellen gefördert. Entgegen zweidimensionaler Kulturen, können sich in drei Dimensionen nekrotische und hypoxische Areale innerhalb der Kultur durch die Unterversorgung der im Kern befindlichen Zellen bilden. Auch die Morphologie dreidimensionaler Kulturen gleicht eher der Morphologie in-vivo.<sup>85</sup> Luca et al. zeigten 2013, dass sich zwei- von dreidimensionalen Zellkulturen von ihrer Genexpression unterscheiden. Durch die Zweidimensionalität und die Adhärenz auf Plastik werden bestimmte Signalwege

herunterreguliert, die für das Zellwachstum, den Metabolismus und die Differenzierung in-vivo von entscheidender Bedeutung sind.<sup>86</sup> Auch eine höhere Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin in einer dreidimensionalen Zellkultur konnte nachgewiesen werden.<sup>87</sup> Klare Nachteile von dreidimensionalen Kultursystemen sind jedoch die aufwändigere und komplexere Herstellung und Handhabung und die deutlich geringere Reproduzierbarkeit gegenüber zweidimensionaler Kulturen.<sup>85</sup> Es stehen mehrere dreidimensionale Kultursysteme zur Verfügung (siehe Grafik 10). Einerseits kann man durch eine Beschichtung die Adhärenz der Zellen verhindern und somit eine sphäroide Kulturbildung herbeiführen (siehe Grafik 10 A), andererseits kann man eine sphäroide Kulturbildung auch in einem hängenden Tropfen Medium (siehe Grafik 10 B) oder einem Bewegungsreaktorsystem (siehe Grafik 10 C) beobachten. Andere Ansätze wiederum erzwingen die Dreidimensionalität durch das Wachstum der Zellen auf oder innerhalb einer künstlichen Matrix (siehe Grafik 10 D und E).



**Grafik 10** Schematische Darstellung von dreidimensionalen Ko-Kultursystemen von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs), Sphäroidbildung **A** durch nicht-adhäsives Coating, **B** durch einen hängenden Tropfen, **C** durch ein Bewegungsreaktorsystem, **D** auf einer Matrix und **E** in einer Matrix; Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dreidimensionale Kultursysteme zwar die Tumorumgebung besser darstellen, aber hochaufwendig und nicht so gut reproduzierbar sind wie zweidimensionale Kultursysteme. Ein perfektes in-vitro Modell mit realistischen Tumor-Stroma-Interaktionen zu erschaffen ist durch die Heterogenität und Komplexität des Pankreastumors bisher nicht möglich. Es ist wichtig die Limitationen der einzelnen Modelle zu kennen und aus den in-vitro Erkenntnissen eines jeden Systems einen potentiellen Rückschluss auf die Tumorbiologie zu ziehen. Da der Fortschritt in der Therapieentwicklung des Pankreaskarzinoms in den letzten Jahrzehnten nur von mäßigem Erfolg geprägt war, ist es umso wichtiger, die Grundlagenforschung in diesem Gebiet voranzutreiben. Erst ein besseres Verständnis der Tumorbiologie ermöglicht die Entwicklung zielgerichteter Therapien.

## **1.5 Die Ziele der Arbeit**

Das Hauptziel des Forschungsprojekts war die Untersuchung des Einflusses von Stromazellen auf das Therapieansprechen von Pankreaskarzinomzellen in-vitro. Im Rahmen dieser Arbeit wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Verfahren zur Gewinnung primärer Zellkulturen etabliert.

# Kapitel 2                    Material und Methodik

## 2.1                    Material

RPMI 1640, fetales Kälberserum und Trypsin/EDTA wurden von Biochrom (Berlin, Deutschland) und Penicillin/Streptomycin von Life Technologies (Grand Island, New York, USA) erworben.<sup>7</sup> Das Cell Proliferation Kit II / XTT wurde von Roche (Mailand, Italien) bezogen.<sup>7</sup>

Drei Chemotherapeutika von verschiedenen Herstellern wurden verwendet. Gemcitabin 40 mg/ml von der Hexal AG (Holzkirchen, Deutschland), nab-Paclitaxel in der Handelsform Abraxane 5 mg/ml von Celgene (Summit, New Jersey, USA) und der  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor DAPT von Sigma Aldrich (St. Louise, Missouri, USA).<sup>7</sup>

Als Antikörper, zur Identifizierung der CAFs wurden der Vimentin-Hase polyklonaler IgG Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA), der monoklonale anti-gliale fibrilläre saure Protein Antikörper (GFAP, Sigma Aldrich, St. Lois, Missouri, USA) und der monoklonale anti-Aktin  $\alpha$ -Smooth Muscle Antikörper (Sigma Aldrich, St. Lois, Missouri, USA) verwendet.<sup>7</sup> Anti-Hase/Anti-Maus Biotinyl linker, Streptavidin-HRP, das DAB-Chromogen und dessen Substrat wurden von DAKO (Campbellfield, VIC, Australien) erworben.<sup>7</sup> Bovines Serumalbumin wurde von Sigma Aldrich (St. Lois, Missouri, USA) gekauft.<sup>7</sup> Für weitere Färbungen wurde Kristallviolett und Mayers Hämatoxylin von AppliCam (Darmstadt, Deutschland) verwendet.<sup>7</sup>

## 2.2                    Zelllinien

In den Experimenten wurden zwei Tumorzelllinien verwendet: AsPC und Panc-1. Diese wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 110  $\mu$ g/ml Cotrimoxazol zugesetzt wurde. Zellen wurden in entsprechend befeuchteten Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Trypsin/EDTA wurde verwendet, um die Zellen zu lösen und entsprechend zu passagieren. Hierzu wurde das

Zell/Medium/Trypsin/EDTA Suspensat zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert (siehe Protokoll 5.1).

## **2.3 Zelllinien primärer CAFs**

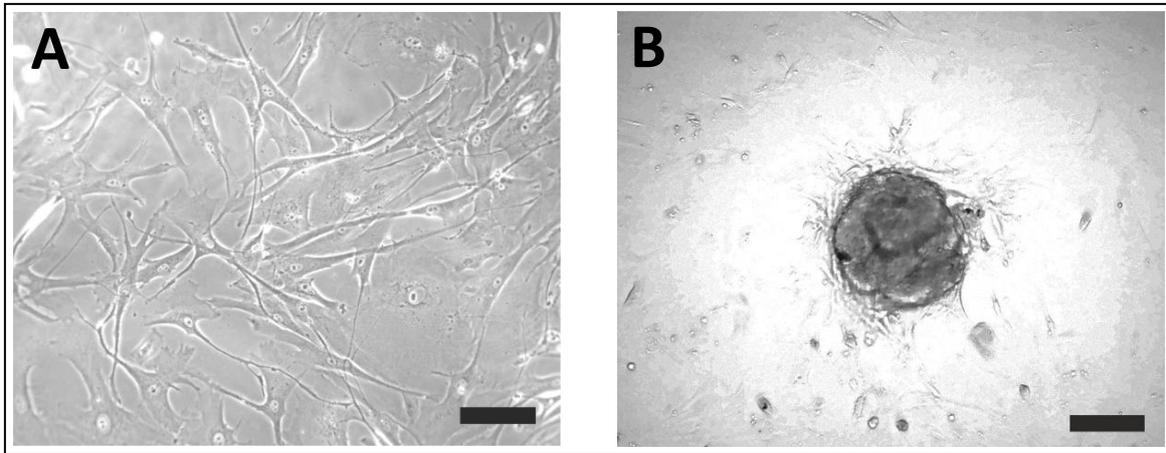
Es wurden Proben von 50 Patienten entnommen und in Kultur gesetzt. Zur Gewinnung wurde Tumorgewebe unmittelbar nach der Resektion in das Schnellschnittlabor der Pathologie des Virchow-Klinikums gebracht. Ein Stück Tumor wurde innerhalb einer Stunde vom Pathologen steril entnommen und zerkleinert. Die zerkleinerten Tumorwürfel wurden in das Medium überführt und inkubiert (siehe Protokoll 5.2).

Durch die mechanische Dissoziation des Tumorgewebes in viele kleine Würfel adhärten die primären Zellen verstreut über die gesamte Kulturflasche und bildeten viele Proliferationsherde (siehe Grafik 11 A).

Anfänglich wurde auch versucht aus größeren Tumorstücken nach der Outgrowth Methode<sup>88</sup> primäre Zellkulturen zu gewinnen. Hierbei wuchsen die Zellen aus einem großen Stück des Tumorgewebes auf die Plastikoberfläche einer Petrischale heraus (siehe Grafik 11 B). Da die Methode der mechanischen Dissoziation bessere Ergebnisse erzielte, wurde nach der Etablierung beider Methoden von der Outgrowth Methode Abstand genommen.

Insgesamt wurden von dem Patientenkollektiv für die hier vorliegende Arbeit sechs CAF Primärkulturen gewonnen. Vier dieser Primärkulturen stammten aus Adenokarzinomen des Pankreaskopfes, eine Kultur stammte von einem Papillenkarzinom und eine weitere aus einem intrahepatischen Cholangiokarzinom. Bei der Gewinnung der Primärkulturen wurden weder Wachstumsfaktoren, noch beschichtete Platten verwendet.

Die Primärkulturen wurden in den Experimenten zwischen der dritten und sechsten Passage verwenden.



**Grafik 11** Native Primärkulturen gewonnen durch **A** mechanische Dissoziation und nach **B** der Outgrowth Methode; Maßstab repräsentiert **A** 200  $\mu\text{m}$ , **B** 335  $\mu\text{m}$ ; Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

## 2.4 Charakterisierung der CAFs

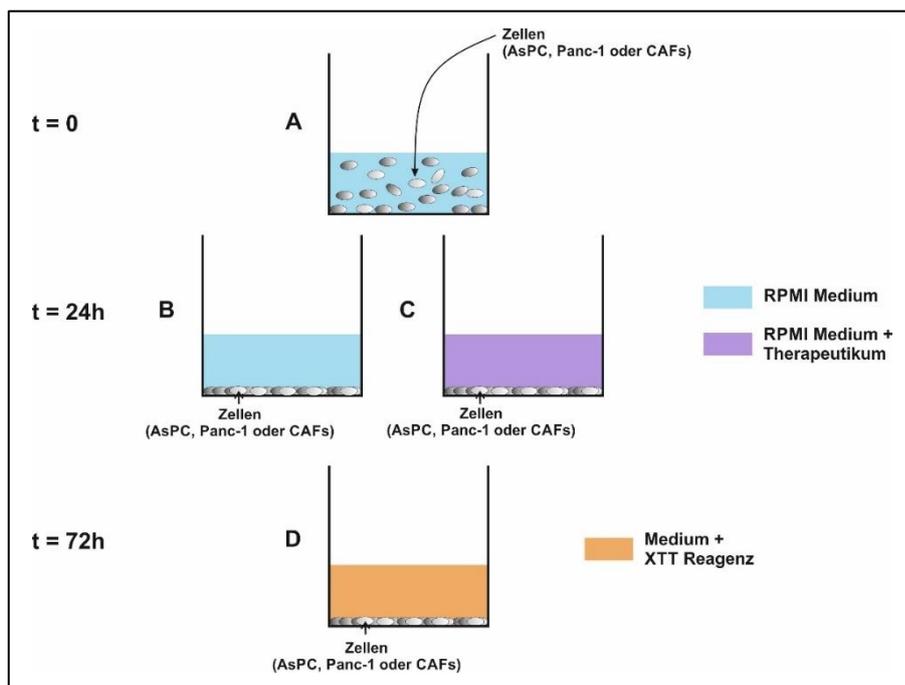
Die Charakterisierung der CAFs erfolgte nach dem Protokoll von *Fujita et al.*<sup>10</sup> (siehe auch Protokoll 5.3). Hierzu wurden 6 Well-Platten mit CAFs mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well besiedelt.<sup>7</sup> Nachdem die Zellen für 24 Stunden inkubiert wurden, erfolgte eine Fixierung mit 4% Formaldehydlösung und eine Permeabilisierung mit 0,2% Triton X-100.<sup>7</sup> Die Zellen wurden anschließend mit 1% (v/v) fetalem Kälberserum und 1% (v/v) bovinem Serumalbumin geblockt.<sup>7</sup> Die Positivkontrolle wurde mit Antikörpern (Vimentin 1:500, GFAP 1:400,  $\alpha$ -SMA 1:600) und die Negativkontrolle mit PBS für jeweils zwei Stunden inkubiert.<sup>7</sup> Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Hase-/Anti-Maus-Biotinyl linker und als Tertiärantikörper Streptavidin-HRP verwendet.<sup>7</sup> Zur farblichen Darstellung wurden die fixierten Zellen mit DAB Chromogen unter dem Mikroskop entwickelt und mit der Negativkontrolle verglichen. Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin.<sup>7</sup>

## 2.5 Kristallviolettgefärbung der Zellkulturen

Die Visualisierung der Ko-Kulturenmorphologie erfolgte mittels Kristallviolettgefärbung. Hierzu wurden Ko-Kulturen nach 24 Stunden Inkubation für 10 Minuten mit 4% Formaldehyd fixiert und anschließend für 1 Minute mit 0,1% (v/v) Kristallviolett gefärbt.<sup>7</sup>

## 2.6 Untersuchung der Zellviabilität in Monokulturen

Die Zellviabilität der Monokulturen wurde mit dem XTT Zellproliferationsassay untersucht (siehe Grafik 12 und Protokoll 5.4). Zuerst wurde das Kit für jede Zelllinie entsprechend der Herstelleranweisung kalibriert.<sup>7</sup> Für Monokulturen wurden Tumorzellen (AsPC, Panc-1) und Stromazellen (CAFs) mit einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96 Well-Platten ausgesetzt.<sup>7</sup> Nach einer Inkubation von 24 Stunden erfolgte die Therapie mit Chemotherapeutika für insgesamt 48 Stunden (Gemcitabin zwischen 0 und  $1000 \mu\text{M}$ , nab-Paclitaxel zwischen 0 und  $50 \mu\text{M}$ ,  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor bzw. GSI zwischen 0 und  $50 \mu\text{M}$ ).<sup>7</sup> Nach der Therapiedauer von 48 Stunden wurde die XTT-Reagenz in die Wells gegeben und die Absorbenz gemessen.<sup>7</sup> Die Standardisierung der Messungen erfolgte durch die Absorbenz unbehandelter Zellen.<sup>7</sup>



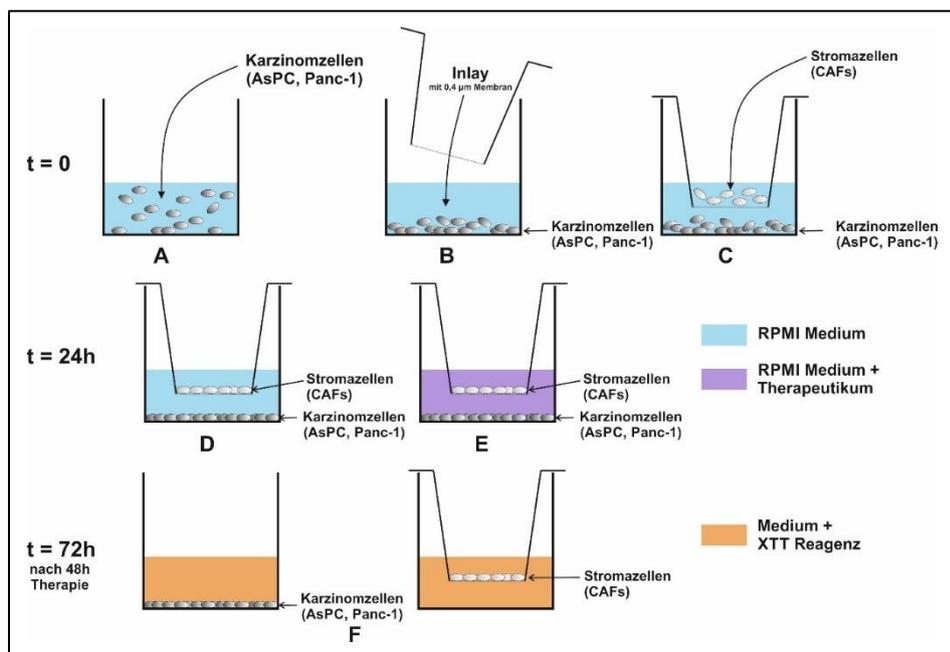
**Grafik 12**

Schematische Darstellung des experimentellen Set-Ups von Monokulturen, **A** Aussetzen von Zellen in Well bei  $t = 0$ , **B** nach 24 Stunden sind Zellen adhären, **C** Beginn der Therapie bei  $t = 24\text{h}$ , **D** nach 48 Stunden Therapie XTT-

Messung des Wells ( $t = 72\text{h}$ ); Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

## 2.6 Untersuchung der Zellviabilität in indirekten Ko-Kulturen

Für Experimente der indirekten Ko-Kulturen wurden 24 Well-Platten mit Inlays mit einer Porengröße von 0,4 µm verwendet.<sup>7</sup> Durch die entsprechend kleine Porengröße konnte eine Zellmigration verhindert und ein parakrinen Austausch von Peptiden und anderer löslicher Faktoren zwischen Tumor- und Stromazellen (CAFs) ermöglicht werden. Innerhalb der zwei Kompartimente der Boyden-Kammer wurden die Karzinomzellen (AsPC, Panc-1) mit einer Dichte von  $6 \times 10^6$  Zellen pro Well und die CAFs mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Inlay gegeben (siehe Grafik 13 und Protokoll 5.5).<sup>7</sup> Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Gabe der Therapeutika (Gemcitabin 1000 µM, nab-Paclitaxel 50 µM, nab-Paclitaxel / Gemcitabin 50 µM / 1000 µM, γ-Sekretaseinhibitor (GSI) 50 µM, γ-Sekretaseinhibitor (GSI) / Gemcitabin 50 µM / 1000 µM).<sup>7</sup> Nach einer Therapiedauer von 48 Stunden wurden sowohl Inlay, als auch Well gesondert mit XTT-Reagenz befüllt und nach standardmäßiger Inkubation mit der XTT-Reagenz in 96 Well-Platten umgefüllt.<sup>7</sup> Die Messung der Absorbanz der Reagenz erfolgte entsprechend der Monokulturen.



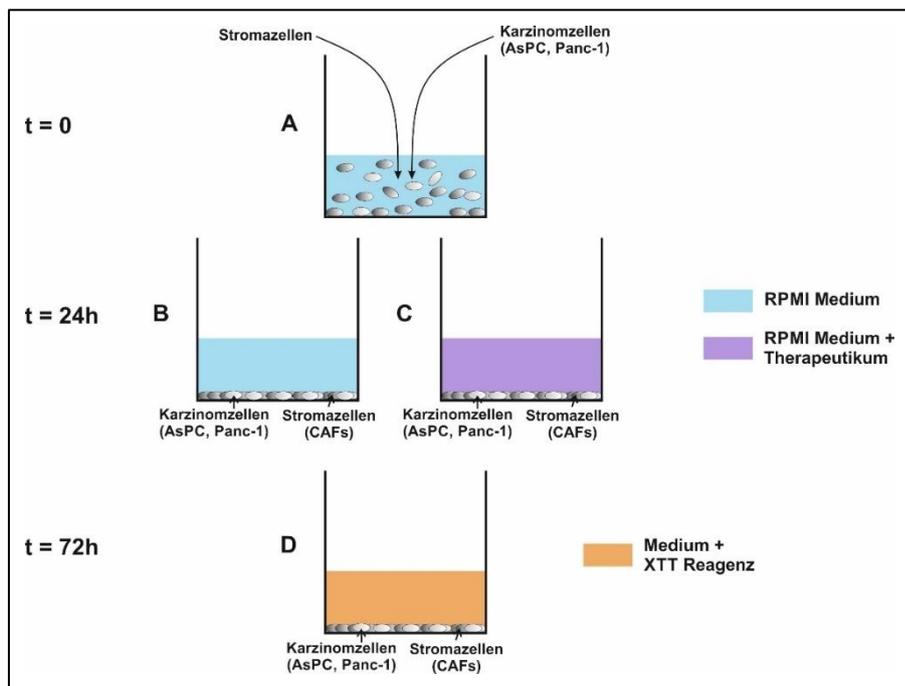
**Grafik 13**

Schematische Darstellung des experimentellen Set-Ups von indirekten Ko-Kulturen, **A** Aussetzen von Tumorzellen in Well, **B** Einlegen

des Inlays, **C** Aussetzen von Stromazellen (CAFs) bei t = 0, **D** nach 24 Stunden sind Zellen adhären, **E** Beginn der Therapie bei t = 24h, **F** nach 48 Stunden Therapie XTT-Messung des Wells und des Inlays getrennt voneinander (t = 72h); Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

## 2.8 Untersuchung der Zellviabilität in direkten Ko-Kulturen

Für die direkten Ko-Kulturen wurden Tumorzellen (AsPC, Panc-1) und Stromazellen (CAFs) zusammen in 96 Well-Platten in einem Verhältnis von 1:1 ausgesetzt. Analog zu Mono- und indirekten Ko-Kulturen wurden die Zellen inkubiert, den Therapeutika ausgesetzt und deren Zellviabilität gemessen. 24 Stunden nach dem Aussetzen erfolgte die Therapie (Gemcitabin 1000  $\mu\text{M}$ , nab-Paclitaxel 50  $\mu\text{M}$ , nab-Paclitaxel / Gemcitabin 50  $\mu\text{M}$  / 1000  $\mu\text{M}$ ,  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (GSI) 50  $\mu\text{M}$ ,  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (GSI) / Gemcitabin 50  $\mu\text{M}$  / 1000  $\mu\text{M}$ ). Nach einer Therapiedauer von 48 Stunden wurde die XTT-Reagenz hinzugegeben und die Absorbenz entsprechend der Monokulturen gemessen (siehe Grafik 14 und Protokoll 5.6).



