

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum  
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg



# **Charakterisierung der Interaktion zwischen Makrophagen und Pankreaskarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Peter Benjamin Sattler**  
aus Marburg

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
10.04.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Prof. Dr. M. Buchholz
1. Korreferent:	Prof. Dr. A. Burchert
2. Korreferent:	PD Dr. S. Müller-Brüsselbach



---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1	Metastasierung.....	4
1.1.2	Genetik und Molekularbiologie.....	6
1.2	Monozyten und Makrophagen.....	8
1.3	Zytokine.....	9
1.4	TAMs und deren Wirkung.....	12
1.5	micro-RNA .....	17
1.6	Mikrovesikel und Exosomen .....	21
<b>2</b>	<b>Zielsetzung und Fragestellung.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1	Material .....	26
3.1.1	Chemikalien.....	26
3.1.2	Laborgeräte.....	26
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.4	Buffy Coat .....	28
3.1.5	Zelllinien.....	28
3.1.6	Zytokine.....	28
3.1.7	Primer .....	29
3.1.8	miRNAs.....	29
3.1.9	Zellkulturmedien und Zusätze.....	30
3.1.10	Erythrozytenlyse.....	30
3.1.11	MACS-Puffer .....	30
3.1.12	Reagenzsysteme (Kits) .....	31
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Monozytenisolation .....	34
3.2.2	CD14+ Isolation .....	35
3.2.3	Polarisation als Zeitversuch.....	37
3.2.4	Polarisationsversuche .....	38
3.2.5	Transfektion von Makrophagen mit mi-RNA (AMAXA) .....	41

---

3.2.6	Co-kultur mit PKH67-gefärbten Panc1-Zellen.....	42
3.2.7	Co-Kultur von polarisierten Makrophagen mit Panc1-Zellen.....	45
3.2.8	Co-Kultur mit miRNA-transfizierten Panc1-Zellen.....	47
3.2.9	Weitere experimentelle Methoden .....	48
3.2.10	Statistische Auswertung.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1	Kultivierung und Polarisation von Monozyten .....	54
4.2	Polarisation als Zeitversuch.....	56
4.3	Polarisationsversuche .....	57
4.4	Transfektion mit miRNA mit AMAXA .....	63
4.5	Cokultur mit PKH67-gefärbten Panc1-Zellen.....	64
4.6	Cokultur von polarisierten Makrophagen mit Panc1-Zellen.....	67
4.7	Cokultur mit miRNA-transfizierten Panc1-Zellen .....	71
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>74</b>
5.1	Kultivierung von Monozyten und Makrophagen .....	74
5.2.	Polarisation von Makrophagen.....	76
5.2.1	Polarisation durch Zytokine.....	76
5.2.2	Polarisation durch Überstände.....	77
5.2.3	Polarisation durch Karzinomzellen .....	79
5.2.4	Polarisation durch transfizierte Karzinomzellen .....	80
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>104</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	104
9.2	Tabellenverzeichnis .....	104
9.3	Abkürzungen .....	106

9.4	Verzeichnis akademischer Lehrer .....	108
9.5	Danksagung .....	109

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten aller malignen Tumorentitäten des Menschen und stellt unter diesen aktuell die vierthäufigste Todesursache dar (*Stathis et al. 2010*). Nach dem Kolon- und Magenkarzinom ist es der dritthäufigste Tumor im Gastrointestinaltrakt. In den meisten Fällen handelt es sich um Adenokarzinome, die vorwiegend im Pankreaskopfbereich lokalisiert sind (70% d.F.) und aus dem Epithel der kleinen Pankreasgänge hervorgehen (90% d.F.) Seltener findet man Karzinome, die vom Azinusepithel ausgehen (*Ammerpohl et al. 2007, Mihaljevic et al. 2010*).