**Grafik 14**

Schematische Darstellung des experimentellen Set-Ups von direkten Ko-Kulturen, **A** simultanes Aussetzen von Tumor- und Stromazellen (CAFs) in Well bei  $t = 0$ , **B** nach 24 Stunden sind Zellen adhären, **C** Beginn er Therapie bei

$t = 24\text{h}$ , **D** nach 48 Stunden Therapie XTT-Messung des Wells mit dem Zellkonglomerat ( $t = 72\text{h}$ );

Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

## 2.9 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Experimente mit Tumorzelllinien (AsPC und Panc-1) wurden mindestens drei Mal ( $n \geq 3$ ) mit Dreifachbestimmung für jede Probe im jeweiligen Assay durchgeführt.<sup>7</sup> Im Falle der CAFs wurden die Ergebnisse aus mindestens drei der insgesamt sechs primär gewonnenen CAF-Zelllinien gewonnen.<sup>7</sup> Jede CAF-Messung wurde mindestens zweimal durchgeführt ( $n \geq 2$ ), jede Probe im Assay mindestens dreimal wiederholt.<sup>7</sup>

Innerhalb des Proportionalitätsfensters des XTT-Kits wurde den unbehandelten Zellsystemen eine Zellviabilität von 100% zugesprochen und die chemotherapeutischen Effekte entsprechend dieser unbehandelten Gruppe standardisiert.<sup>7</sup>

Die statistische Analyse der Daten wurde mithilfe der GraphPad Prism 6 Software (Statcon; La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte in Tabellen und entsprechenden Grafiken. Eine Normalverteilung der Daten wurde mit dem D'Agostino & Pearson Omnibus Normalitätstest überprüft. Die Daten wurden im Falle kontinuierlicher Variablen als Mittelwert und Standardfehler/SEM dargestellt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen ( $>2$ ) erfolgte die Analyse mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA (One-way analysis of variance) bzw. dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test. Im Falle zweier Variablen (wie z.B. mehrere Konzentrationen von unterschiedlichen Chemotherapeutika oder unterschiedlichen Zelllinien) wurde eine zweifaktorielle ANOVA (Two-Way ANOVA) verwendet. Für die anschließenden paarweise multiplen Vergleiche wurden in beiden Fällen die entsprechenden Post-hoc-Tests eingesetzt. Im Falle einer One-Way ANOVA wurde hierfür der Dunn's multiple Vergleichstest, im Falle einer Two-Way ANOVA der Tukey's multiple Vergleichstest verwendet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

# Kapitel 3 Ergebnisse

## 3.1 Isolierung der primären CAFs

Für die hier vorliegende Arbeit wurden Tumorresektate von einem Kollektiv von 50 Patienten in ein Zellmedium überführt, um daraus Zellkulturen zu gewinnen. In 49% der Fälle wuchsen keine Zellen an, in 24% der Fälle lag eine primäre Infektion vor, in 4% eine Kross-Kontamination mit anderen Zellen und in 23% wuchsen Zellen an. Dies ist mit der Literatur zur Isolierung von CAFs vergleichbar (siehe Tabelle 3). Von den 23% bzw. 12 Patienten konnten 9 primäre Stromazelllinien und 3 primäre Karzinomzelllinien gewonnen werden.

Von den 9 Stromazelllinien waren 6 vital genug, um große Zellpopulationen zu bilden, die für die Experimente der Mono-, indirekten und direkten Ko-Kultursysteme notwendig waren (siehe Tabelle 4). In den meisten der zugehörigen Tumorresektate wurde von dem befundeten Pathologen eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion beschrieben.

	Anzahl (n)	Prozent (%)	Literatur (%) <sup>89-92</sup>
<b>Patienten</b>	50	100	100
<b>Zellen nicht angewachsen</b>	25	49	20-44
<b>Infektionen</b>	12	24	36
<b>Kross-Kontamination</b>	2	4	N/A
<b>Zellen angewachsen</b>	12	23	20-50
<b>Primäre Stromazellen (CAFs)</b>	9	18	35
<b>Primäre Karzinomzellen</b>	3	6	9-30

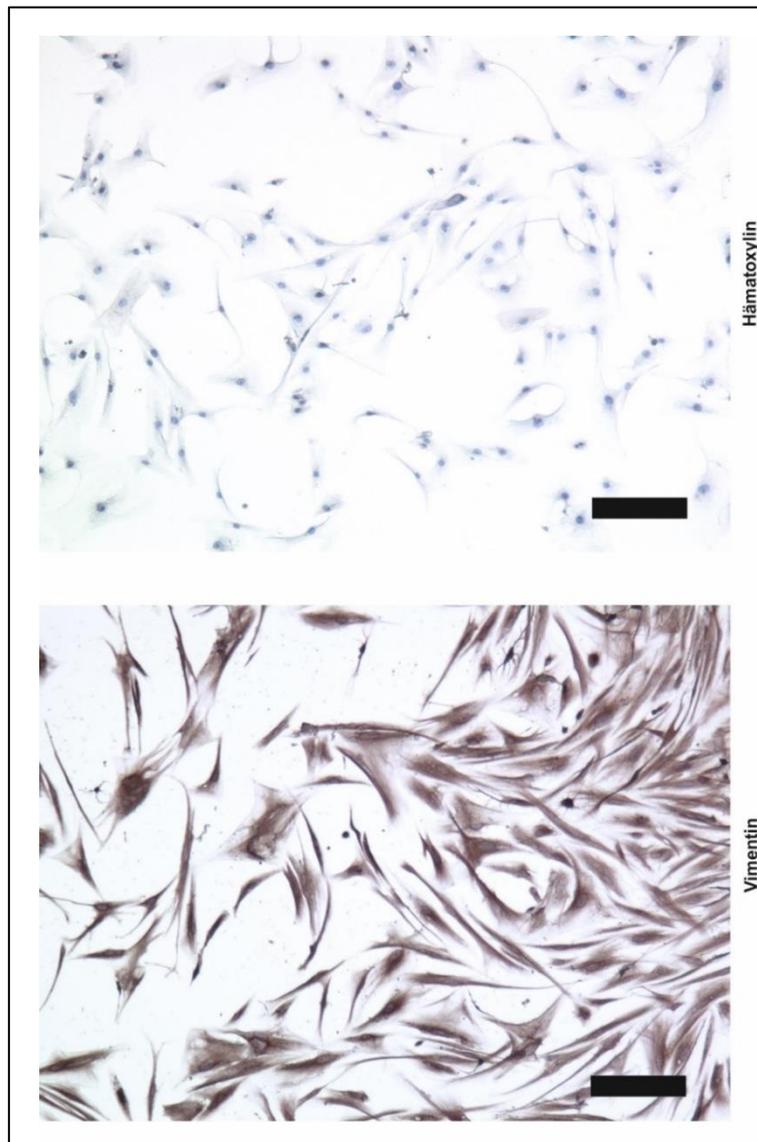
**Tabelle 3** Überblick der primärgewonnenen Zellkulturen und der entsprechende Vergleich von Literaturangaben

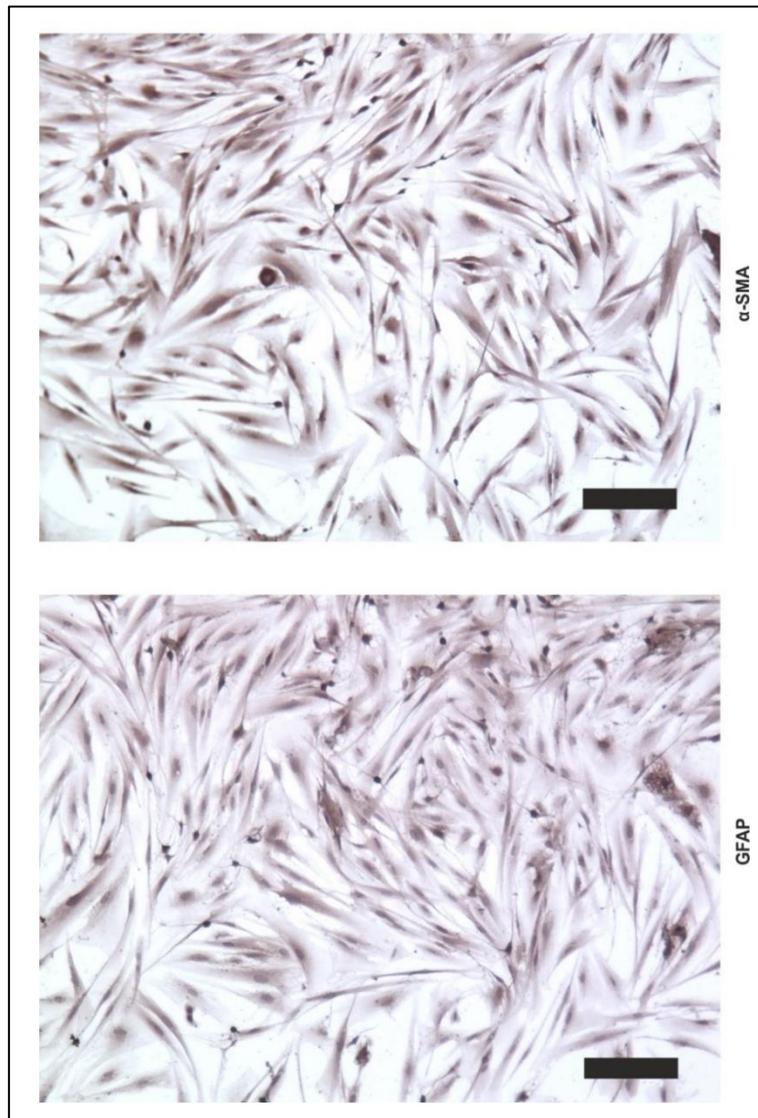
Patient	Geschlecht	Alter bei Entnahme	Entnahmedatum	Diagnose	Tumorstaging
20	weiblich	76	24.09.2014	Adenokarzinom Intrahepatisches CCC	pT2apN1(5/7) G3R0L0V1
22	weiblich	58	01.10.2014	Adenokarzinom Papille	pT3pN1(7/12) G1R0L1V0
33*	männlich	62	19.03.2015	Adenokarzinom Pankreaskopf	pT3pN1(1/23)pM1 G3R0L1V0
39*	männlich	77	22.04.2015	Adenokarzinom Papille	pT2pN0(0/13) G2R0L0V0
40	männlich	54	22.04.2015	Adenokarzinom Pankreaskopf	pT3 R0 G3 V1 pN0 (0/13)
41*	weiblich	61	22.09.2015	Adenokarzinom Pankreaskopf	pT3pN1(1/23) G2R0L1V0
44*	weiblich	64	04.02.2016	Adenokarzinom Pankreaskopf	pT3 pN1 G2 R0
46*	männlich	31	24.02.2016	Adenokarzinom Intrahepatisches CCC	ypT1 ypN1 (1/7) G2 R0 L0 V0
49*	männlich	57	07.04.2016	Adenokarzinom Pankreaskopf	pT3 pN1 (1/11) G2 L0 V0 R1

**Tabelle 4** Überblick der primärgewonnenen Stromazellen (CAFs). Die gewonnenen Stromazellen der sechs markierten (\*) Patienten 33, 39, 41, 44, 46 und 49 waren vital genug, um in entsprechenden Experimenten der Mono-, indirekten und direkten Ko-Kultursysteme verwendet zu werden.

### 3.2 Charakterisierung der CAFs

Um der Kontamination von Tumorzellen und immunkompetenten Zellen vorzubeugen, wurden die CAFs morphologisch und immunhistochemisch untersucht. Die primär gewonnenen CAFs wurden immunhistochemisch mit den drei für CAFs spezifischen Markern<sup>93,94</sup>  $\alpha$ -SMA, GFAP und Vimentin charakterisiert. Für alle sechs in den Experimenten verwendeten CAF-Kulturen waren die drei Marker positiv (siehe Grafik 15).<sup>7</sup> Eine Kontamination mit anderen Zellen konnte ausgeschlossen werden, da alle Zellen  $\alpha$ -SMA-positiv waren und eine für CAFs typische Morphologie (stellar-ähnlich oder spindelförmig) aufwiesen.<sup>95,96</sup> Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die von den Tumorsektaten isolierten Zellen CAFs waren.<sup>7</sup>

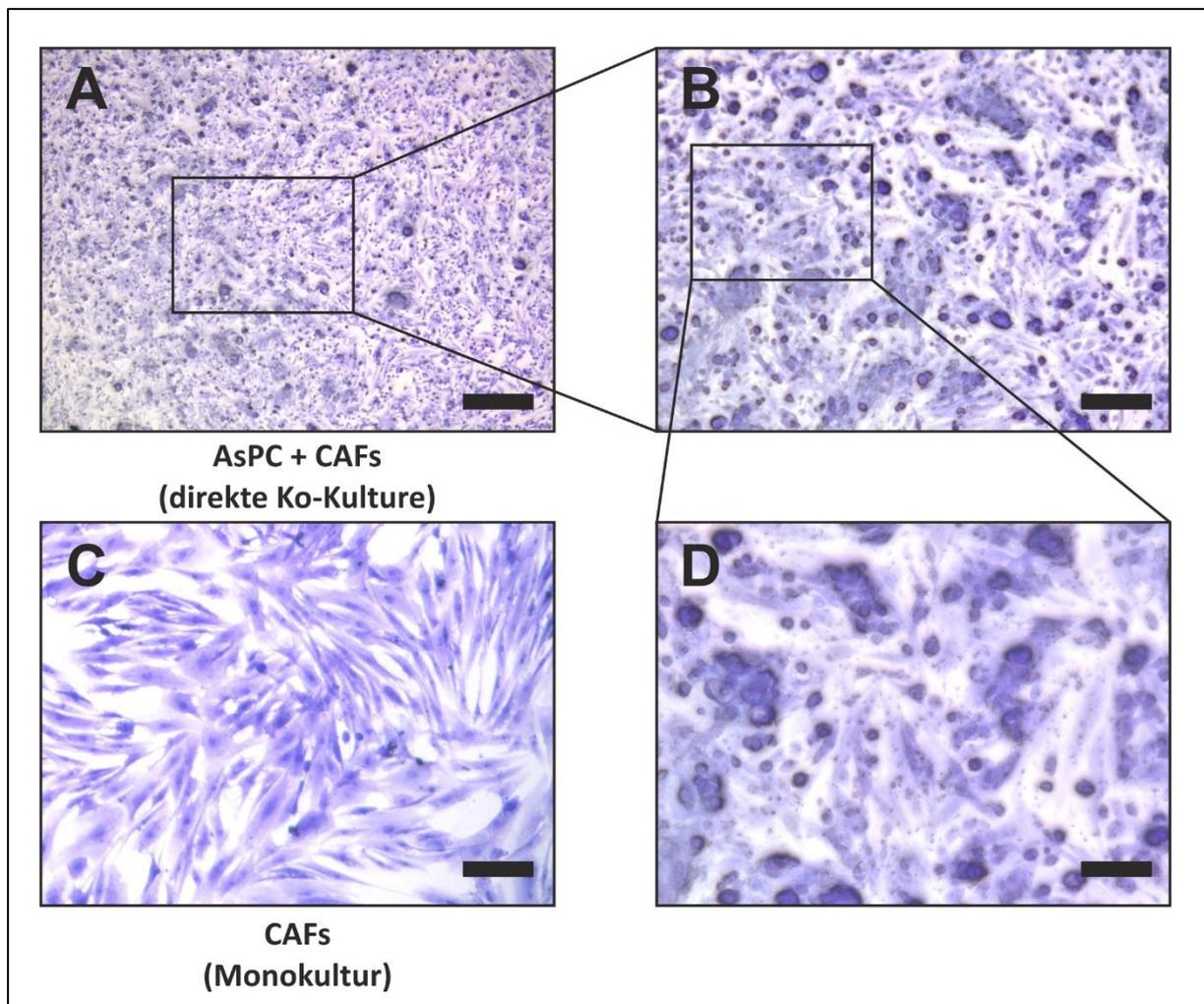




**Grafik 15** Repräsentative immunohistochemische Färbungen der primärgewonnenen CAFs; Maßstab repräsentiert jeweils 200  $\mu\text{m}$ ; Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>

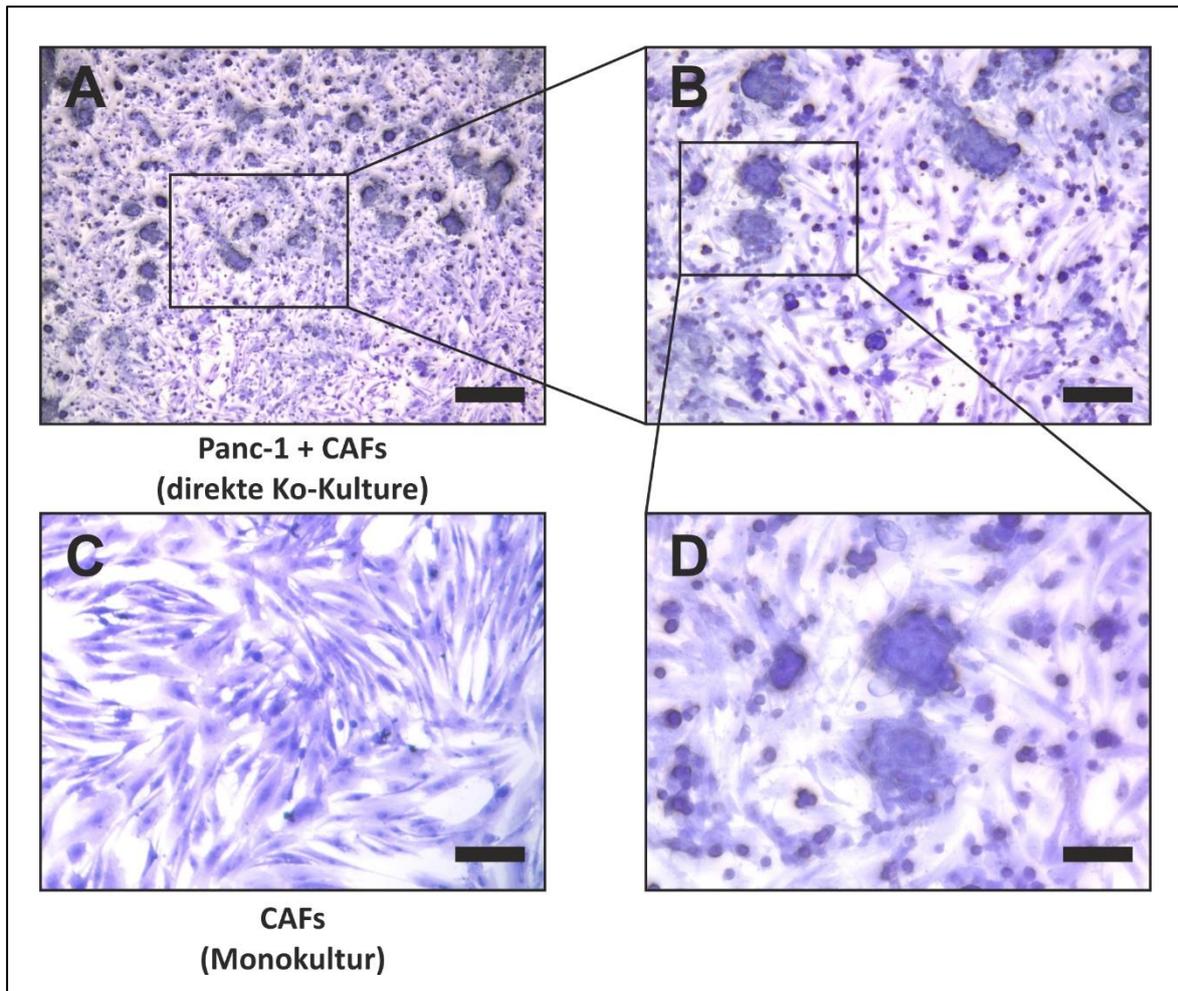
### 3.3 Kristallviolettffärbung der Zellkulturen

CAF Monokulturen formierten sich in einer homogenen zweidimensionalen Zellschicht (siehe Grafiken 16 und 17).<sup>7</sup> Im Fall der direkten Ko-Kulturen von CAFs mit Tumorzellen (AsPC und Panc-1), konnten Zellagglomerate von Tumorzellen, die von CAFs umgeben wurden, beobachtet werden.<sup>7</sup> Käfig-ähnliche Strukturen von CAFs bildeten sich um die Tumorzellen herum.<sup>7</sup> Generell wurden größere Zellagglomerate bei direkten Ko-Kulturen von CAFs mit Panc-1 als bei AsPC beobachtet.



**Grafik 16** Kristallviolettffärbung der CAF Monokulturen und direkten Ko-Kulturen von AsPC mit CAFs; Maßstab repräsentiert **A** 500 µm, **B** 200 µm, **C** 500 µm, **D** 100 µm

Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBDP INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>



**Grafik 17** Kristallviolettffärbung der CAF Monokulturen und direkten Ko-Kulturen von Panc-1 mit CAFs;

Maßstab repräsentiert **A** 500 µm, **B** 200 µm,

**C** 500 µm, **D** 100 µm

Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer.

*HBPD INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>

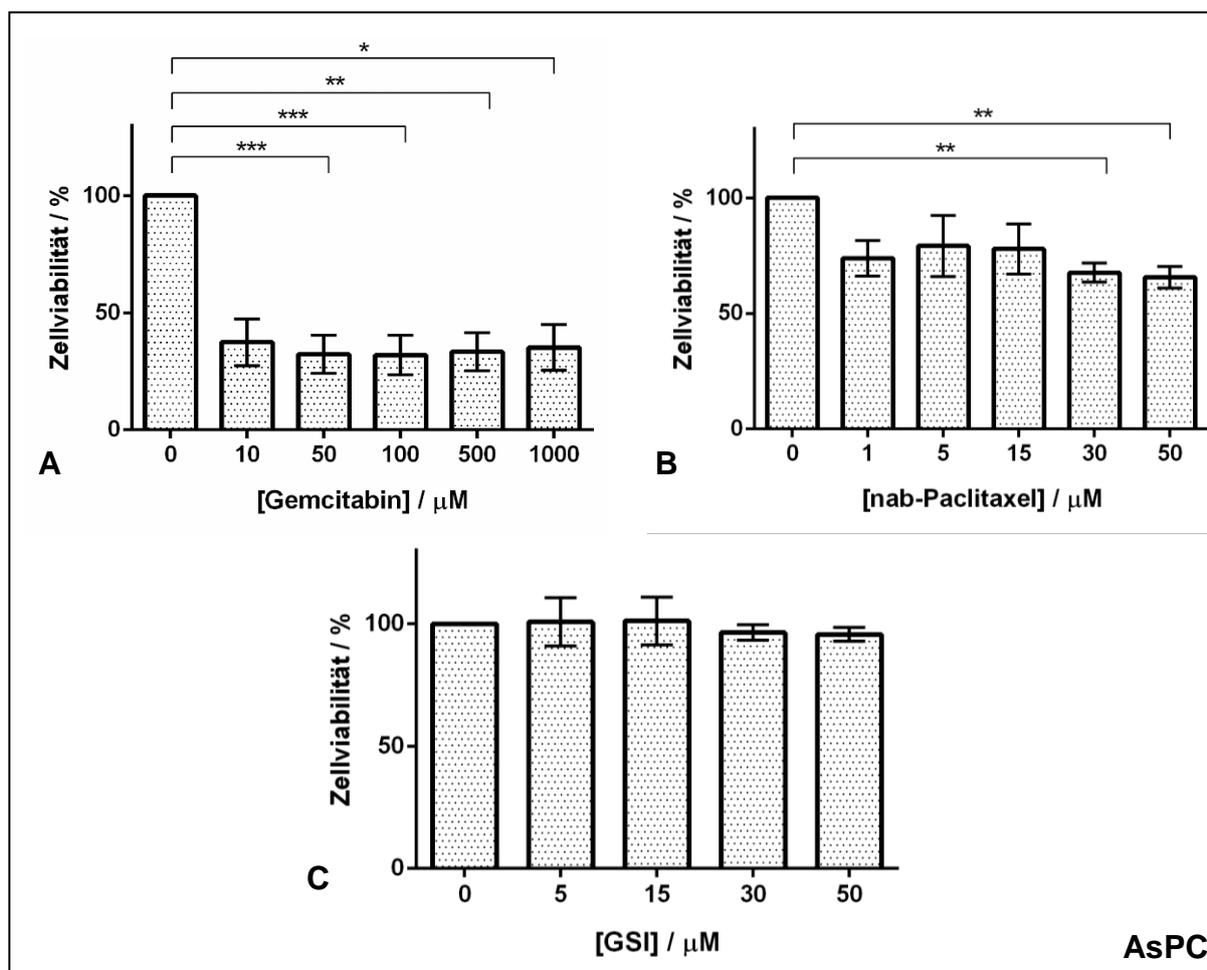
### 3.4 Effekt der Chemotherapie in Monokulturen

Der therapeutische Effekt der Monotherapie von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI wurde für die Monokulturen AsPC, Panc-1, sowie der CAFs untersucht. Der therapeutische Effekt wurde durch die Reduktion der Zellviabilität, die mithilfe des XTT Assays gemessen wurde, bestimmt.

Für AsPC zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Gemcitabin ein signifikanter therapeutischer Effekt (50  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0007$ ; 100  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0005$ ; 500  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.0020$ ; 1000  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.0411$ ; siehe Grafik 18 A).

Nach der Behandlung mit nab-Paclitaxel wurden signifikante therapeutische Effekte bei 30  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  bei AsPC gemessen (30  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.0054$ ; 50  $\mu\text{M}$ ,  $P < 0.0014$ ; siehe Grafik 18 B).

Bei der Behandlung mit GSI zeigte AsPC keine Reduktion der Zellviabilität (siehe Grafik 18 C).

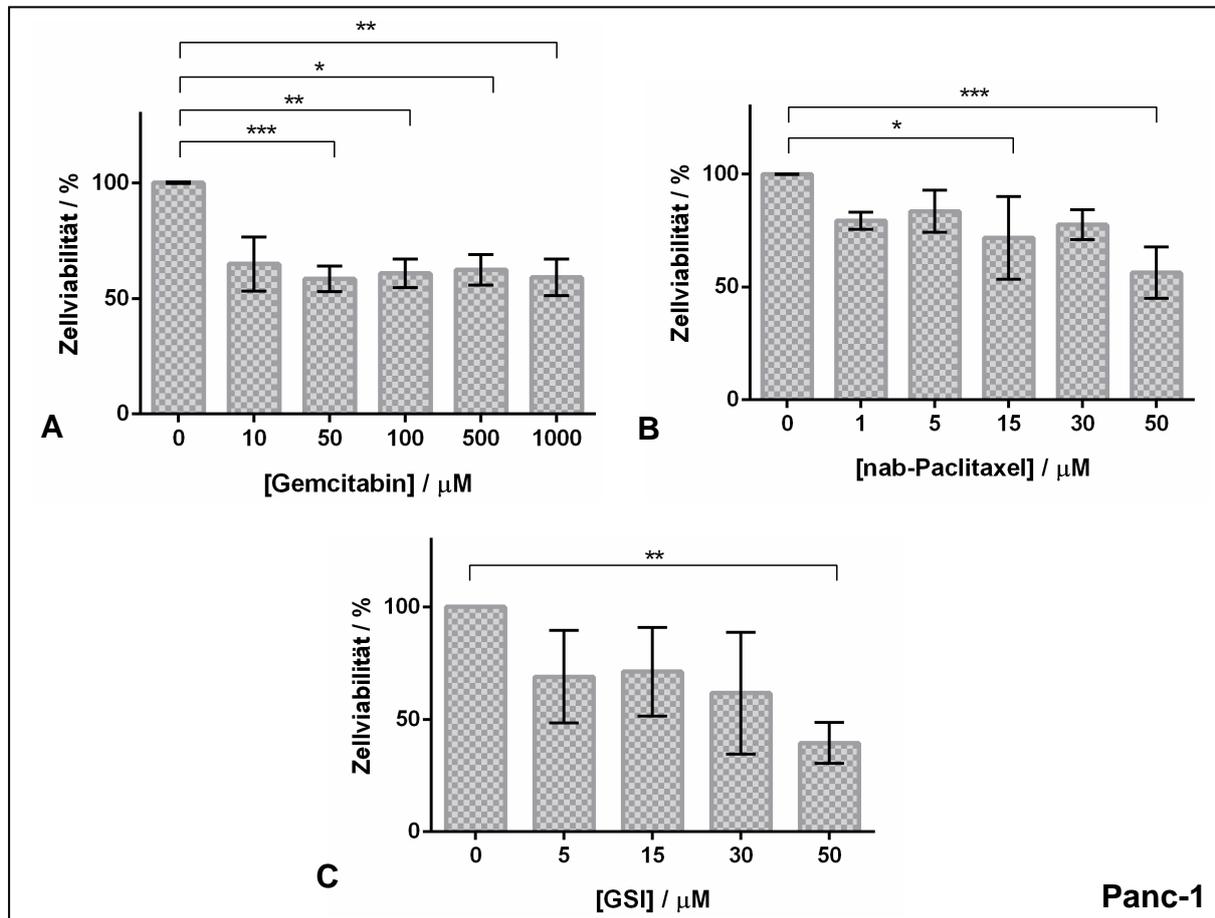


**Grafik 18** XTT-Messungen der Zellviabilität der AsPC Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit **A** Gemcitabin, **B** nab-Paclitaxel und **C** GSI. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>

Analog zu AsPC, konnte auch bei Panc-1 ein signifikanter therapeutischer Effekt ab einer Gemcitabin Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  festgestellt werden (50  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0004$ ; 100  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0071$ ; 500  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0209$ ; 1000  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0030$ ; siehe Grafik 19 A).

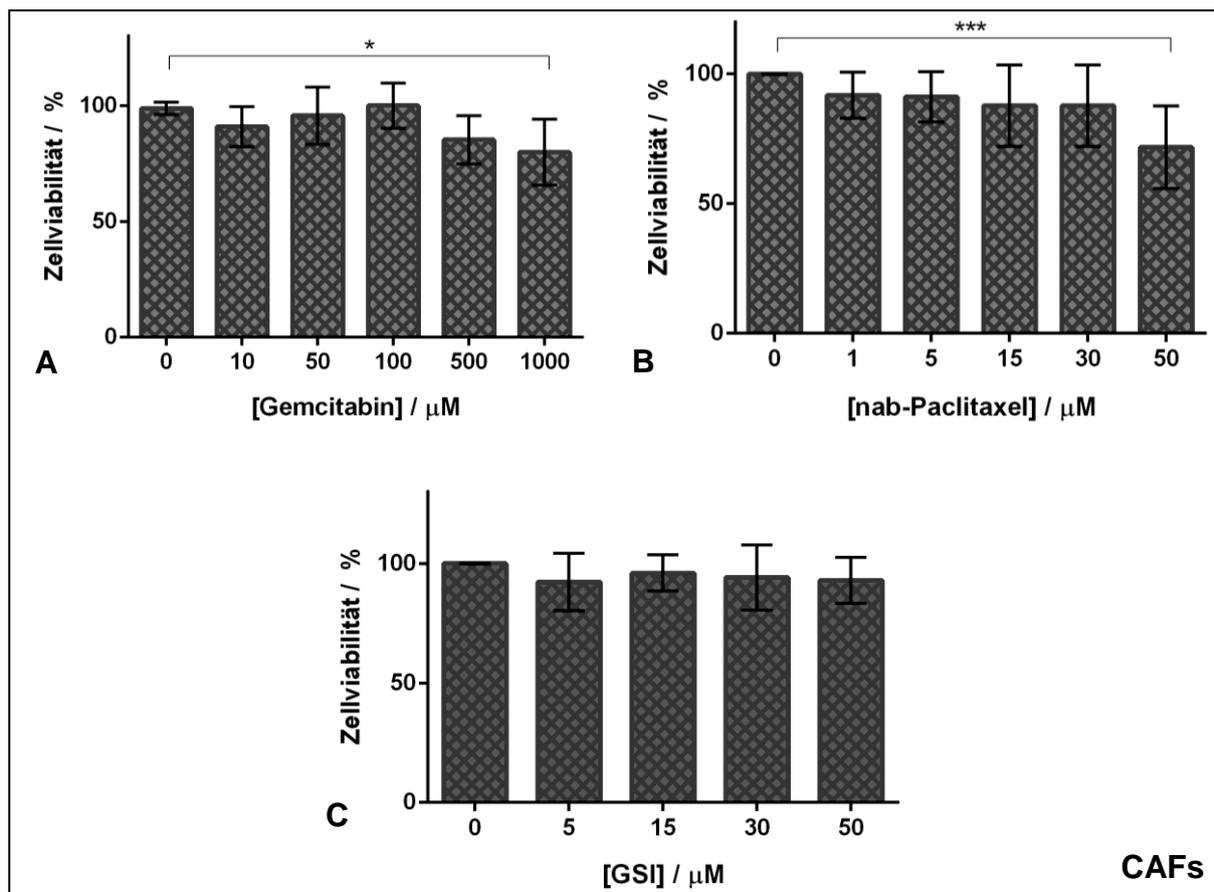
Eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von Panc-1 wurde bei der Therapie mit 15  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,0169$ ) und 50  $\mu\text{M}$  ( $P = 0,0001$ ; siehe Grafik 19 B) nab-Paclitaxel beobachtet.

Bei der Behandlung mit der höchsten GSI Konzentration zeigte Panc-1 eine Reduktion der Zellviabilität (50  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0074$ ; siehe Grafik 19 C).



**Grafik 19** XTT-Messungen der Zellviabilität der Panc-1 Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit **A** Gemcitabin, **B** nab-Paclitaxel und **C** GSI. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBD INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>

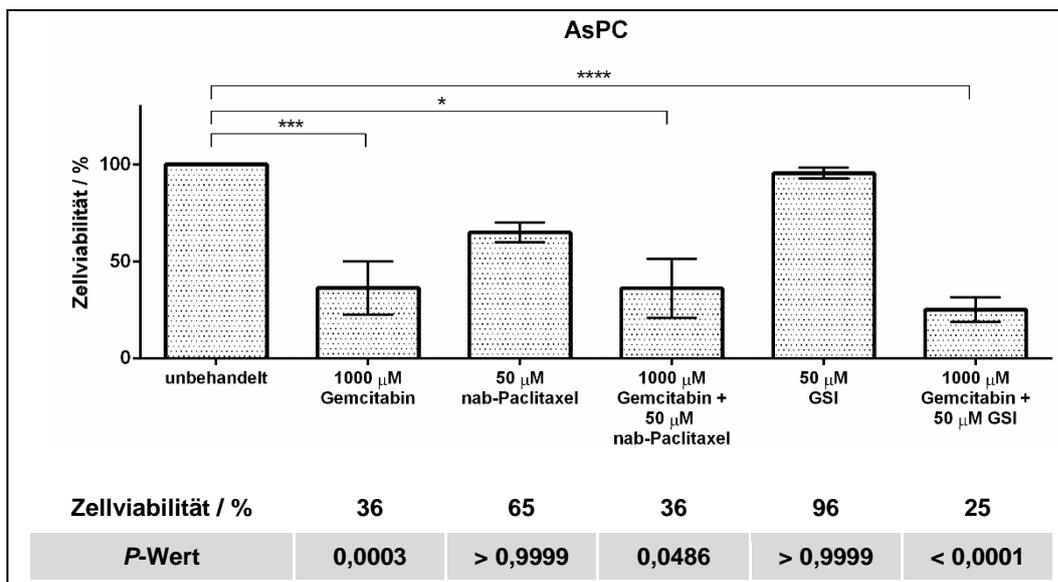
CAFs unterschieden sich zu den Tumorzelllinien AsPC und Panc-1 deutlich. Lediglich bei der höchsten Konzentration von Gemcitabin konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität gemessen werden (1000  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0,0218$ ; siehe Grafik 20 A). Auch bei nab-Paclitaxel wurde die Zellviabilität nur durch die höchste getestete Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  entscheidend verringert ( $P = 0,0008$ ; siehe Grafik 20 B). GSI schien keinen therapeutischen Effekt auf die CAFs zu haben (siehe Grafik 20 C).



**Grafik 20** XTT-Messungen der Zellviabilität der CAF Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit **A** Gemcitabin, **B** nab-Paclitaxel und **C** GSI. Sechs primär patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumorstromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>

Für Ko-Therapien wurden die jeweils höchsten Konzentrationen von Chemotherapeutika gewählt (Gemcitabin 1000  $\mu\text{M}$ ; nab-Paclitaxel 50  $\mu\text{M}$ ; GSI 50  $\mu\text{M}$ ) und mit den Monotherapien verglichen.

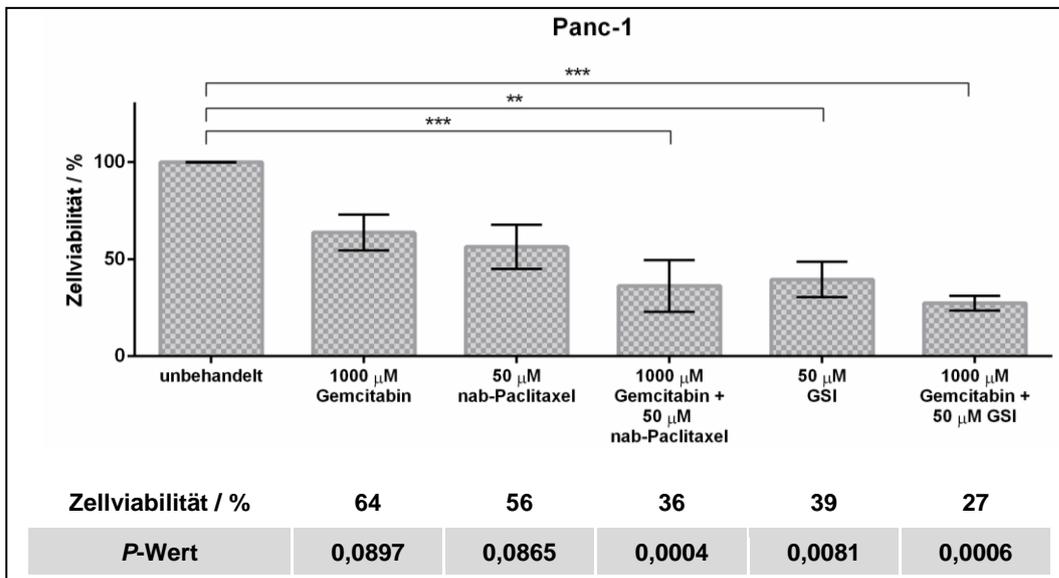
Das effektivste therapeutische Regime bei AsPC war die Ko-Therapie mit Gemcitabin und GSI (Zellviabilität 25%,  $P < 0,0001$ ), gefolgt von der Monotherapie mit Gemcitabin (Zellviabilität 36%,  $P = 0,0003$ ) und der Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel (Zellviabilität 36%,  $P = 0,0486$ ; siehe Grafik 21).



**Grafik 21** XTT-Messungen der Zellviabilität der AsPC Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Ko-Therapien von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen).

Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

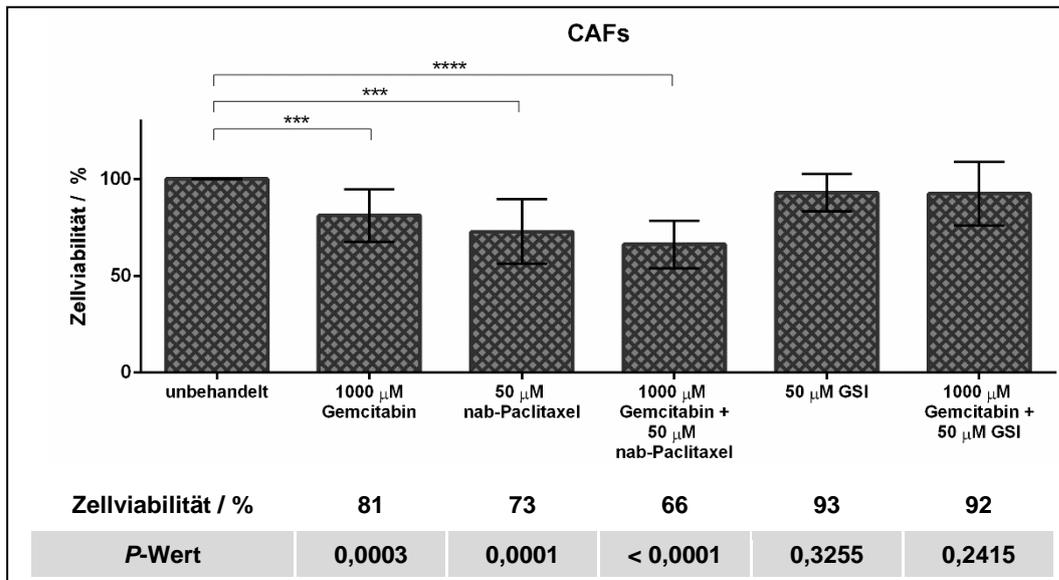
Auch bei Panc-1 war die Ko-Therapie von Gemcitabin und GSI mit Abstand die effektivste, da hier eine Reduktion der Zellviabilität auf 27% gemessen wurde ( $P = 0,0006$ ; siehe Grafik 22).



**Grafik 22** XTT-Messungen der Zellviabilität der Panc-1 Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Ko-Therapien von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen).

Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

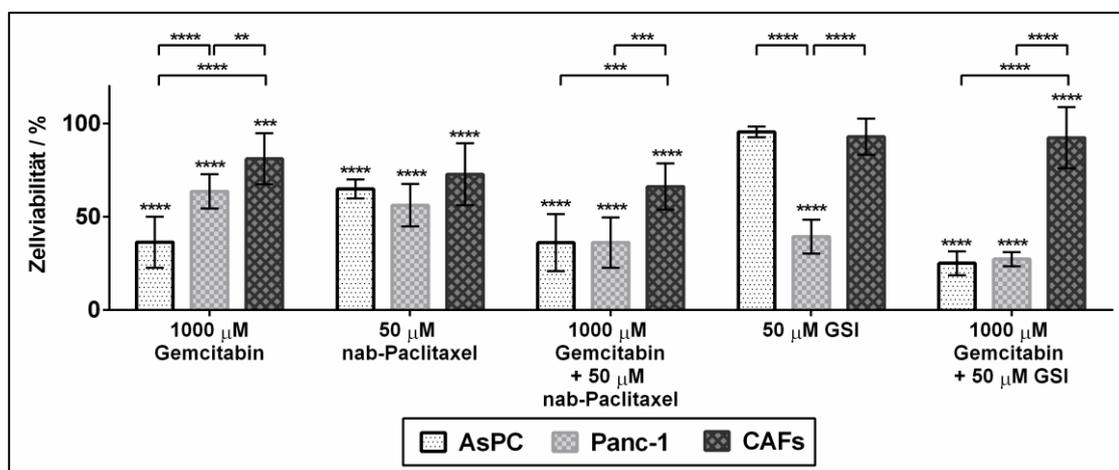
Die Zellviabilität von CAFs konnte nur in weitaus geringerem Maße durch die untersuchten therapeutischen Regime reduziert werden. Bei der effektivsten Therapie mit Gemcitabin zusammen mit nab-Paclitaxel konnte lediglich eine Reduktion der Zellviabilität auf 66% beobachtet werden ( $P < 0,0001$ ; siehe Grafik 23). Andere signifikante Therapien der CAF Monokulturen waren die Monotherapien mit Gemcitabin (Zellviabilität 81%,  $P = 0,0003$ ) und nab-Paclitaxel (Zellviabilität 73%,  $P < 0,0001$ ).



**Grafik 23** XTT-Messungen der Zellviabilität der CAF Monokultur nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Ko-Therapien von Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Sechs primär patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen). Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

Fasst man die Ergebnisse der Monokulturen zusammen, so zeigte sich, dass bei nahezu allen Therapieregimen eine signifikante Reduktion der Zellviabilität der Monokulturen zu beobachten war ( $P < 0,0001$ ,  $P = 0,0006$  bei der Therapie der CAFs mit 1000  $\mu\text{M}$  Gemcitabin, siehe Grafik 24). Eine Reduktion der Zellviabilität zeigte sich nicht bei der Monotherapie von AsPC und CAFs mit 50  $\mu\text{M}$  GSI.

In der Monotherapie mit Gemcitabin war das therapeutische Ansprechen am größten bei AsPC. Hier zeigte sich eine signifikant größere Reduktion der Zellviabilität als bei Panc-1 ( $P < 0,0001$ ) und CAFs ( $P = 0,0043$ ).<sup>7</sup> Unter der Monotherapie mit nab-Paclitaxel ist der therapeutische Effekt vergleichbar bei Tumorzellen und CAFs. Bei der Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel zeigte sich eine signifikant größere Reduktion der Zellviabilität der Tumorzellen AsPC ( $P = 0,0008$ ) und Panc-1 ( $P = 0,0002$ ) im Vergleich zu CAFs.<sup>7</sup> Unter der GSI Monotherapie sprach lediglich Panc-1 an ( $P < 0,0001$ ).<sup>7</sup> Die Ko-Therapie mit Gemcitabin und GSI erwies sich am effektivsten bei AsPC und Panc-1, da in beiden Fällen die Reduktion der Zellviabilität deutlich größer war, als die der CAFs ( $P < 0,0001$ ).

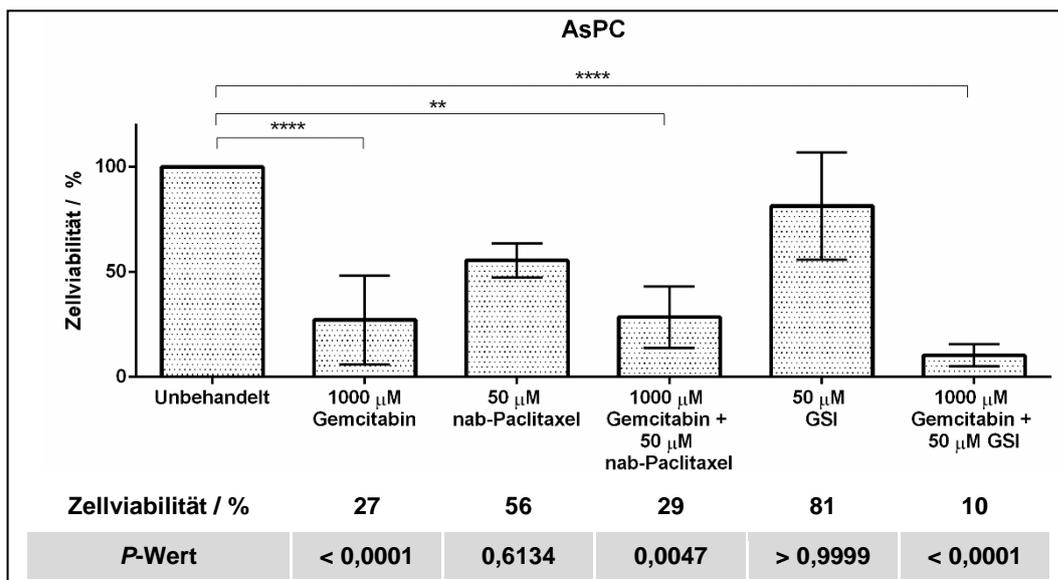


**Grafik 24** XTT-Messungen der Zellviabilität von Monokulturen. Die Behandlung erfolgte für 48 Stunden. Zellen wurden therapiert mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Sechs primär patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels Two-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (einzelne Sterne repräsentieren den Vergleich zur unbehandelten Gruppe, Sterne mit Balken den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472<sup>7</sup>

### 3.5 Effekt der Chemotherapie in indirekten Ko-Kulturen

Für Experimente in den unterschiedlichen Kultursystemen wurden bei Mono- und Ko-Therapien die jeweils höchsten Konzentrationen von Chemotherapeutika gewählt (Gemcitabin 1000  $\mu\text{M}$ ; nab-Paclitaxel 50  $\mu\text{M}$ ; GSI 50  $\mu\text{M}$ ).

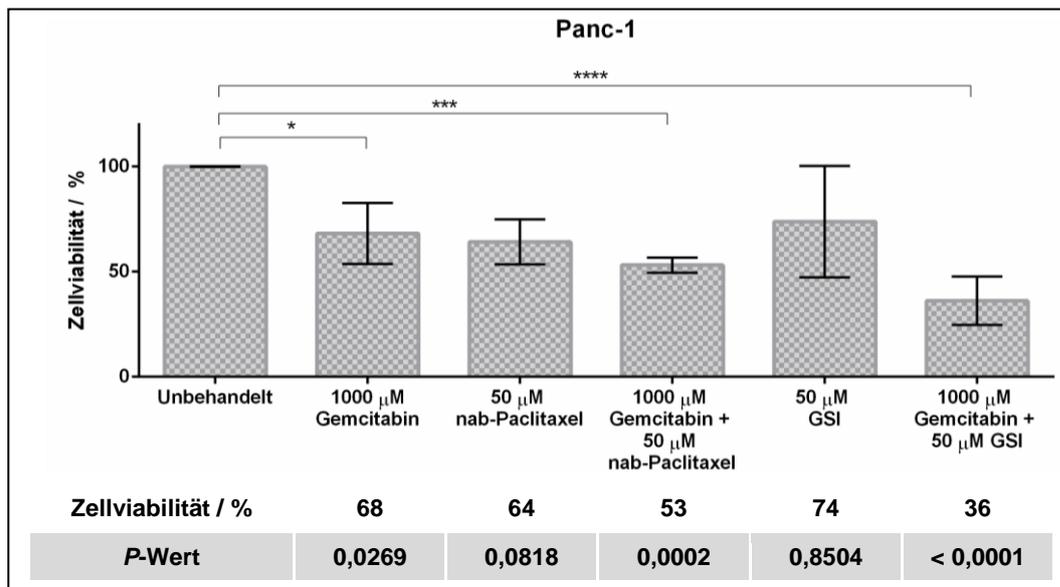
Bei AsPC wurde die größte Reduktion der Zellviabilität in indirekten Ko-Kulturen bei der Ko-Therapie mit Gemcitabin und GSI beobachtet (Zellviabilität 10%,  $P < 0,0001$ ; siehe Grafik 25). Des Weiteren konnte eine therapeutische Wirksamkeit bei der Monotherapie mit Gemcitabin (Zellviabilität 27%,  $P < 0,0001$ ) und der Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel (Zellviabilität 29%,  $P = 0,0047$ ) festgestellt werden. Die Monotherapien mit nab-Paclitaxel ( $P = 0,6134$ ) und GSI ( $P > 0,9999$ ) zeigten keine Signifikanz.



**Grafik 25** XTT-Messungen der Zellviabilität von AsPC in indirekten Ko-Kulturen nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen).

Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

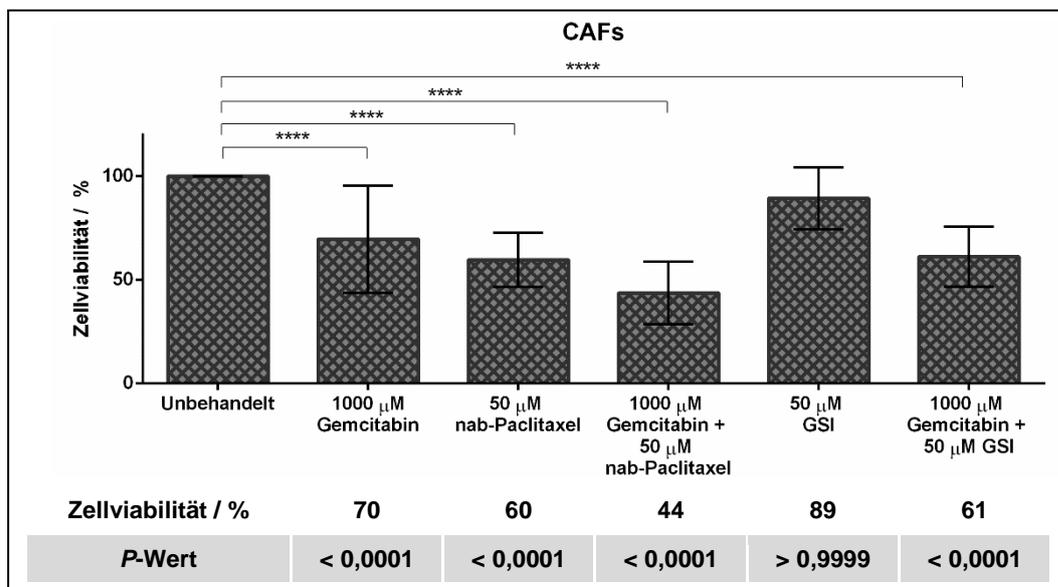
Ähnliche therapeutische Effekte konnten bei Panc-1 beobachtet werden, wo die größte Reduktion der Zellviabilität bei der Ko-Therapie mit Gemcitabin und GSI (Zellviabilität 36%,  $P < 0,0001$ ), gefolgt von der Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel (Zellviabilität 53%,  $P = 0,0002$ ) und der Monotherapie mit Gemcitabin (Zellviabilität 68%,  $P = 0,0269$ ; siehe Grafik 26) beobachtet werden konnte.



**Grafik 26** XTT-Messungen der Zellviabilität von Panc-1 in indirekten Ko-Kulturen nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen).

Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

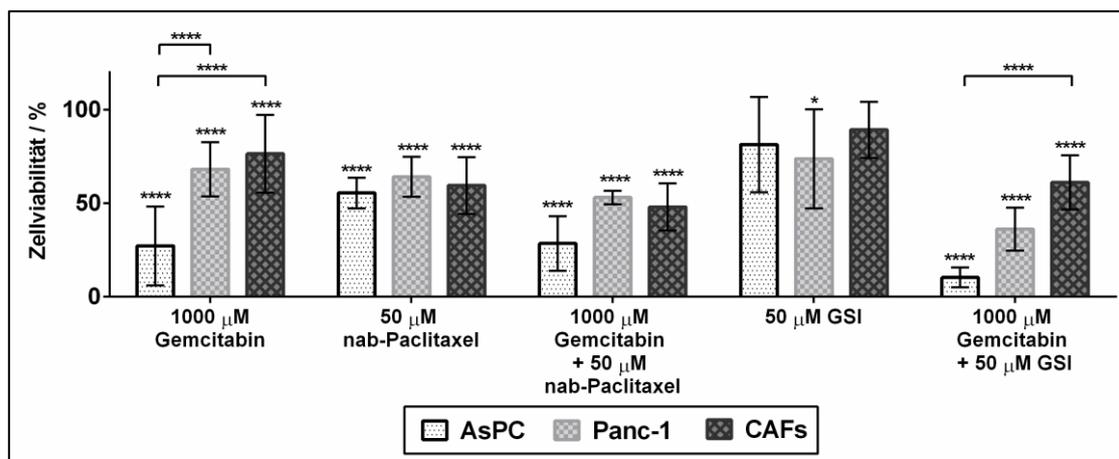
Bei der Therapie von CAFs wurde die größte Reduktion der Zellviabilität bei der Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel gemessen (Zellviabilität 44%,  $P < 0,0001$ ; siehe Grafik 27). Andere signifikante Therapien waren die Monotherapie mit Gemcitabin (Zellviabilität 70%,  $P < 0,0001$ ) und nab-Paclitaxel (Zellviabilität 60%,  $P < 0,0001$ ) und die Ko-Therapie mit Gemcitabin und GSI (Zellviabilität 61%,  $P < 0,0001$ ).



**Grafik 27** XTT-Messungen der Zellviabilität von CAFs in indirekten Ko-Kulturen nach einer Behandlung von 48 Stunden mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Sechs primär patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken repräsentieren den Vergleich zwischen den Gruppen). Quelle: C.C.M. Neumann, 2019

Vergleicht man nun die Tumorzellen und CAFs miteinander, fällt auf, dass für alle Zelllinien eine Reduktion der Zellviabilität bei der Behandlung von Gemcitabin beobachtet werden konnte ( $P < 0.0001$ ; siehe Grafik 28).<sup>7</sup> Der größte Effekt wurde dabei bei AsPC beobachtet.

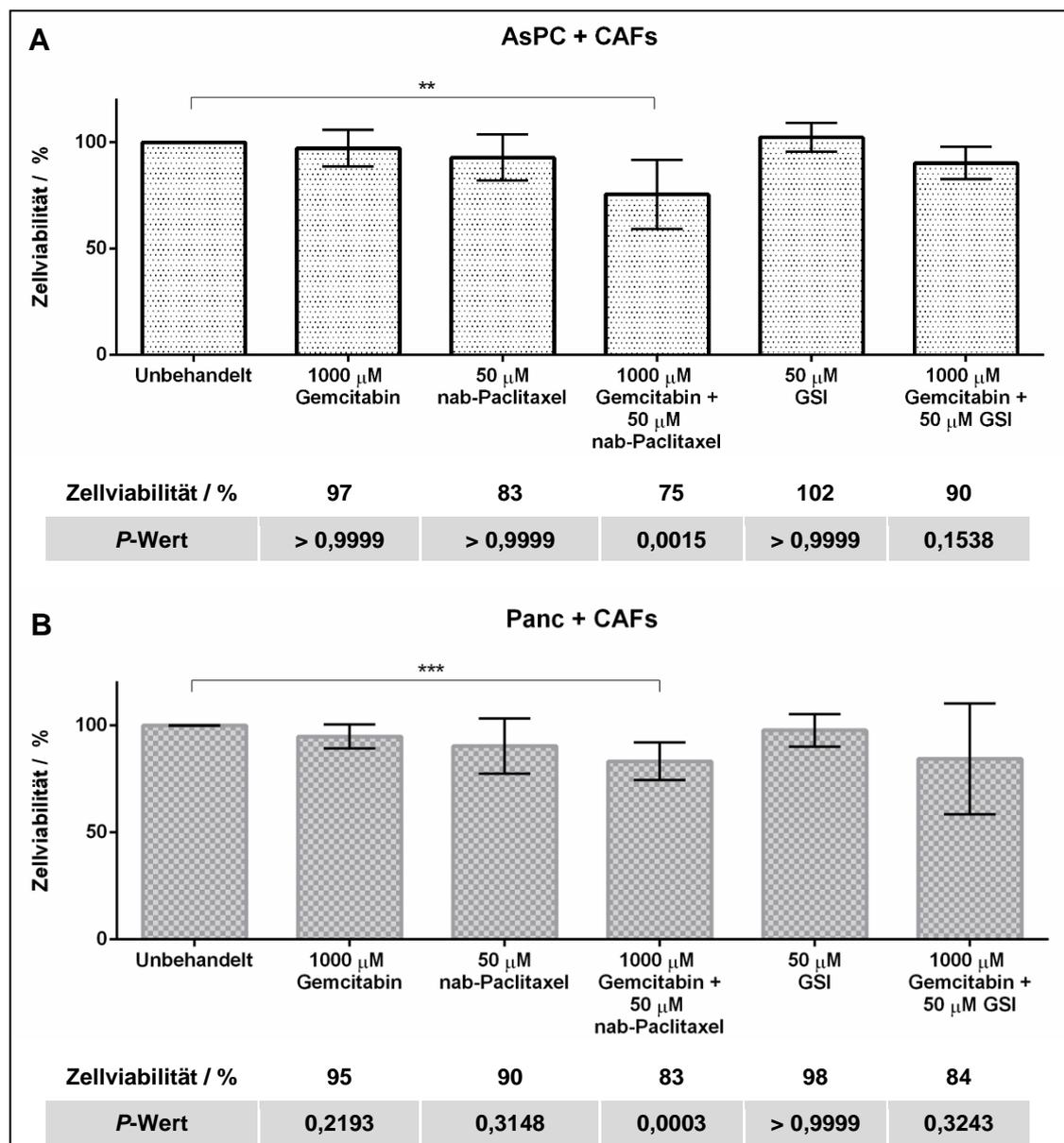
Zudem konnte eine therapeutische Wirksamkeit bei allen drei Zelllinien nach der Behandlung mit nab-Paclitaxel ( $P < 0.0001$ ), nab-Paclitaxel und Gemcitabin ( $P < 0.0001$ ) und Gemcitabin und GSI ( $P < 0.0001$ ) gemessen werden.<sup>7</sup> In der GSI Monotherapie zeigte lediglich Panc-1 eine signifikante Reduktion der Zellviabilität ( $P = 0.0344$ ).<sup>7</sup>



**Grafik 28** XTT-Messungen der Zellviabilität von indirekten Ko-Kulturen. Die Behandlung erfolgte für 48 Stunden. Zellen wurden therapiert mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Sechs primär patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels Two-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (einzelne Sterne repräsentieren den Vergleich zur unbehandelten Gruppe, Sterne mit Balken den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472<sup>7</sup>

### 3.6 Effekt der Chemotherapie in direkten Ko-Kulturen

In den direkten Ko-Kultursystemen konnte kaum ein therapeutischer Effekt gezeigt werden, da die Zellviabilität durch die Behandlung nur unwesentlich reduziert werden konnte (siehe Grafik 29).<sup>7</sup> Lediglich in der Ko-Therapie mit nab-Paclitaxel und Gemcitabin konnte eine signifikante Reduktion beobachtet werden (AsPC und CAFs, Zellviabilität 75%,  $P = 0.0015$ ; Panc-1 und CAFs, Zellviabilität 83%,  $P = 0.0003$ ).