### Epidemiologie

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist seit Jahren stetig ansteigend (*Vincent et al 2011.*). In Deutschland erkranken jährlich mehr als 7.390 Männer und 7.570 Frauen. Es stellt damit bei Männern mit 3,0 % die neunthäufigste und bei Frauen mit 3,4 % die siebthäufigste Tumorentität dar, liegt aufgrund der schlechten Prognose jedoch mit 6,3 % bei Männern und 7,5 % bei Frauen sogar auf Rang 4 der häufigsten Krebstodesursachen bei beiden Geschlechtern. Männer sind durchschnittlich im Alter von 70 Jahren, Frauen erst im Alter von 76 Jahren betroffen (*Siegel et al, 2014*).

### Ätiologie und Risikofaktoren

Einer der wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist der Zigarettenrauch: Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein 2,5- bis 3,6-fach erhöhtes Risiko zu erkranken. Daneben scheinen auch hohes Alter, männliches Geschlecht, eine familiäre Belastung, Diabetes mellitus, eine Cholezystolithiasis und das Vorliegen einer chronische Pankreatitis mit einem erhöhten Risiko einherzugehen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass chronischer Alkoholkonsum ebenfalls die Entstehung des Pankreaskarzinoms begünstigt (*Li et al. 2004*).

### Symptomatik

Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist das Fehlen von spezifischen Frühsymptomen, was vor allem in den anatomischen Begebenheiten begründet liegt: In der Regio epigastrica gelegen hat das Pankreas kaum direkte Kontakte zu anderen Organen des Oberbauchs (Abb.1). Aufgrund dessen kann das Karzinom anfänglich unentdeckt wachsen und sich ungehindert im Gewebe ausbreiten. Dies führt schließlich zum Auftreten von unspezifischen Beschwerden, die anfänglich jenen einer akuten oder chronischen Pankreatitis ähneln können: Appetitverlust, Oberbauchschmerzen, Übelkeit und ungewollter Gewichtsverlust. Auch ein im Zuge des Tumorwachstums und der dadurch hervorgerufenen Gewebedestruktion auftretender Anstieg der Pankreatitismarker (Lipase, Amylase) kann eine Pankreatitis imitieren und den klinisch tätigen Arzt von der vorliegenden Tumorerkrankung ablenken. Lang anhaltende, therapieresistente Rückenschmerzen sollten vor allem beim Vorliegen von Risikofaktoren immer differentialdiagnostisch an ein Pankreaskarzinom denken lassen. Ein typisches, jedoch nur selten vorkommendes (< 25% d.F.) Frühsymptom kann auch ein schmerzloser Ikterus sein, welcher entsteht, wenn die Gallengänge (Ductus choledochus) durch die stetig wachsende Tumormasse komprimiert und verschlossen werden. Dies bezeichnet man in Kombination mit einer „prall elastisch“ tastbaren Gallenblase als sog. Courvoisier-Zeichen. Seltener kann es auch zu rezidivierenden Thrombosen (Thrombophlebitis migrans) oder zum Neuauftreten eines Diabetes mellitus kommen (Alexiou et al. 2014, Thayalasekaran et al. 2009, De Souza et al. 2014).

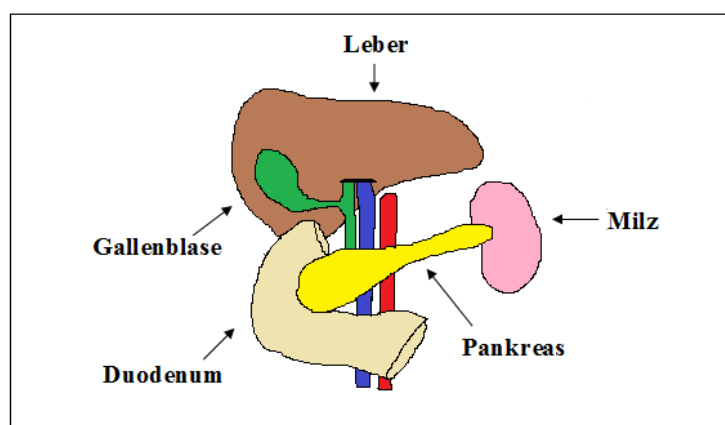


Abb. 1. Anatomische Lage des Pankreas: Das Pankreas liegt in Höhe des 1. bis 3. Lendenwirbelkörpers querverlaufend im Oberbauch. Das Caput pancreatis reicht bis an das Duodenum heran, die Cauda pancreatis kann sich bis zur Milz erstrecken.