**Grafik 29** XTT-Messungen der Zellviabilität von direkten Ko-Kulturen. Die Behandlung erfolgte für 48 Stunden. Zellen wurden therapiert mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. Sechs primär patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst. Unbehandelten Monokulturen

wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels One-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (Sterne mit Balken den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472, modifiziert<sup>7</sup>

### **3.7 Vergleich des Effektes der Chemotherapie in Mono-, indirekten und direkten Ko-Kulturen**

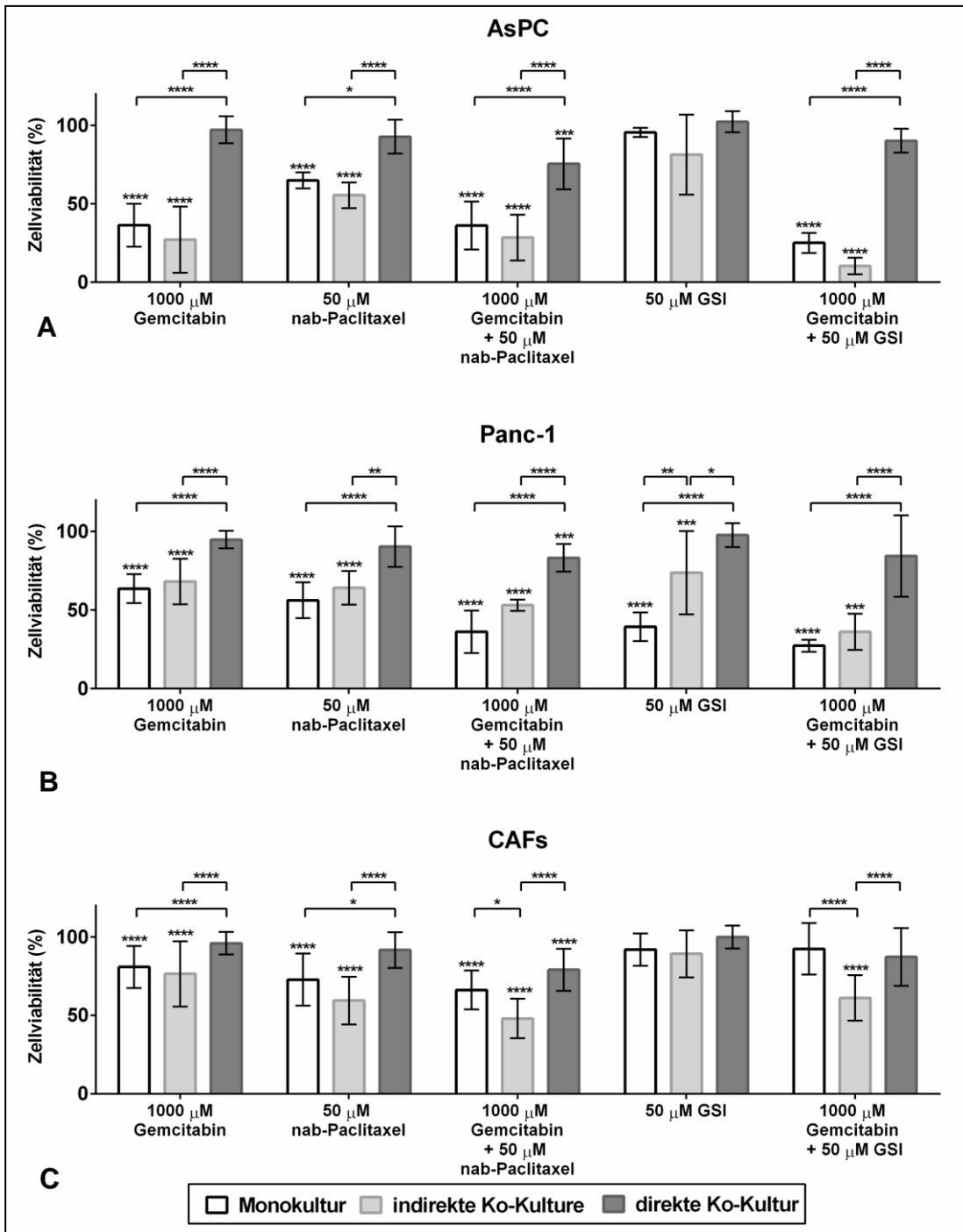
Um Schlussfolgerungen hinsichtlich der Tumor-Stroma-Interaktion ziehen zu können, bedarf es einem direkten Vergleich der Mono-, indirekten und direkten Ko-Kultursysteme (siehe Grafik 30).

Für AsPC zeigten die direkten Ko-Kulturen den geringsten therapeutischen Effekt im Vergleich zu indirekten Ko-Kulturen ( $P < 0.0001$ ) und Monokulturen (Gemcitabin,  $P < 0.0001$ ; nab-Paclitaxel,  $P = 0.0104$ ; Gemcitabin und nab-Paclitaxel,  $P < 0.0001$ ; Gemcitabin und GSI,  $P < 0.0001$ ) mit Ausnahme der GSI Monotherapie.<sup>7</sup>

Analog zu AsPC, wurde auch bei Panc-1 der geringste therapeutische Effekt bei direkten Ko-Kultursystemen im Vergleich zu indirekten Ko-Kulturen (Gemcitabin,  $P < 0.0001$ ; nab-Paclitaxel,  $P = 0.0014$ ; Gemcitabin und nab-Paclitaxel,  $P < 0.0001$ ; GSI,  $P = 0.0198$ ; Gemcitabin und GSI,  $P < 0.0001$ ) und Monokulturen ( $P < 0.0001$ ) gemessen.<sup>7</sup> Zudem konnte im Fall der GSI Monotherapie eine signifikant geringere Reduktion der Zellviabilität der indirekten Ko- im Vergleich zu der Monokultur festgestellt werden ( $P = 0.0017$ ).<sup>7</sup>

Die CAFs zeigten ein komplexeres Verhalten.<sup>7</sup> Die Zellviabilität blieb relativ unverändert bei Mono- und indirekten Ko-Kulturen nach der Behandlung mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI.<sup>7</sup> Bei der Ko-Therapie von CAFs mit nab-Paclitaxel und Gemcitabin ( $P = 0.0356$ ) und Gemcitabin und GSI ( $P < 0.0001$ ) konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität der indirekten Ko-Kulturen im Vergleich zu den Monokulturen festgestellt werden.<sup>7</sup> Vergleicht man

die indirekten Ko-Kulturen mit direkten Ko-Kulturen zeigt sich, dass die Reduktion der Zellviabilität außer bei der GSI Monotherapie bei allen Behandlungen signifikant geringer war ( $P < 0.0001$ ).<sup>7</sup>



**Grafik 30** XTT-Messungen der Zellviabilität von Monokulturen, indirekten und direkten Ko-Kulturen nach 48 Stunden. Zellen wurden therapiert mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI. **A** AsPC **B** Panc-1 und **C** CAFs (6 primär Patientengewonnene CAFs wurden zusammengefasst). Im Fall von C wurde der Durchschnitt der direkten Ko-Kultur Systeme von

AsPC und Panc-1 abgebildet. Unbehandelten Monokulturen wurde eine Zellviabilität von 100% zugeteilt und die Messungen mit Chemotherapeutika entsprechend standardisiert. Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet mittels Two-Way ANOVA und verglichen mit der unbehandelten Referenzgruppe (einzelne Sterne repräsentieren den Vergleich zur unbehandelten Gruppe, Sterne mit Balken den Vergleich zwischen den Gruppen); Quelle: Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBPD INT* 2018;17:461-472<sup>7</sup>

## Kapitel 4                    Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist aufgrund seiner häufig sehr späten Diagnosestellung, dem schnellen Progress der Erkrankung und der eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten mit einer hohen Mortalität verbunden. Erst in den letzten Jahren wurden Fortschritte in der Therapie der Erkrankung gemacht, auch wenn die 5-Jahres-Überlebensrate immer noch bei nur 7% liegt.<sup>1</sup> Mitverantwortlich für die Therapieresistenz des Tumors ist das Tumorstroma, welches einen Anteil von bis zu 90% des Tumolvolumens ausmacht.<sup>4-6</sup> Die zelluläre Schlüsselkomponente des Tumorstromas sind die tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs), welche die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrixproteine sind und durch lösliche Faktoren und direkten Zell-Zell-Kontakt die Migration, Proliferation, Invasion und Chemoresistenz des Tumors beeinflussen.<sup>10,61,62,97</sup> Des Weiteren konnten in Tumorsektaten des Pankreaskarzinoms verschiedene Stromacharakteristika als voneinander unabhängige und objektivierbare klinische Prognosefaktoren in verschiedenen Studien identifiziert werden.<sup>71,98,99</sup> Sowohl eine hohe Expression von  $\alpha$ -SMA, als auch eine geringe Stromadichte korrelieren beide mit einem geringeren krankheitsfreien Überleben.<sup>98</sup> Eine zielgerichtete Therapie des Pankreaskarzinoms sollte daher immer die Interaktion der Tumorzellen mit dem Tumorstroma und insbesondere die Interaktion mit  $\alpha$ -SMA-positiven CAFs berücksichtigen. Ziel dieser Forschungsarbeit war es daher, den Einfluss des zellulären Bestandteils des Tumorstromas (CAFs) auf die Resistenzentwicklung des Pankreaskarzinoms zu untersuchen.

Hierfür wurden von insgesamt 50 Patienten 6 primäre CAF-Kulturen isoliert, in in-vitro Kulturen überführt und für Experimente verwendet. CAFs wurden nicht immortalisiert. *Buchholz et al.* konnten zeigen, dass immortalisierte CAFs einen aggressiveren, anaplastischen Tumor in Mäusen hervorrufen, als native CAFs und somit direkt die Funktionalität der Zellen verändern.<sup>100</sup> Trotz dieser Kenntnisse immortalisieren viele Forschungsgruppen ihre primären CAF-Kulturen durch Transfektion mit dem Onkoprotein SV40 T-Antigen oder verwenden Telomerase-modifizierte CAFs.<sup>79,101-105</sup> Ein klarer Vorteil der Immortalisierung ist die deutlich höhere Teilungsrate der Zellen und das erhöhte Teilungspotential.<sup>106</sup> Dies ermöglicht

langandauernde Experimente und umfangreiche Analysen. Nicht immortalisierte Zellen hingegen teilen sich wesentlich langsamer, was den Aufwand der Kultivierung deutlich erhöht. Zudem unterliegen sie der Hayflick-Grenze der zellulären Seneszenz und können nur innerhalb eines kurzen Zeitraums experimentell verwendet werden.<sup>107</sup> Nach Abwägung der Vor- und Nachteile wurde sich gegen eine Immortalisierung der CAFs entschieden. Eine Standardisierung der verschiedenen CAF-Kulturen erfolgte in Experimenten dieser Arbeit, indem die funktionellen Untersuchungen zwischen der dritten und sechsten Zellpassage erfolgten.

Ein weiterer Punkt, auf den bei der Isolation primärer CAFs verzichtet wurde, war der Zusatz von Wachstumsfaktoren. Auch hier verwenden viele Gruppen Wachstumsfaktoren, um die Wahrscheinlichkeit für die Isolierung von CAFs aus primärem OP-Material zu erhöhen.<sup>72,108-110</sup> Vergleicht man abschließend die Ergebnisse der Zellgewinnung dieser Arbeit mit Angaben der Literatur (siehe Tabelle 3), lässt sich feststellen, dass vergleichsweise weniger Zellen bei der Isolierung der 50 Patienten angewachsen sind (49% waren nicht angewachsen im Vergleich zu 20-44% in der Literatur). Die Infektionsrate war deutlich niedriger (24% versus 36%), obwohl der Transport des Resektats vom Operationssaal über das Schnellschnitllabor des Pathologen in das Labor nicht immer unter vollständig sterilen Bedingungen erfolgen konnte.

Eine zentrale Fragestellung zur Untersuchung der Tumor-Stroma-Interaktion war die Wahl des in-vitro Systems. Hierbei war das primäre Ziel, zwischen parakrinen Effekten und direktem Zell-Zell-Kontakt zu unterscheiden. Erst dadurch konnte beleuchtet werden, inwieweit die indirekte und direkte Interaktion zwischen Tumorzellen und CAFs zur Resistenzentwicklung beitragen. Aus diesem Grund wurde ein zweidimensionales Kultursystem gewählt. Eine klare Trennung dieser unterschiedlichen Effekte wäre in dreidimensionalen Kultursystemen nicht möglich gewesen. Weiterhin birgt die Interaktion zwischen CAFs und Tumorzellen eine hohe Komplexität, weswegen es wichtig ist die Interaktion in zwei Dimensionen vollständig zu verstehen, bevor die Komponente der „dritten Dimension“ als weitere Variabel hinzugefügt

wird. Des Weiteren waren eine einfachere Handhabung und eine höhere Reproduzierbarkeit in zwei Dimensionen<sup>85</sup> Faktoren, die für die Wahl eines zweidimensionalen Kultursystems entscheidend waren. Andererseits ist bekannt, dass Zellen in zweidimensionalen Systemen eine andere Genexpression als in drei Dimensionen haben und bestimmte Signalwege verantwortlich für Zellwachstum, Metabolismus und Differenzierung herunterreguliert werden.<sup>111,112</sup> Zudem erhöht die dritte Dimension die Zell-Zell-Kontakte, womit eine in-vivo ähnliche Interaktion zwischen den Zellen gegeben ist.<sup>112</sup> Auch die für das Pankreaskarzinom typische hypoxische Umgebung und Diffusionsbarriere kann nur in dreidimensionalen Kultursystemen geschaffen werden. Ziel dieser Arbeit war, primär ein grundlegendes Verständnis und eine klare Trennung der zellulären und parakrinen Interaktionen bei der Resistenzentwicklung zu erlangen. Dies konnte mit zweidimensionalen Kulturen gut durchgeführt werden, was die entsprechenden Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen gestattet.

In den Kultursystemen wurde das therapeutische Ansprechen von Monokulturen primärer CAFs und etablierter Tumorzelllinien untersucht und mit indirekten und direkten Kulturäquivalenten verglichen. Um das Spektrum der Tumordifferenzierung abzudecken, wurden Interaktionen von primären CAFs mit einer undifferenzierten Tumorzelllinie (Panc-1<sup>75</sup>) und einer mittel bis gut differenzierten Tumorzelllinie (AsPC-1<sup>76</sup>) untersucht. Die Wahl der Chemotherapeutika fiel auf zwei Standardtherapeutika der palliativen Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms<sup>8</sup>, Gemcitabin und nab-Paclitaxel. Da sich nab-Paclitaxel vorwiegend in CAFs anreichert<sup>26</sup>, bietet dieses Therapeutikum eine stromagerichtete Therapie. Durch eine gezielte Reduktion der CAFs konnte somit eine Aussage über den Einfluss von CAFs auf die Chemoresistenz getroffen werden. Exemplarisch für einen Signalwegsinhibitor gegen Tumorstammzellen wurde sich zusätzlich für GSI entschieden, einen Inhibitor des Notch-Signalweges. *Fujita et al.* konnten zeigen, dass der Notch-Signalweg bei direkten Ko-Kulturen in CAFs und Tumorzellen hochreguliert wird und damit einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt für die Tumor-Stroma-Interaktion darstellt.<sup>10</sup>

Das therapeutische Ansprechen von AsPC und Panc-1 Monokulturen auf die Behandlung mit Gemcitabin, nab-Paclitaxel und GSI wurde bereits umfassend in in-vitro Experimenten untersucht und publiziert.<sup>113-120</sup> Um allerdings einen adäquaten Vergleich der Monokulturen zu den Ko-Kulturen zu ziehen, wurden die Experimente mit den Tumorzelllinien unter standardisierten Bedingungen wiederholt. Wie erwartet zeigten Monokulturen der Tumorzelllinien AsPC and Panc-1 eine Chemosensitivität (siehe Grafik 24). Auch eine in der Literatur berichtete höhere Chemosensitivität von AsPC auf Gemcitabin wurde in den Messungen beobachtet.<sup>113</sup> Wenn bei einer bestimmten Gemcitabin Konzentration ein therapeutischer Effekt bei Tumorzellen zu beobachten war, so hatte eine weitere Dosissteigerung nicht zu einer nochmaligen Steigerung des Therapieansprechens geführt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bietet die Metabolisierung von Gemcitabin in Tumorzellen. Das Chemotherapeutikum wird in die Zelle aufgenommen und zu dem aktiven Metaboliten Gemcitabintriphosphat phosphoryliert (siehe Grafik 4). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Überführung in die aktive Form ist die erste Phosphorylierung, die von dem Enzym Deoxycitidinkinase (dCK) katalysiert wird.<sup>18,19</sup> Die Michaelis-Menten-Konstante der dCK beträgt 5-10  $\mu\text{M}$ . Die Hälfte aller Enzyme sind daher bereits bei dieser Konzentration in einem Enzym-Substrat-Komplex gebunden. Eine vollständige Sättigung wird bei einer Gemcitabinkonzentration von über 20 $\mu\text{M}$  erreicht.<sup>121</sup> Ist also das Schlüsselenzym vollständig gesättigt, so bleibt die intrazelluläre Konzentration der aktiven Gemcitabinmetabolite bei steigender extrazelluläre Konzentration des Therapeutikums unverändert.

Betrachtet man die Wirkung von nab-Paclitaxel auf die Tumorzellen, so lässt sich eine therapeutische Wirkung sowohl für AsPC, als auch für Panc-1 nachweisen (siehe Grafiken 19 B und 20 B). Dies zeigen auch in-vitro Ergebnisse von *Awasthi et al.*<sup>120</sup> Die Effekte einer Inhibition des Notch-Signalweges in-vitro sind bislang nur begrenzt untersucht. Nur wenige Studien untersuchten den therapeutischen Effekt von GSI auf pankreatische Tumorzelllinien.<sup>56,119</sup> So konnte von *Du et al.* gezeigt werden, dass GSI keinen Effekt auf die Apoptoserate von AsPC hat.<sup>119</sup> Selbiges wurde auch in den AsPC Monokulturen dieser Arbeit

beobachtet (siehe Grafik 18 C). Der Effekt von GSI bei Panc-1 Monokulturen wurde hingegen erstmalig untersucht (siehe Grafik 19 C). Es konnte durch die Behandlung mit GSI die Zellviabilität von Panc-1 deutlich reduziert werden. Da GSI gezielt auf die Stammzellpopulation der Tumorzellen wirkt, kann aus den Ergebnissen der Monokulturen geschlussfolgert werden, dass Panc-1 entweder eine wesentlich höhere Stammzellpopulation als AsPC hat oder die Stammzellpopulation von Panc-1 sensitiver auf die Behandlung mit GSI reagiert. Bei genauerer Betrachtung von stammzell-spezifischen Markern der beiden Tumorzelllinien wurde eine wesentlich höhere Expression dieser Marker bei Panc-1 Zellen beobachtet.<sup>122</sup> Ein größerer Anteil an Zellen mit stammzell-spezifischen Markern spricht für eine höhere Stammzellpopulation in Panc-1 und untermauert den positiven therapeutischen Wirkungseffekt von GSI bei Panc-1, der bei AsPC ausblieb.

Bei der Betrachtung der CAF Monokulturen werden wesentliche Unterschiede im Vergleich zu den Tumorzellen deutlich. Erstmals konnte gezeigt werden, dass primäre CAFs eine ausgeprägte Chemoresistenz aufweisen (siehe Grafik 20).<sup>7</sup> CAFs sprechen lediglich bei den höchsten Konzentrationen von Gemcitabin und nab-Paclitaxel an. Zudem erscheint es nicht verwunderlich, dass eine Resistenz gegenüber GSI vorliegt, da für CAFs spezifische Tumorstammzellen bisweilen nicht nachgewiesen werden konnten. Lediglich eine andere Arbeitsgruppe untersuchte in einer 2017 publizierten Arbeit das Therapieansprechen von Telomerase-immortalisierten CAFs auf Gemcitabin.<sup>123</sup> Auch wenn potentiell durch die Immortalisierung ein phänotypisch resistenterer CAF Typus produziert wurde<sup>100</sup>, konnte gleichermaßen eine ausgeprägte Chemoresistenz von CAFs beobachtet werden.<sup>123</sup> Unabhängig von der Tumor-Stroma-Interaktion lässt sich somit festhalten, dass das Tumorstroma des Pankreaskarzinoms selbst chemoresistent ist. Bei resistenten CAFs und somit resistentem Stroma werden die hypoxische Umgebung des Tumors und die Perfusions- und Diffusionsbarriere weiter aufrechterhalten. Eine Applikation eines Chemotherapeutikums, das auf Tumorzellen sensibel, allerdings auf CAFs resistent ist, wird daher nur eine bedingte Wirksamkeit in-vivo entfalten können. *Olive et al.* konnten nachweislich die Perfusions- und Diffusionsbarriere durch die Therapie eines Shh-Inhibitors in einem Mausmodell aufheben.<sup>124</sup>

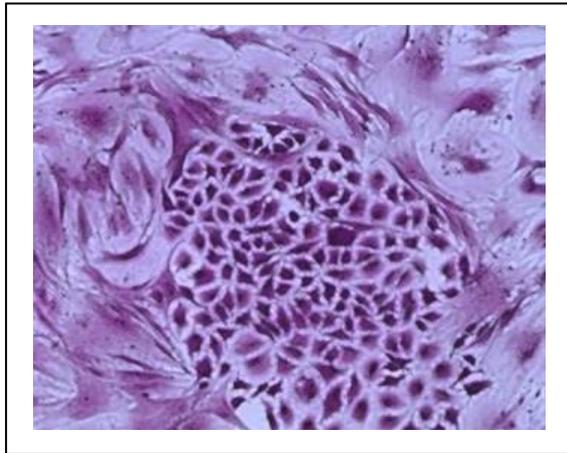
Der Einsatz des Therapeutikums führte zu einer Reduktion des Stromas, einer verstärkten Vaskularisierung, einer verbesserten Distribution des Chemotherapeutikums im Tumor und somit zu einem besseren therapeutischen Ansprechen.<sup>124</sup> Eine Reduktion des Tumorstromas und eine damit verbundene Reduktion der Diffusionsbarriere konnte auch in der randomisierten Phase-III-MPACT-Studie von *Von Hoff et al.* beobachtet werden. In dieser Studie wurde der Vorteil der Ko-Therapie von nab-Paclitaxel und Gemcitabin gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin bei 861 Patienten bewertet (siehe Tabelle 2).<sup>8</sup> Bei der Monotherapie mit Gemcitabin konnte eine Reduktion des Tumordiameters mittels CT oder MRT von nur 7,02% beobachtet werden ( $P < 0,001$ ). Der zusätzliche Einsatz des stroma-gezielten Therapeutikums nab-Paclitaxel erhöhte das mediane Überleben von 6,7 auf 8,5 Monate ( $P < 0,001$ ) und ging mit einer Reduktion des Tumordiameters um 22,15% ( $P < 0,001$ ) einher.<sup>125</sup> Demzufolge ist das chemoresistente Stroma einer der Schlüsselkomponenten des Pankreastumors. Auch wenn Monokulturen sehr vereinfachte Modelle sind, so lassen sie entsprechende Rückschlüsse auf die Tumorphysiologie zu. Wichtig hierbei ist es jedoch nicht nur die Monokulturen von Tumorzellen, sondern auch die der anderen Komponenten zu untersuchen, um entsprechend der Tumorzusammensetzung und Tumorstruktur Rückschlüsse zu ziehen.

Das Modell der indirekten Ko-Kulturen ist bereits wesentlich realitätsnäher, da ein parakriner Austausch von CAFs und Tumorzellen ermöglicht wird. Die Interaktion zwischen den beiden Zelltypen ist äußerst komplex und umfasst diverse lösliche Mediatoren, wie z.B. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10.<sup>63,64,97,126</sup> Inwieweit die parakrine Interaktion zu einer Resistenzentwicklung beiträgt wurde von *Zhang et al.* untersucht. Panc-1 Zellen wurden in von CAFs präkonditioniertem Medium mit Gemcitabin therapiert und die Zellviabilität der Tumorzellen gemessen.<sup>59</sup> Durch die parakrinen Mediatoren der CAFs konnte eine geringere Reduktion der Zellviabilität und eine damit verbundenen Resistenzentwicklung festgestellt werden.<sup>59</sup> Auch bei der Untersuchung von AsPC wird von einer Resistenzentwicklung gegen Gemcitabin in indirekten Ko-Kulturen mit einer Telomerase-immortalisierten CAF-Kultur berichtet.<sup>123</sup> Entgegen dieser Erkenntnisse, konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit keine eindeutige

Resistenz von Panc-1 und AsPC in indirekten Ko-Kultursystemen beobachtet werden (siehe Grafik 30).<sup>7</sup> Der einzige signifikante Anstieg der Zellviabilität von Mono- zu indirekten Ko-Kulturen wurde bei der Monotherapie von Panc-1 mit GSI beobachtet.<sup>7</sup> Bei allen anderen Therapieregimen von Panc-1 war ein medianer, wenn auch insignifikanter Anstieg der Chemoresistenz zu beobachten.<sup>7</sup> Hierbei ist anzumerken, dass CAFs nicht immer auf Tumorzellen stimulierend wirken. *Fujita et al.* untersuchten die Veränderung der Proliferationsraten von Panc-1 Zellen von Mono- zu indirekten Ko-Kulturen. Panc-1 Zellen zeigten bei der Interaktion mit verschiedenen primären CAF-Kulturen einen Anstieg der Proliferationsrate und wurden von CAFs stimuliert.<sup>10</sup> Mit anderen primären CAF-Kulturen war ein Abfall der Proliferationsrate von Panc-1 und eine durch CAFs induzierte Inhibition zu beobachten.<sup>10</sup> Ein Erklärungsansatz für die in sich widersprüchliche Interaktion zwischen CAFs und Tumorzellen wurde in diesem Zusammenhang nicht genannt. Des Weiteren zeigte sich beim Vergleich des Therapieansprechens von CAF Mono- zu indirekten Ko-Kulturen ein höheres Ansprechen der primären CAFs bei den Ko-Therapien mit Gemcitabin plus nab-Paclitaxel und Gemcitabin plus GSI.<sup>7</sup>

Im Gegenteil zu Mono- und indirekten Ko-Kulturen gibt es nur wenige Untersuchungen, welche die Interaktion zwischen Tumorzellen und CAFs in direkten Ko-Kulturen untersuchen. So konnte in diesem Kultursystem eine deutlich gesteigerte Proliferationsrate der Tumorzellen im Vergleich zu Mono- oder indirekten Ko-Kulturen im unbehandelten Zustand festgestellt werden.<sup>10</sup> Wie sich im Zuge dieser Arbeit herausstellte, zeigen die direkten Ko-Kulturen eine deutlich ausgeprägte Chemoresistenz (siehe Grafik 29).<sup>7</sup> Die einzig wirksame Therapie der Ko-Kulturen war die Ko-Therapie mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel.<sup>7</sup> Genau jenes Therapieregime, bei dem auch in der Klinik ein effektives Ansprechen bei der palliativen Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms beobachtet wird.<sup>8</sup> Auffällig bei der mikroskopischen Inaugenscheinnahme der direkten Ko-Kulturen war die Kulturmorphologie. Entgegen der Mono- und indirekten Ko-Kulturen, wuchsen die Tumorzellen der direkten Ko-Kulturen in Zellagglomeraten, die von CAFs in käfig-ähnlichen Strukturen umgeben wurden (siehe Grafiken 16 und 17).<sup>7</sup> Eine solche Kulturmorphologie wurde bisweilen noch nicht für

Pankreaskarzinomzellen beschrieben und nur bei direkten Ko-Kulturen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms beobachtet (siehe Grafik 31).<sup>127</sup>



**Grafik 31** Kristallviolettfröbung einer direkten Ko-Kultur mit humanen CAFs der Lunge und humanen Karzinomzellen eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms; Quelle: Ji X, Ji J, Shan F, Zhang Y, Chen Y, Lu X. Cancer-associated fibroblasts from NSCLC promote the radioresistance in lung cancer cell lines. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:7002-7008<sup>127</sup>

Als rein deskriptive Beobachtung ist anzumerken, dass die Ko-Kulturen mit der Tumorzelllinie Panc-1 größere Zellagglomerate als mit AsPC bildeten. Außerdem waren die direkten Ko-Kulturen mit Panc-1 resistenter als mit AsPC (siehe Grafik 29). Demzufolge darf die Hypothese aufgestellt werden, dass nicht nur der direkte Zell-Zell-Kontakt sowie die von den CAFs produzierte Extrazellulärmatrix, sondern auch die käfig-ähnlichen Strukturen und deren Größe eine wichtige Rolle bei der Resistenzbildung der direkten Ko-Kulturen spielt. *Hessmann et al.* konnten einen exemplarischen Resistenzmechanismus gegen Gemcitabin in einem Mausmodell zeigen.<sup>128</sup> Demzufolge führt eine geringere Expression des dephosphorylierenden Enzyms in CAFs, das die Umwandlung von Gemcitabinmonophosphat zurück zu Gemcitabin katalysiert, zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von Gemcitabinmetaboliten, einer geringeren Konzentration des Prodrugs Gemcitabin und damit zu einer verstärkten Aufnahme von Gemcitabin in die Zelle (siehe Grafik 4).<sup>128</sup> Somit wird die extrazelluläre Konzentration von Gemcitabin im Tumorgewebe reduziert und der Effekt des Therapeutikums durch die vermehrte Aufnahme des Stromas auf Tumorzellen abgeschwächt.<sup>128</sup> Bei Betrachtung der direkten Ko-Kulturen wäre ein solcher Mechanismus der Resistenzentwicklung nicht auszuschließen und durchaus plausibel. Ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus der direkten Ko-Kulturen bieten amplifizierte Signalwege, die das Tumorstwachstum, die Metastasierung und die Chemoresistenz begünstigen.<sup>9,10,16</sup> Drei für das Pankreaskarzinom bekannte und sich gegenseitig beeinflussende Signalwege sind der

Hedgehog-, Wnt- und Notch-Signalweg, die allesamt für die Selbsterneuerung und Differenzierung der Tumorstammzellen, aber auch für die Tumorzellproliferation, Chemoresistenz und Tumervaskularisierung von großer Bedeutung sind.<sup>34,129</sup> In direkten Ko-Kulturen konnte eine Amplifikation des Shh-Signalweges von Fibroblasten und Tumorzellen nachgewiesen werden.<sup>130</sup> *Zhou et al.* zeigten, dass die Inhibition des Shh-Signalweges zur Aufhebung der in direkten Ko-Kulturen zu beobachteten Chemoresistenz führt.<sup>130</sup> Eine reduzierte Chemoresistenz durch den Einsatz von Shh-Inhibitoren wurde ebenfalls in entsprechenden Mausmodellen von sowohl *Thayer et al.*<sup>131</sup>, als auch *Bahra et al.*<sup>132</sup> beschrieben. Auch der Wnt-Signalweg ist nachweislich im Pankreastumor amplifiziert.<sup>129</sup> Eine Inhibition dieses Signalweges führte zu einer reduzierten Zellviabilität in-vitro<sup>133</sup> und einem reduzierten Tumorwachstum im Mausmodell.<sup>134</sup> Ein weiterer in direkten Ko-Kulturen amplifizierter Signalweg ist der Notch-Signalweg.<sup>9,10</sup> Ein Ziel dieser Arbeit war es die Rolle des Notch-Signalweges hinsichtlich der Chemoresistenz der direkten Ko-Kulturen zu untersuchen. Entgegen den ursprünglichen Erwartungen zeigte die Inhibition des Notch-Signalweges durch GSI jedoch keine therapeutische Wirkung und stattdessen ein Fortbestehen der Chemoresistenz. Daher kann vermutet werden, dass der Notch-Signalweg eine eher untergeordnete Rolle bei der Resistenzentwicklung der Pankreastumoren der primär gewonnenen Proben spielt. Allerdings muss angemerkt werden, dass Notch-Inhibitoren nur bei einer Aktivierung des Signalweges wirken können. Tumoren sind teils sehr heterogen und nicht immer müssen sämtliche Signalwege aktiviert sein. So konnten *Riedlinger et al.* beispielsweise bei einer Expressionsanalyse von 50 Cholangiokarzinomresektaten nur in 48% der Fälle eine signifikante Aktivierung des Shh-Signalweges feststellen.<sup>135</sup> Da die Aktivierung des Notch-Signalweges in den sechs primär gewonnenen CAF-Kulturen nicht untersucht wurde, ist eine Verallgemeinerung der Resistenzentwicklung dieses Signalweges für das Pankreaskarzinom nur bedingt möglich. Bisweilen konnten Inhibitoren des Shh- und des Notch-Signalweges in klinischen Studien allerdings keine klaren Vorteile in der Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms nachweisen<sup>16,37</sup>, weswegen deren therapeutischer Einsatz in der Praxis äußerst fraglich ist.

Abschließend lässt sich festhalten, dass der Einfluss von Stromazellen auf das Therapieansprechen von Pankreaskarzinomzellen in unterschiedlichen in-vitro Kultursystemen untersucht wurde. Die Gewinnung primärer Zellen aus dem Pankreaskarzinom wurde etabliert und ähnliche Ergebnisse zu anderen Arbeitsgruppen in der Isolierung erzielt. Durch die Messung der Zellviabilität in Mono-, indirekten und direkten Ko-Kulturen konnte modellhaft gezeigt werden, dass die direkte Ko-Kultur von allen drei Systemen die klinische Realität am besten reflektiert.<sup>7</sup> Der einzige therapeutische Effekt in direkten Ko-Kulturen konnte bei dem in der Klinik effektivsten Therapieregime von Gemcitabin zusammen mit nab-Paclitaxel gezeigt werden.<sup>7</sup> Spezifisch für die direkten Ko-Kulturen und daher in Zusammenhang mit der Chemoresistenz waren der direkte Zell-Zell-Kontakt, die Extrazellulärmatrix und die käfig-ähnlichen Strukturen.<sup>7</sup> Ein wesentlicher Vorteil der Experimente war die Verwendung von nicht immortalisierten CAFs, die primär von Patientenresektaten aus dem OP gewonnen wurden. Für Tumorzellen wurde sich jedoch für etablierte und bekannte Tumorzelllinien entschieden, um eine Standardisierung und einen adäquaten Vergleich mit anderen Arbeiten zu ermöglichen. Die Verwendung von etablierten Tumorzelllinien kann jedoch gleichermaßen als Kritikpunkt angesehen werden, da primäre Tumorzelllinien eher das in-vivo Verhalten widerspiegeln.<sup>136</sup> Ein weiterer Kritikpunkt der Arbeit ist die Tatsache, dass bei den direkten Zellkulturen die Zellviabilität des gesamten Zellagglomerates gemessen wurde. Eine Aussage hinsichtlich der veränderten Komposition von Tumor- und Stromazellen nach der Therapie kann somit nicht gemacht werden. Eine Möglichkeit, die zwei Komponenten der direkten Ko-Kultur zu differenzieren, wurde von *Xu et al.* vorgenommen. Durch eine GFP-Markierung konnte eine Chemoresistenz der Tumorzellkomponente gegen Gemcitabin bei direktem Zell-Zell-Kontakt mit CAFs nachgewiesen werden.<sup>137</sup> Da CAF Monokulturen bereits eine deutliche Chemoresistenz in den Untersuchungen dieser Arbeit aufwiesen, ist daher anzunehmen, dass eine höhere Chemoresistenz beider Komponenten zu einer geringen Reduktion der Zellviabilität in den direkten Ko-Kulturen geführt hat.

Zudem konnte erstmalig eine Chemoresistenz von nicht immortalisierten CAF Monokulturen gezeigt und die intrinsische Therapieresistenz des Pankreasstromas beschrieben werden. Viel zu sehr wurde sich in den letzten Jahren auf den alleinigen Therapieeffekt von Tumorzellen konzentriert und die Komponente und Interaktion mit dem Stroma außer Acht gelassen. Während diverse Erklärungsansätze für die Resistenz von Tumorzellen und deren zugrundeliegenden Mechanismus existieren, sind vergleichbare Studien zur Untersuchung des Stromas nicht bekannt. Zudem ist unklar, warum eine Reduktion der Stromakomponente im Pankreastumor abhängig vom Therapeutikum sowohl mit einer Verbesserung<sup>42,43</sup>, als auch mit einer Verschlechterung<sup>67,69,70</sup> des medianen Überlebens in Mausmodellen und klinischen Studien einhergehen kann. Um dahingehend ein besseres Verständnis zu erlangen, untersuchte die CONKO-001-Studie Charakteristika des Tumorstromas bei 162 Patienten. Dabei wurden sowohl die Stromadichte, als auch die Expression von  $\alpha$ -SMA als zwei voneinander unabhängige Prognosefaktoren identifiziert.<sup>98</sup> Während eine hohe Stromadichte mit einer besseren Prognose und einem längeren medianen Überleben korrelieren, geht eine hohe Expression von  $\alpha$ -SMA mit einer schlechteren Prognose und einem kürzerem medianen Überleben einher.<sup>98,138</sup> Gleiches wurde in einer kleineren Studie mit 57 Patienten von Torphy *et al.* beschrieben.<sup>99</sup> Während das mediane krankheitsfreie Überleben bei niedriger Stromadichte 9 Monate betrug, stieg es bei hoher Stromadichte auf 19 Monate an ( $P = 0,022$ ).<sup>99</sup> Es wird daher angenommen, dass das Stroma einerseits als immunologischer Abwehrmechanismus dient, den Tumor isoliert, vom Organismus und dessen Immunsystem abschirmt und die Progression eindämmt.<sup>98</sup> Zudem hat normales Tumorstroma eine anti-proliferative Wirkung auf Tumorzellen.<sup>6,139,140</sup> Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass  $\alpha$ -SMA-positive CAFs eine pro-proliferative Wirkung auf Tumorzellen haben und eine Chemoresistenz induzieren können.<sup>59,82</sup> In einem Mausmodell von Özdemir *et al.* führte die alleinige Depletion von  $\alpha$ -SMA-positive CAFs zu einer deutlichen Reduktion des medianen Überlebens der Mäuse.<sup>67</sup> Die sich teils widersprechenden Ergebnisse machen deutlich, wie kompliziert die Tumorphysiologie des Pankreastumors ist und dass eine erfolgreiche Tumorthherapie nicht nur eine Stromareduktion, sondern auch die Komposition des

Tumorstromas auf entscheidende Weise beeinflussen muss. Dass das Tumorstroma selbst chemoresistent ist und dass der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen  $\alpha$ -SMA-positiven CAFs mit Tumorzellen entscheidend für die Resistenzbildung gegen Chemotherapeutika ist, konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlicht werden. Die Komplexität und das nur begrenzte Wissen über das Tumorstroma machen jedoch weitere Studien für das Erlangen eines besseren Verständnisses notwendig.