### Diagnostik

Das Pankreaskarzinom wird meist nur zufällig bei der Abklärung unklarer Beschwerden entdeckt. Wird der Verdacht auf das Vorhandensein eines solchen Karzinoms gestellt, so werden weitere diagnostische Schritte eingeleitet, um die Verdachtsdiagnose zu bestätigen. Hierzu zählen eine ausführliche Anamnese und eine körperliche Untersuchung, Laboruntersuchungen, (Endo-) Sonographie und die Durchführung verschiedener MRT- / CT- Verfahren. Als Goldstandard hat sich die Endosonographie und das „one stop-shop“ MRT herausgestellt, sie bieten eine Trefferquote von über 90%. Mit der Endosonographie ist es sogar möglich Tumore mit einer Größe ab 0,5 cm zu detektieren. Falls sich die Verdachtsdiagnose bestätigt, wird das „Staging“ durchgeführt, um die Größe und genaue Lokalisation des Tumorgewebes, sowie dessen Ausbreitung in andere Gewebe festzustellen. Das Karzinom wird beruhend auf den erhobenen Informationen anhand des TNM-Systems eingeteilt. Hierzu stehen weitere Untersuchungsverfahren zur Verfügung, wie die ERCP, PET-CT, Röntgen-Untersuchungen, Szintigraphie und die Bestimmung verschiedener Tumormarker (z.B. CA-19-9) zur Beurteilung des weiteren Verlaufs zur Verfügung. Die Notwendigkeit einer histologischen Sicherung sollte genau abgewogen werden: Durch die hierfür notwendige Feinnadelbiopsie besteht die Gefahr der Metastasierung in den Stichkanal. Bei potentiell kurativ resektablen Karzinomen sollte hiervon abgesehen werden und stattdessen direkt eine explorative Laparotomie durchgeführt werden (Morgan et al. 2010).

### Therapie

Die Operation und komplette Entfernung der Tumormasse stellt heutzutage die einzig verfügbare kurative Therapiemaßnahme dar. Aufgrund der fehlenden Frühsymptomatik und der schnellen Infiltration in umliegende Gewebe befindet sich ein Großteil der betroffenen Patienten bei Diagnosestellung jedoch schon in einem fortgeschrittenen Stadium, in dem ein solcher kurativer Therapieansatz nicht mehr möglich ist (*Herreros-Villanueva et al. 2012*). Trotz adäquater, leitliniengerechter Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit in diesen Fällen in der Regel weniger als 6 Monate (*Ying et al. 2012*). Die chemotherapeutische Intervention mit dem Pyrimidinanalogon Gemcitabine ist bei fortgeschrittenen, inoperablen Fällen auch heutzutage (noch) das Mittel der ersten Wahl als palliativer Therapieansatz (*Burris et al. 1997, Warsame 2012*).

### Prognose

Obwohl sowohl die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms, als auch die Mechanismen dessen Metastasierung immer besser verstanden werden, hat sich die Überlebenszeit beim duktalem Pankreaskarzinom (PDAC) im Gegensatz zu anderen Karzinomen (z.B. Mamma-, Bronchial-, Colorektalkarzinomen) in den letzten Jahren nicht wesentlich verändert (*Winter et al. 2012*). Die Erkrankung geht weiterhin mit einer äußerst schlechten Prognose einher: Weniger als 5% der betroffenen Patienten leben nach Diagnosestellung noch länger als 5 Jahre. (*Hidalgo et al. 2010*). Dies hängt vor allem mit einer schwierigen und nach wie vor sehr schlechten Diagnostizierbarkeit zusammen: Nur 10-15 % der Patienten sind bei Diagnosestellung noch operabel und haben die Chance auf eine kurative Therapie (*Neoptolemos et al. 2011*).