# Kapitel 5            Protokolle

## 5.1            Kultivierung, Umsetzen und Ernten von Zellen

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, das mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 110 µg/ml Cotrimoxazol zugesetzt wurde. Zudem wurden die Zellen in entsprechend befeuchteten Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Für das Umsetzen und Ernten von Zellen wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Das Medium wurde aus der Kulturflasche abgenommen.
- Die Kulturflasche wurde mit Phosphatpufferlösung (PBS) gespült, um das restliche Medium zu entfernen, und wieder aus der Kulturflasche abgenommen.
- Trypsin/EDTA wurde zu der leeren Kulturflasche dazugegeben und für drei bis fünf Minuten inkubiert.
- Anschließend wurde die Kulturflasche auf der Arbeitsbank abgeklopft, um die noch adhärenen Zellen zu lösen.
- Unter dem Mikroskop wurde das Ablösen der Zellen beobachtet.
- Sobald die Zellen nicht mehr adhären waren, wurde RPMI 1640 Medium dazugegeben.
- Das Zell/Medium/Trypsin/EDTA Suspensat wurde in ein Eppendorf Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert.
- Nach dem Zentrifugieren wurde das Medium abdekantiert und das abgesetzte Zellkonzentrat in frischem Medium resuspendiert.

## 5.2 Zelllinien primärer CAFs

Es wurden Proben von 50 Patienten entnommen und in Kultur gesetzt. Die Gewinnung von Primärkulturen erfolgte unter folgendem Protokoll:

- Tumorgewebe wurde unmittelbar nach der Resektion in das Schnellschnittlabor der Pathologie des Virchow-Klinikums gebracht.
- Ein Stück Tumor wurde innerhalb von einer Stunde vom Pathologen steril entnommen.
- Tumorgewebe wurde in kaltes Medium RPMI + 10% PenStrep + 10% FBS + Cotrim überführt.
- Tumorgewebe wurde mittels Skalpell mechanisch unter der Bench in ca. 1 mm<sup>3</sup>-große Würfel zerkleinert und die Zellen wurden in Suspension gebracht.
- 3 x 7 ml dieser Suspension wurden in 3 kleine Kulturflaschen überführt und inkubiert.
- 24 Stunden nach der Gewinnung wurden die Medien der drei kleinen Kulturflaschen gewechselt.

## 5.3 Charakterisierung der CAFs

Die Charakterisierung der CAFs erfolgte nach dem Protokoll von *Fujita et al.*<sup>10</sup>. Hierzu wurden 6 Well-Platten mit CAFs mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^4$  Zellen pro Well besiedelt und folgendes Protokoll durchgeführt:

- Zum Anwachsen wurden die Zellen für 24 Stunden in RPMI 1640 Medium inkubiert.
- Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Wells mit PBS gewaschen.
- Es erfolgte eine Fixierung der Zellen mit Formaldehyd (4%) für 10 Minuten.
- Die Wells wurden ein erneutes Mal mit PBS gewaschen.
- Es wurde in jedes Well daraufhin eine Lösung von 0,2% Triton X-100 zur 2 Minuten Permeabilisierung der Zellen hinzugegeben.
- Nach der Permeabilisierung wurden die Wells mit PBS gewaschen.

- Zu den in den Wells fixierten und permeabilisierten Zellen wurde eine Blockierungslösung (1% (v/v) fetales Kälberserum, 1% (v/v) bovines Serumalbumin) für 2 Stunden hinzugegeben.
- Die Wells wurden erneut mit PBS gewaschen.
- Pro Antikörpertest wurde jeweils ein Well als Positiv- und ein anderes als Negativkontrolle verwendet. Die Positivkontrolle wurde für 2 Stunden mit dem Antikörper inkubiert. Hierzu wurden die Antikörper in PBS mit entsprechendem Verdünnungsfaktor gelöst (Vimentin 1:500, GFAP 1:400,  $\alpha$ -SMA 1:600). Die Negativkontrolle wurde zeitgleich für 2 Stunden mit PBS inkubiert.
- Die Wells wurden mit PBS gewaschen
- Zu allen Wells wurde ein Ani-Hase/Anti-Maus Biotinyllinker hinzugegeben und die Platten für 20-30 Minuten inkubiert.
- Erneut wurden die Wells mit PBS gewaschen.
- Zu allen Wells wurde ein Streptavidin-HRP Lösung hinzugegeben und diese für 20-30 Minuten inkubiert.
- Die Wells wurden mit PBS gewaschen.
- Es erfolgte eine farbliche Entwicklung der Antikörper-positiven Zellen durch das DAB Chromogen unter dem Mikroskop. Während der Entwicklung wurde immer der Vergleich zur Negativkontrolle sichergestellt, damit das Chromogen nicht die Antikörper-negativen Zellen mit färbt.
- Die Wells wurden mit PBS gewaschen.
- Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 Minuten und ein anschließendes Bläuen der Wells mit heißem Leitungswasser.
- Die gefärbten Zellen wurden mikroskopiert und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

## 5.4 Untersuchung der Zellviabilität in Monokulturen

Die Zellviabilität der Monokulturen wurde mit dem XTT Zellproliferationsassay untersucht. Zuerst wurde das Kit für jede Zelllinie entsprechend der Herstelleranweisung kalibriert. Anschließend wurden folgende Schritte durchgeführt (siehe Grafik 12):

- Für Monokulturen wurden Tumorzellen (AsPC, Panc-1) und CAFs mit einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^4$  Zellen pro Well in 96 Well-Platten ausgesetzt.
- Zum Anwachsen wurden die Zellen für 24 Stunden in RPMI 1640 Medium inkubiert.
- Nach 24 Stunden wurde das ursprüngliche Medium abgenommen und neues Medium mit entsprechendem Zusatz der Chemotherapeutika hinzugefügt. Die Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden entsprechend variiert:
  - Gemcitabin zwischen 0 und 1000  $\mu\text{M}$
  - nab-Paclitaxel zwischen 0 und 50  $\mu\text{M}$
  - $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (GSI) zwischen 0 und 50  $\mu\text{M}$ .
- Monokulturen wurden für 48 Stunden mit Therapeutika behandelt.
- Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die XTT-Reagenz mit einer Konzentration von 0,3 mg/ml nach Herstelleranleitung hinzugefügt.
- Nach 6 Stunden Inkubationszeit der Monokulturen und der XTT-Reagenz wurde die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 450 nm und 650 nm gemessen.
- Die relative Absorbanz wurde aus der Differenz von Referenzwellenlänge (650 nm) und der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 450 nm berechnet, womit die Absorbanz direkt mit der Zellviabilität und dem damit verbundenen therapeutischen Wirkungseffekt korreliert.
- Die Standardisierung der Messungen erfolgte durch die Absorbanz unbehandelter Zellen.

## 5.5 Untersuchung der Zellviabilität in indirekten Ko-Kulturen

Für Experimente der indirekten Ko-Kulturen wurden 24 Well-Platten mit Inlays mit einer Porengröße von 0,4 µm verwendet. Die entsprechend kleine Porengröße verhinderte Zellmigration und ermöglichte einen parakrinen Austausch von Peptiden und anderer löslicher Faktoren zwischen Tumor- und CAFs. Für das experimentelle Vorgehen wurden folgende Schritte abgehandelt (siehe Grafik 13):

- Karzinomzellen (AsPC, Panc-1) wurden mit einer Dichte von  $6 \times 10^6$  Zellen pro Well in das Well ausgesetzt.
- Anschließend wurde das Inlay eingesetzt und mit Medium gefüllt.
- CAFs wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Inlay in das Inlay dazugegeben.
- Die indirekte Ko-Kultur wurde für 24 Stunden inkubiert, genug Zeit für die Karzinomzellen am Wellboden und die CAFs an der Membran des Inlays anzuhaften.
- Nach 24 Stunden wurde das Medium vom Well und Inlay entnommen und neues Medium mit entsprechendem Zusatz der Chemotherapeutika hinzugefügt. Die höchsten Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden verwendet:
  - Gemcitabin 1000 µM
  - nab-Paclitaxel 50 µM
  - nab-Paclitaxel / Gemcitabin 50 µM / 1000 µM
  - γ-Sekretaseinhibitor (GSI) 50 µM
  - γ-Sekretaseinhibitor (GSI) / Gemcitabin 50 µM / 1000 µM.
- Indirekte Ko-Kulturen wurden für 48 Stunden mit Therapeutika behandelt.
- Nach 48 Stunden wurde das Medium vom Well und Inlay entnommen, die Inlays in eine gesonderte 24 Well-Platte umgesetzt und die XTT-Reagenz mit der Konzentration von 0,3 mg/ml nach Herstelleranleitung hinzugefügt.
- Nach 6 Stunden Inkubationszeit wurden 150 µl aus jedem Well und jedem Inlay separat in eine 96 Well-Platte pipettiert und deren Absorbanz bei einer Wellenlänge von 450 nm und 650 nm gemessen.

- Die Messung der Absorbanz erfolgte entsprechend der der Monokulturen.

## 5.6 Untersuchung der Zellviabilität in direkten Ko-Kulturen

Für die direkten Ko-Kulturen wurden Tumorzellen (AsPC, Panc-1) und CAFs zusammen in 96 Well-Platten ausgesetzt. Analog zu Mono- und indirekten Ko-Kulturen wurden die Zellen inkubiert, den Therapeutika ausgesetzt und deren Zellviabilität gemessen (siehe Grafik 14):

- Für die direkten Ko-Kulturen wurden Tumorzellen (AsPC, Panc-1) und CAFs zusammen in gleicher Anzahl (1:1) in 96 Well-Platten ausgesetzt.
- Zum Anwachsen wurden die Zellen für 24 Stunden in RPMI 1640 Medium inkubiert.
- Nach 24 Stunden wurde das Medium vom Well und Inlay entnommen und neues Medium mit entsprechendem Zusatz der Chemotherapeutika hinzugefügt. Folgende Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden verwendet:
  - Gemcitabin 1000  $\mu$ M
  - nab-Paclitaxel 50  $\mu$ M
  - nab-Paclitaxel / Gemcitabin 50  $\mu$ M / 1000  $\mu$ M
  - $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (GSI) 50  $\mu$ M
  - $\gamma$ -Sekretaseinhibitor (GSI) / Gemcitabin 50  $\mu$ M / 1000  $\mu$ M.
- Monokulturen wurden für 48 Stunden mit Therapeutika behandelt.
- Nach 48 Stunden wurde das Medium abgenommen und die XTT-Reagenz mit einer Konzentration von 0,3 mg/ml nach Herstelleranleitung hinzugefügt.
- Nach 6 Stunden Inkubationszeit der direkten Ko-Kulturen und der XTT-Reagenz wurde die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 450 nm und 650 nm gemessen.
- Die Messung der Absorbanz erfolgte entsprechend der der Monokulturen.

# Kapitel 6                    Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5-29.
2. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74:2913-2921.
3. Quante AS, Ming C, Rottmann M, Engel J, Boeck S, Heinemann V, Westphalen CB, Strauch K. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Med* 2016;5:2649-2656.
4. Li J, Wientjes MG, Au JL-S. Pancreatic Cancer: Pathobiology, Treatment Options, and Drug Delivery. *AAPS J* 2010;12:223-232.
5. Neesse A, Algül H, Tuveson DA, Gress TM. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* 2015;64:1476-1484.
6. Xie D, Xie K. Pancreatic cancer stromal biology and therapy. *Genes & Diseases* 2015;2:133-143.
7. Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor-stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *HBDP INT* 2018;17:461-472.
8. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine* 2013;369:1691-1703.
9. Cao F, Li J, Sun H, Liu S, Cui Y, Li F. HES 1 is essential for chemoresistance induced by stellate cells and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Oncology Reports* 2015;33:1883-1889.
10. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Miyoshi K, Moriyama T, Cui L, Yu J, Zhao M, Manabe T, Tanaka M. Tumor–stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Science* 2009;100:2309-2317.
11. Siegel Rebecca L., Miller Kimberly D., Jemal Ahmedin. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2016;66:7-30.

12. Anon. Krebs - Bauchspeicheldrüsenkrebs. *Zentrum Für Krebsregisterdaten 2014, Robert Koch Institut.*
13. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378:607-620.
14. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2006;20:197-209.
15. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2004;91:586-594.
16. Teague A, Lim K-H, Wang-Gillam A. Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies. *Ther Adv Med Oncol* 2015;7:68-84.
17. Spears CP, Gustavsson BG, Berne M, Frösing R, Bernstein L, Hayes AA. Mechanisms of Innate Resistance to Thymidylate Synthase Inhibition after 5-Fluorouracil. *Cancer Res* 1988;48:5894-5900.
18. Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers (Basel)* 2017;9.
19. de Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European Journal of Pharmacology* 2014;741:8-16.
20. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-2413.
21. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Oláh A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Büchler MW, Cancer for the ESG for P. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2010;304:1073-1081.

22. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB, Sinn M, Hinke A, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 2013;310:1473-1481.
23. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet J-B, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer, PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1817-1825.
24. Giordano G, Pancione M, Olivieri N, Parcesepe P, Velocci M, Di Raimo T, Coppola L, Toffoli G, D'Andrea MR. Nano albumin bound-paclitaxel in pancreatic cancer: Current evidences and future directions. *World J Gastroenterol* 2017;23:5875-5886.
25. Alvarez R, Musteanu M, Garcia-Garcia E, Lopez-Casas PP, Megias D, Guerra C, Muñoz M, Quijano Y, Cubillo A, Rodriguez-Pascual J, Plaza C, de Vicente E, Prados S, Tabernero S, Barbacid M, Lopez-Rios F, Hidalgo M. Stromal disrupting effects of nab-paclitaxel in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013;109:926-933.
26. Kim H, Samuel S, Lopez-Casas P, Grizzle W, Hidalgo M, Kovar J, Oelschlager D, Zinn K, Warram J, Buchsbaum D. SPARC-Independent Delivery of Nab-Paclitaxel without Depleting Tumor Stroma in Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts. *Mol Cancer Ther* 2016;15:680-688.
27. Hoff DDV, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, Korn RL, Desai N, Trieu V, Iglesias JL, Zhang H, Soon-Shiong P, Shi T, Rajeshkumar NV, Maitra A, Hidalgo M. Gemcitabine Plus nab-Paclitaxel Is an Active Regimen in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase I/II Trial. *JCO* 2011;29:4548-4554.
28. Rajeshkumar NV, Yabuuchi S, Pai SG, Tong Z, Hou S, Bateman S, Pierce DW, Heise C, Von Hoff DD, Maitra A, Hidalgo M. Superior therapeutic efficacy of nab-paclitaxel over cremophor-based paclitaxel in locally advanced and metastatic models of human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2016;115:442-453.
29. Neesse A, Frese KK, Chan DS, Bapiro TE, Howat WJ, Richards FM, Ellenrieder V, Jodrell DI, Tuveson DA. SPARC independent drug delivery and antitumour effects of nab-paclitaxel in genetically engineered mice. *Gut* 2014;63:974-983.

30. Hidalgo M, Plaza C, Musteanu M, Illei P, Brachmann CB, Heise C, Pierce D, Lopez-Casas PP, Menendez C, Tabernero J, Romano A, Wei X, Lopez-Rios F, Von Hoff DD. SPARC Expression Did Not Predict Efficacy of nab-Paclitaxel plus Gemcitabine or Gemcitabine Alone for Metastatic Pancreatic Cancer in an Exploratory Analysis of the Phase III MPACT Trial. *Clin Cancer Res* 2015;21:4811-4818.
31. Yardley DA. nab-Paclitaxel mechanisms of action and delivery. *Journal of Controlled Release* 2013;170:365-372.
32. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 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* 2007;25:1960-1966.
33. Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H, Chu Q, Yu S, Wu GS, Wu K. Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Letters* 2015;369:20-27.
34. Gao J, Long B, Wang Z. Role of Notch signaling pathway in pancreatic cancer. *Am J Cancer Res* 2017;7:173-186.
35. Mizuma M, Rasheed ZA, Yabuuchi S, Omura N, Campbell NR, de Wilde RF, De Oliveira E, Zhang Q, Puig O, Matsui W, Hidalgo M, Maitra A, Rajeshkumar NV. The gamma secretase inhibitor MRK-003 attenuates pancreatic cancer growth in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 2012;11:1999-2009.
36. Plentz R, Park J-S, Rhim AD, Abravanel D, Hezel AF, Sharma SV, Gurumurthy S, Deshpande V, Kenific C, Settleman J, Majumder PK, Stanger BZ, Bardeesy N. Inhibition of  $\gamma$ -Secretase Activity Inhibits Tumor Progression in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2009;136:1741-9.e6.
37. Cook N, Basu B, Smith D-M, Gopinathan A, Evans J, Steward WP, Palmer D, Propper D, Venugopal B, Hategan M, Anthony DA, Hampson LV, Nebozhyn M, Tuveson D, Farmer-Hall H, Turner H, McLeod R, Halford S, Jodrell D. A phase I trial of the  $\gamma$ -secretase inhibitor MK-0752 in combination with gemcitabine in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2018;118:793-801.

38. Zhan H, Xu J, Wu D, Wu Z, Wang L, Hu S, Zhang G. Neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Cancer Med* 2017;6:1201-1219.
39. Whatcott CJ, Han H, Posner RG, Von Hoff DD. Tumor-Stromal Interactions in Pancreatic Cancer. *Crit Rev Oncog* 2013;18:135-151.
40. Rasheed ZA, Matsui W, Maitra A. Pathology of pancreatic stroma in PDAC. In: Grippo PJ, Munshi HG, eds. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network; 2012.
41. Castells M, Thibault B, Delord J-P, Couderc B. Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. *Int J Mol Sci* 2012;13:9545-9571.
42. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;21:418-429.
43. Hingorani SR, Zheng L, Bullock AJ, Seery TE, Harris WP, Sigal DS, Braithe F, Ritch PS, Zalupski MM, Bahary N, Oberstein PE, Wang-Gillam A, Wu W, Chondros D, Jiang P, Khelifa S, Pu J, Aldrich C, Hendifar AE. HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2018;36:359-366.
44. Erickson LA, Highsmith WE, Fei P, Zhang J. Targeting the hypoxia pathway to treat pancreatic cancer. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:2029-2031.
45. Yuen A, Díaz B. The impact of hypoxia in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Hypoxia (Auckl)* 2014;2:91-106.
46. Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Hirota M, Shimosegawa T. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G709-717.
47. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor Oxygenation Predicts for the Likelihood of Distant Metastases in Human Soft Tissue Sarcoma. *Cancer Res* 1996;56:941-943.

48. Chang Q, Jurisica I, Do T, Hedley DW. Hypoxia Predicts Aggressive Growth and Spontaneous Metastasis Formation from Orthotopically Grown Primary Xenografts of Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 2011;71:3110-3120.
49. Dauer P, Nomura A, Saluja A, Banerjee S. Microenvironment in determining chemoresistance in pancreatic cancer: Neighborhood matters. *Pancreatology* 2017;17:7-12.
50. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-1037.
51. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* 2007;1:313-323.
52. Hamada S, Shimosegawa T. Pancreatic cancer stem cell and mesenchymal stem cell. In: Grippo PJ, Munshi HG, eds. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum (India): Transworld Research Network; 2012.
53. Bhagwandin VJ, Bishop JM, Wright WE, Shay JW. The Metastatic Potential and Chemoresistance of Human Pancreatic Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 2016;11:e0148807.
54. Ischenko I, Seeliger H, Kleespies A, Angele MK, Eichhorn ME, Jauch K-W, Bruns CJ. Pancreatic cancer stem cells: new understanding of tumorigenesis, clinical implications. *Langenbecks Arch Surg* 2010;395:1-10.
55. Koury J, Zhong L, Hao J. Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells Int* 2017;2017.
56. Palagani V, Khatib ME, Kossatz U, Bozko P, Müller MR, Manns MP, Krech T, Malek NP, Plentz RR. Epithelial Mesenchymal Transition and Pancreatic Tumor Initiating CD44+/EpCAM+ Cells Are Inhibited by  $\gamma$ -Secretase Inhibitor IX. *PLOS ONE* 2012;7:e46514.
57. Abel EV, Kim EJ, Wu J, Hynes M, Bednar F, Proctor E, Wang L, Dziubinski ML, Simeone DM. The Notch Pathway Is Important in Maintaining the Cancer Stem Cell Population in Pancreatic Cancer. *PLoS One* 2014;9.
58. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol* 2016;22:2678-2700.