#### **1.1.1 Metastasierung**

Nicht nur beim Pankreaskarzinom, sondern bei den meisten invasiven Tumorerkrankungen spielt die Metastasierung des Primärtumors für dessen weitere Prognose eine wichtige Rolle. 90% der Todesfälle durch maligne Tumorerkrankungen resultieren aus deren Metastasierung in andere Gewebe (*Nguyen et al. 2007*). Man unterscheidet generell eine lymphogene von der hämatogenen Metastasierung. Das Pankreaskarzinom weist eine hohe Metastasierungstendenz auf: Schon sehr früh finden sich erste Metastasen in den regionalen Lymphknoten, bald darauf kommt es auch zu ersten Absiedlungen in fernen Geweben, vorwiegend in der Leber oder der Lunge. Die Mechanismen, welche zur Metastasierung eines soliden Tumors führen, sind bis dato nur schlecht verstanden (*Hanahan et al. 2012*). Heutzutage geht man davon aus, dass die erfolgreiche (Fern-)Metastasierung eine komplexe Abfolge verschiedener Prozesse ist, die nacheinander durchlaufen werden müssen (*Nguyen et al. 2009*).

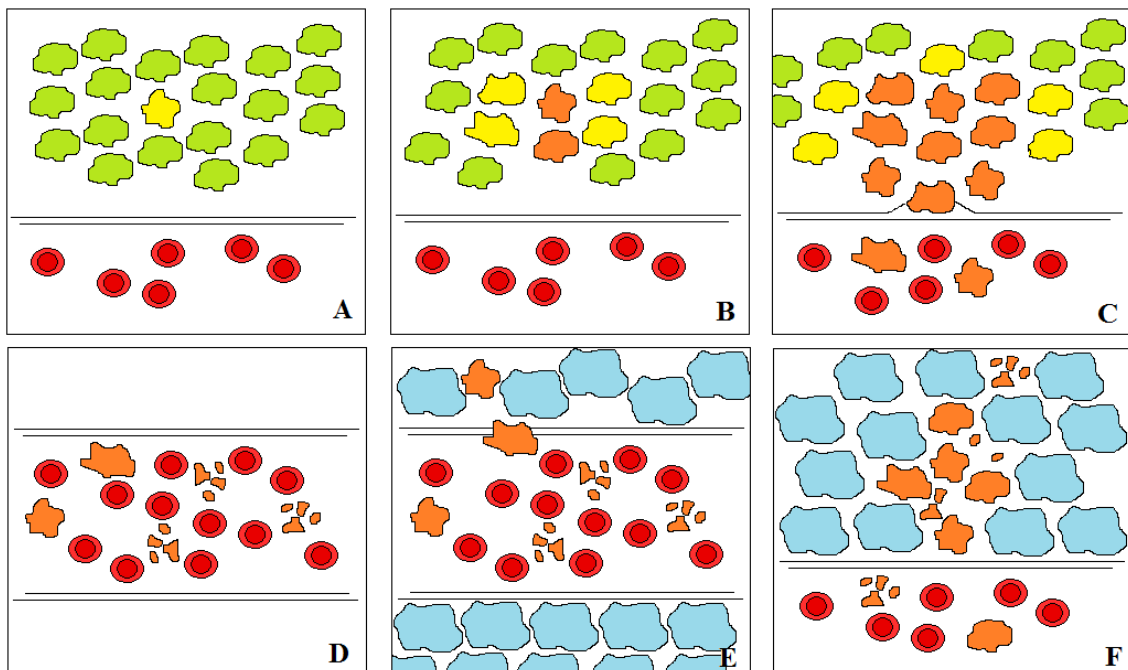


Abb.2. Mechanismus der Metastasierung: Entstehung maligner Zellen (A) und lokale Vermehrung (B). Einwachsen des Primärtumors in ein Blutgefäß und Ausschwemmung von Tumorzellen in den Blutkreislauf (C). Während des Transportes im Gefäßsystem kommt es bei einem Teil der ausgeschwemmten Zellen zum Untergang (D). Ansiedlung von Tumorzellen in einem anderen Gewebe nach Austritt aus Blutgefäßsystem (E). Weitere Teilung und Vermehrung in diesem Gewebe als Metastase (F).

Weiterführende Forschungen sind hier unbedingt notwendig, um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen und vielleicht sogar Möglichkeiten therapeutischer Interventionen aufzudecken und nutzen zu können. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas erweist sich hierbei als ein lohnendes Forschungsobjekt. Es wird in seiner Genetik und Molekularbiologie bereits besser verstanden, als wir dies über andere Tumorentitäten sagen können (Maitra et al. 2008). Morphologische und genetische Untersuchungen legen nahe, dass das Pankreaskarzinom aus definierten Vorläuferläsionen (sog. "pancreatic intraepithelial neoplasias", kurz "PanINs") entsteht, deren Molekularbiologie bereits