59. Zhang H, Wu H, Guan J, Wang L, Ren X, Shi X, Liang Z, Liu T. Paracrine SDF-1 $\alpha$  signaling mediates the effects of PSCs on GEM chemoresistance through an IL-6 autocrine loop in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 2014;6:3085-3097.
60. Bachem MG, Schneider E, Groß H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998;115:421-432.
61. Nagathihalli NS, Castellanos JA, VanSaun MN, Dai X, Ambrose M, Guo Q, Xiong Y, Merchant NB, Nagathihalli NS, Castellanos JA, VanSaun MN, Dai X, Ambrose M, Guo Q, Xiong Y, Merchant NB. Pancreatic stellate cell secreted IL-6 stimulates STAT3 dependent invasiveness of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer cells. *Oncotarget* 2016;7:65982-65992.
62. Tang D, Wang D, Yuan Z, Xue X, Zhang Y, An Y, Chen J, Tu M, Lu Z, Wei J, Jiang K, Miao Y. Persistent activation of pancreatic stellate cells creates a microenvironment favorable for the malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2013;132:993-1003.
63. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1186-1197.
64. Bachem MG, Zhou S, Buck K, Schneiderhan W, Siech M. Pancreatic stellate cells—role in pancreas cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393:891-900.
65. Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, Apte M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 2002;50:535-541.
66. Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas* 2004;28:38-44.
67. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson T, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, Acosta AD, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses H, Weaver V, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R. Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Diminished Survival. *Cancer Cell* 2014;25:719-734.

68. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature Medicine* 2013;19:1047-1053.
69. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, Dekleva EN, Saunders T, Becerra CP, Tattersall IW, Westphalen CB, Kitajewski J, Fernandez-Barrena MG, Fernandez-Zapico ME, Iacobuzio-Donahue C, Olive KP, Stanger BZ. Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:735-747.
70. Carr RM, Fernandez-Zapico ME. Pancreatic cancer microenvironment, to target or not to target? *EMBO Mol Med* 2016;8:80-82.
71. Bever KM, Sugar EA, Bigelow E, Sharma R, Laheru D, Wolfgang CL, Jaffee EM, Anders RA, De Jesus-Acosta A, Zheng L. The prognostic value of stroma in pancreatic cancer in patients receiving adjuvant therapy. *HPB* 2015;17:292-298.
72. Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio IIC, Hwang C-I, Tiriack H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, Tuveson DA. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2017;214:579-596.
73. Weizman N, Krelin Y, Shabtay-Orbach A, Amit M, Binenbaum Y, Wong RJ, Gil Z. Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* 2014;33:3812-3819.
74. Chang JH, Jiang Y, Pillarisetty VG. Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application. *Medicine (Baltimore)* 2016;95.
75. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* 1975;15:741-747.
76. Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, Shimano T, Penetrante R, Sanders WH, Berjian R, Douglass HO, Martin EW, Chu TM. Human pancreatic adenocarcinoma: In vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 1982;18:24-34.
77. Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* 2010;39:425-435.

78. Hesler RA, Huang JJ, Starr MD, Treboschi VM, Bernanke AG, Nixon AB, McCall SJ, White RR, Blobe GC. TGF- $\beta$ -induced stromal CYR61 promotes resistance to gemcitabine in pancreatic ductal adenocarcinoma through downregulation of the nucleoside transporters hENT1 and hCNT3. *Carcinogenesis* 2016;1041-1051.
79. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. Cancer-Associated Stromal Fibroblasts Promote Pancreatic Tumor Progression. *Cancer Res* 2008;68:918-926.
80. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse M-L, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 $\beta$ . *Cancer Res* 2004;64:1331-1337.
81. Xu R, Richards FM, Lin Y, Jodrell DI. Abstract 3739: An in vitro fluorescence-based co-culture model identifies tumour microenvironment-mediated chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2014;74:3739-3739.
82. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV. Pancreatic Stellate Cells: Partners in Crime with Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res* 2008;68:2085-2093.
83. Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;403:380-384.
84. Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, Kobiki K, Nakamura M, Yamaguchi Y, Kuribayashi F. Evaluation of pancreatic cancer cell migration with multiple parameters in vitro by using an optical real-time cell mobility assay device. *BMC Cancer* 2017;17.
85. Kolenda T, Kapałczyńska M, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* 2016.
86. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer K-L, Baldus SE, Huckenbeck W, Piekorz RP, Knoefel WT, Krieg A, Stoecklein NH. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLOS ONE* 2013;8:e59689.

87. Longati P, Jia X, Eimer J, Wagman A, Witt M-R, Rehnmark S, Verbeke C, Toftgård R, Löhr M, Heuchel RL. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer* 2013;13:95.
88. Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. *Establishment of Primary Cell Lines in Pancreatic Cancer*. IntechOpen; 2012.
89. Rückert F, Aust D, Böhme I, Werner K, Brandt A, Diamandis EP, Krautz C, Hering S, Saeger H-D, Grützmann R, Pilarsky C. Five Primary Human Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines Established by the Outgrowth Method. *Journal of Surgical Research* 2012;172:29-39.
90. Kobari M, Hisano H, Matsuno S, Sato T, Kan M, Tachibana T. Establishment of six human pancreatic cancer cell lines and their sensitivities to anti-tumor drugs. *Tohoku J Exp Med* 1986;150:231-248.
91. Cheung PF, Yip CW, Ng LW, Lo KW, Wong N, Choy KW, Chow C, Chan KF, Cheung TT, Poon RT, Fan ST, Cheung ST. Establishment and characterization of a novel primary hepatocellular carcinoma cell line with metastatic ability in vivo. *Cancer Cell International* 2014;14:103.
92. Kato M, Shimada Y, Tanaka H, Hosotani R, Ohshio G, Ishizaki K, Imamura M. Characterization of six cell lines established from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer* 1999;85:832-840.
93. Jesnowski R, Fürst D, Ringel J, Chen Y, Schrödel A, Kleeff J, Kolb A, Schareck WD, Löhr M. Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 2005;85:1276-1291.
94. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas. *Front Physiol* 2012;3:344.
95. Pham K, Delitto D, Knowlton AE, Hartlage ER, Madhavan R, Gonzalo DH, Thomas RM, Behrns KE, George TJ, Hughes SJ, Wallet SM, Liu C, Trevino JG. Isolation of Pancreatic Cancer Cells from a Patient-Derived Xenograft Model Allows for Practical Expansion and Preserved Heterogeneity in Culture. *Am J Pathol* 2016;186:1537-1546.
96. Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 2005;128:907-921.

97. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grünert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 2001;281:C532-C543.
98. Sinn M, Denkert C, Striefler JK, Pelzer U, Stieler JM, Bahra M, Lohneis P, Dörken B, Oettle H, Riess H, Sinn BV.  $\alpha$ -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study. *Br J Cancer* 2014;111:1917-1923.
99. Torphy RJ, Volmar KE, Naim R, Cader SR, Johansen JS, Hollingsworth MA, Collisson EA, Yeh JJ. Quantification of tumor stroma as a biomarker in pancreatic adenocarcinoma. *JCO* 2015;33:4021-4021.
100. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress TM, Habisch H-J, Hwang RF, Jaster R, Kleeff J, Klöppel G, Kordes C, Logsdon CD, Masamune A, Michalski CW, Oh J, Phillips PA, Pinzani M, Reiser-Erkan C, Tsukamoto H, Wilson J. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 2012;61:172-178.
101. Masamune A, Hamada S, Kikuta K, Takikawa T, Miura S, Nakano E, Shimosegawa T. The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2013;48:602-609.
102. Charo C, Holla V, Arumugam T, Hwang R, Yang P, Dubois RN, Menter DG, Logsdon CD, Ramachandran V. PGE2 Regulates Pancreatic Stellate Cell Activity Via The EP4 Receptor. *Pancreas* 2013;42:467-474.
103. Karnevi E, Rosendahl AH, Hilmersson KS, Saleem MA, Andersson R. Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: Adding a third dimension in vitro. *Experimental Cell Research* 2016;346:206-215.
104. Haqq J, Howells LM, Garcea G, Dennison AR. Targeting pancreatic cancer using a combination of gemcitabine with the omega-3 polyunsaturated fatty acid emulsion, Lipidem™. *Mol Nutr Food Res* 2016;60:1437-1447.
105. Haas SL, Haas SL, Fitzner B, Haas SL, Fitzner B, Jaster R, Wiercinska E, Gaitantzi H, Jesenowski R, Löhr J-M, Singer MV, Dooley S, Breitkopf K. Transforming growth factor- $\beta$

induces nerve growth factor expression in pancreatic stellate cells by activation of the ALK-5 pathway. *Growth Factors* 2009;27:289-299.

106. Suklabaidya S, Dash P, Das B, Suresh V, Sasmal PK, Senapati S. Experimental models of pancreatic cancer desmoplasia. *Laboratory Investigation* 2018;98:27-40.

107. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;25:585-621.

108. Kalinina T, Güngör C, Thielges S, Möller-Krull M, Murga Penas EM, Wicklein D, Streichert T, Schumacher U, Kalinin V, Simon R, Otto B, Dierlamm J, Schwarzenbach H, Effenberger KE, Bockhorn M, Izbicki JR, Yekebas EF. Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer* 2010;10:295.

109. Boj SF, Hwang C-I, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvisé M, Tiriác H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Öhlund D, Handy-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FHM, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RGJ, Clevers H, Tuveson DA. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell* 2015;160:324-338.

110. José A, Rovira-Rigau M, Luna J, Giménez-Alejandre M, Vaquero E, García de la Torre B, Andreu D, Alemany R, Fillat C. A genetic fiber modification to achieve matrix-metalloprotease-activated infectivity of oncolytic adenovirus. *J Control Release* 2014;192:148-156.

111. Asghar W, El Assal R, Shafiee H, Pitteri S, Paulmurugan R, Demirci U. Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Materials Today* 2015;18:539-553.

112. Krempley BD, Yu KH. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese Clinical Oncology* 2017;6.

113. Huanwen W, Zhiyong L, Xiaohua S, Xinyu R, Kai W, Tonghua L. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Molecular Cancer* 2009;8:125.

114. McCarroll JA, Naim S, Sharbeen G, Russia N, Lee J, Kavallaris M, Goldstein D, Phillips PA. Role of pancreatic stellate cells in chemoresistance in pancreatic cancer. *Front Physiol* 2014;5:141.
115. Fryer RA, Barlett B, Galustian C, Dalgleish AG. Mechanisms Underlying Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer and Sensitisation by the iMiD™ Lenalidomide. *Anticancer Res* 2011;31:3747-3756.
116. Jiang Y, DiVittore NA, Kaiser JM, Shanmugavelandy SS, Fritz JL, Heakal Y, Tagaram HRS, Cheng H, Cabot MC, Staveley-O'Carroll KF, Tran MA, Fox TE, Barth BM, Kester M. Combinatorial therapies improve the therapeutic efficacy of nanoliposomal ceramide for pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;12:574-585.
117. Zhao G, Cui J, Zhang J-G, Qin Q, Chen Q, Yin T, Deng S-C, Liu Y, Liu L, Wang B, Tian K, Wang G-B, Wang C-Y. SIRT1 RNAi knockdown induces apoptosis and senescence, inhibits invasion and enhances chemosensitivity in pancreatic cancer cells. *Gene Ther* 2011;18:920-928.
118. Johannes Wicht LM. The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Enhances the Antitumoral Activity of Gemcitabine in Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Journal of Integrative Oncology* 2014:1627-1635.
119. Du X, Zhao Y, Zhang T, Zhou L, Chen G, Wang T, You L, Shu H. Alteration of the Intrinsic Apoptosis Pathway Is Involved in Notch-induced Chemoresistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Archives of Medical Research* 2014;45:15-20.
120. Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS, Schwarz MA, Schwarz RE. Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2013;34:2361-2369.
121. Veltkamp SA, Beijnen JH, Schellens JHM. Prolonged Versus Standard Gemcitabine Infusion: Translation of Molecular Pharmacology to New Treatment Strategy. *The Oncologist* 2008;13:261-276.
122. Gao Y, Zhang Z, Li K, Gong L, Yang Q, Huang X, Hong C, Ding M, Yang H. Linc-DYNC2H1-4 promotes EMT and CSC phenotypes by acting as a sponge of miR-145 in pancreatic cancer cells. *Cell Death & Disease* 2017;8:e2924.
123. Richards KE, Zeleniak AE, Fishel ML, Wu J, Littlepage LE, Hill R. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2017;36:1770-1778.

124. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, DeNicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Rückert F, Grützmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J, Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J, Tuveson DA. Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* 2009;324:1457-1461.
125. Kunzmann V, Ramanathan RK, Goldstein D, Liu H, Ferrara S, Lu B, Renschler MF, Von Hoff DD. Tumor Reduction in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer Lesions With nab-Paclitaxel and Gemcitabine. *Pancreas* 2017;46:203-208.
126. Kang Y, Roife D, Lee Y, Lv H, Suzuki R, Ling J, Perez MVR, Li X, Dai B, Pratt M, Truty MJ, Chatterjee D, Wang H, Thomas RM, Wang Y, Koay EJ, Chiao PJ, Katz MH, Fleming JB. Transforming Growth Factor- $\beta$  Limits Secretion of Lumican by Activated Stellate Cells within Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors. *Clin Cancer Res* 2016:clincanres.2780.2015.
127. Ji X, Ji J, Shan F, Zhang Y, Chen Y, Lu X. Cancer-associated fibroblasts from NSCLC promote the radioresistance in lung cancer cell lines. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:7002-7008.
128. Hessmann E, Patzak M, Klein L, Chen N, Kari V, Ramu I, Bapiro T, Frese K, Gopinathan A, Richards F, Jodrell D, Verbeke C, Li X, Heuchel R, Löhr M, Johnsen S, Gress T, Ellenrieder V, Neesse A. Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. 2017.
129. Polireddy K, Chen Q. Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment. *J Cancer* 2016;7:1497-1514.
130. Zhou Q, Zhou Y, Liu X, Shen Y. GDC-0449 improves the antitumor activity of nano-doxorubicin in pancreatic cancer in a fibroblast-enriched microenvironment. *Sci Rep* 2017;7.
131. Thayer SP, Pasca di Magliano M, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Ping Qi Y, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-856.
132. Bahra M, Kamphues C, Boas-Knoop S, Lippert S, Esendik U, Schüller U, Hartmann W, Waha A, Neuhaus P, Heppner F, Pietsch T, Koch A. Combination of hedgehog signaling blockage and chemotherapy leads to tumor reduction in pancreatic adenocarcinomas. *Pancreas* 2012;41:222-229.

133. Wall I, Schmidt-Wolf IGH. Effect of Wnt Inhibitors in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res* 2014;34:5375-5380.
134. Liu Y, Li X, Zhu S, Zhang J–., Yang M, Qin Q, Deng S–., Wang B, Tian K, Liu L, Niu Y, Wang C–., Zhao G. Ectopic expression of miR-494 inhibited the proliferation, invasion and chemoresistance of pancreatic cancer by regulating SIRT1 and c-Myc. *Gene Ther* 2015.
135. Riedlinger D, Bahra M, Boas-Knoop S, Lippert S, Bradtmöller M, Guse K, Seehofer D, Bova R, Sauer IM, Neuhaus P, Koch A, Kamphues C. Hedgehog pathway as a potential treatment target in human cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014;21:607-615.
136. Kaur G, Dufour JM. Cell lines. *Spermatogenesis* 2012;2:1-5.
137. Xu R, Richards FM, Lin Y, Jodrell DI. Abstract 3739: An in vitro fluorescence-based co-culture model identifies tumour microenvironment-mediated chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2014;74:3739-3739.
138. Wang LM, Silva MA, D’Costa Z, Bockelmann R, Soonawalla Z, Liu S, O’Neill E, Mukherjee S, McKenna WG, Muschel R, Fokas E. The prognostic role of desmoplastic stroma in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016;7:4183-4194.
139. Froeling FEM, Mirza TA, Feakins RM, Seedhar A, Elia G, Hart IR, Kocher HM. Organotypic Culture Model of Pancreatic Cancer Demonstrates that Stromal Cells Modulate E-Cadherin,  $\beta$ -Catenin, and Ezrin Expression in Tumor Cells. *The American Journal of Pathology* 2009;175:636-648.
140. Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *PNAS* 1992;89:9064-9068.

# Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christopher Neumann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Interaktion zwischen Tumorzellen und tumorassoziierten Fibroblasten und deren Einfluss auf die Therapie des Pankreaskarzinoms selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Christopher Neumann hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikationen:

C. C.M. Neumann, E. von Hörschelmann, A. Reutzel-Selke, E. Seidel, I.M. Sauer, J. Pratschke, M. Bahra, R.B. Schmuck. Tumor–stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2018, 17(5): 461-472

Beitrag im Einzelnen: Die Veröffentlichung (Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, und Discussion) wurde von mir verfasst. Die Experimente der Methodenteile 2.1 bis 2.8 und 2.10 wurden von mir durchgeführt. Bei der Isolation der primären CAFs in Abschnitt 2.3 wurde ich von Anja Schirmeier und bei der Statistischen Auswertung in Abschnitt 2.10 von Dr. Anja Reutzel-Selke unterstützt. Prof. Marcus Bahra, Dr. Rosa Schmuck und Dr. Anja Reutzel-Selke korrigierten die Veröffentlichung.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

**C. C.M. Neumann**, E. von Hörschelmann, A. Reutzel-Selke, E. Seidel, I.M. Sauer, J. Pratschke, M. Bahra, R.B. Schmuck. Tumor–stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2018, 17(5): 461-472

Rosa B. Schmuck, Cynthia V. de Carvalho-Fischer, **Christopher Neumann**, Johann Pratschke, Marcus Bahra. Distal bile duct carcinomas and pancreatic ductal adenocarcinomas: postulating a common tumor entity. *Cancer Medicine*, 2016; 5(1): 88–99

Elisabeth Seidel, Cynthia de Carvalho Fischer, **Christopher Neumann**, Anja Reutzel-Selke, Andreas Andreou, Joseph Gassner, Julia Gogolok, Peter Tang, Anja Schirmeier, Fritz Klein, Igor M. Sauer, Johann Pratschke, Marcus Bahra, Rosa B. Schmuck. Characterization of the Stem Cell Fraction in Pancreatobiliary Carcinomas: The Notch Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Target. *Journal of Cancer Therapy*, 2018, 9(6): 480-502

**C.C.M. Neumann**, C. Batchelor-McAuley, K. Tschulik, H. S. Toh, P. Shumbula, J. Pillay, R. Tshikhudo, R.G. Compton. The Surface Energy of Single Nanoparticles Probed via Anodic Stripping Voltammetry. *ChemElectroChem*, 2014, 1, 87 – 89

C. Batchelor-McAuley, K. Tschulik, **C. C.M. Neumann**, E. Laborda, R.G. Compton. Why are Silver Nanoparticles More Toxic Than Bulk Silver? Towards Understanding the Dissolution and Toxicity of Silver Nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9, 2014, 1132 – 1138

E. Laborda, **C.C.M. Neumann**, Y. Wang, K. R. Ward, Á. Molina, R.G. Compton.

Heterogeneous Catalysis of Multiple Electron Transfer Reactions at Nanoparticle-Modified Electrodes. *ChemElectroChem*, 2014, 1(5), 909-916

**C.C.M. Neumann**, E. Laborda, K. Tschulik, K.R. Ward, R.G. Compton. Performance of silver nanoparticles in the catalysis of the oxygen reduction reaction in neutral media: Efficiency limitation due to hydrogen peroxide escape. *Nano Research*, 2013, 6(7), 511 – 524

# Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Marcus Bahra, meinem Doktorvater, für die kompetente und gute Betreuung und für die fachlichen Diskussionen, die zu dem Ergebnis dieser Arbeit geführt haben. Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Rosa Schmuck, die mich während meiner Promotionsarbeit immer unterstützte und unmittelbar zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die große Hilfe hinsichtlich der Gewinnung der primären Zellkulturen und die vielen lustigen Momente im Labor möchte ich mich ganz herzlich bei Anja Schirmeier bedanken. Ein Dank gilt auch den Operateuren der pankreato-biliären Chirurgie, ohne die die Gewinnung der Primärkulturen nicht möglich gewesen wäre. Zudem möchte ich mich für die Begutachtung der in dieser Arbeit verwendeten Tumorresektate bei den Pathologen des Virchow-Klinikums bedanken. Ich danke auch Dr. Anja Reutzel-Selke für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Dem Forschungsteam von Prof. Dr. Bahra danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, insbesondere Ellen von Hörschelmann, deren Ergebnisse zusammen mit meinen im Journal *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* veröffentlicht wurden. Zudem möchte mich herzlichst bei Cynthia de Carvalho-Fischer und Elisabeth Seidel für die Einarbeitung zu Beginn meines Forschungsprojektes und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben. Insbesondere meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben, nach meinem Chemiestudium in Großbritannien Medizin in Deutschland zu studieren.