gut untersucht wurde (Matthaei et al. 2011). Weitergehend ist die Metastasierung beim Pankreaskarzinom im Vergleich zu vielen anderen Tumorentitäten ein sehr häufig beschriebenes Phänomen: Etwa 90% der Patienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung Metastasen (Yachida et al. 2010). Zuletzt haben viele Patienten mit metastasierten Pankreaskarzinom aufgrund der späten Diagnosestellung und der daraus resultierenden Inoperabilität zum Zeitpunkt ihrer Todes noch den Ursprungstumor, wodurch die Metastasen post mortem noch mit dem

Primärtumor in Bezug auf genetische oder molekularbiologische Veränderungen verglichen werden können (*Sohn et al. 2000*).

Derzeit geht man davon aus, dass Metastasen auf dem Boden multipler genetischer, epigenetischer und post-translationaler Ereignisse entstehen (*Talmdadge et al. 2010*). Diese Mechanismen beinhalten unter anderem einen epithelialen-mesenchymalen Übergang, die Formation prometastatischer Nischen durch die Mikroumgebung, eine Immunsuppression und die Überexpression bestimmter micro-RNAs, welche onkogenetische Signalwege aktivieren. (*Mani et al 2008, Ma et al. 2010, Oskarsson et al. 2011, Calon et al 2012, Semenza et al. 2013, Rabinovich et al. 2007*).

### **1.1.2 Genetik und Molekularbiologie**

Das Pankreaskarzinom entwickelt sich wahrscheinlich über verschiedene Vorläuferstufen, den sogenannten pancreatic intraepithelial neoplasias [PanINs]. (*Hruban et al. 2001*). Je nach PanIN-Stadium kann man unterschiedliche genetische Veränderungen in den Tumoren nachweisen. In >99% der Zellen des Stadiums PanIN-1 findet man beispielsweise eine aktivierende Mutation im Gen KRAS. In PanIN-2 findet man häufig eine inaktivierende Mutation von CDKN2A, in PanIN-3 dann häufig inaktivierende Mutationen von p53 und SMAD4. Durch diese (und viele andere) Mutationen entsteht über die Vorläuferstufen schließlich ein invasives Karzinom, welches über weitere Mutationen zur Ausbildung von Metastasen befähigt werden kann. Die Mechanismen, die diese Metastasierung begünstigen oder auslösen, sind heute noch weitestgehend unbekannt (*Hbruan et al. 2000*), es existieren jedoch einige Theorien und auch einige vielversprechende Ansatzpunkte.

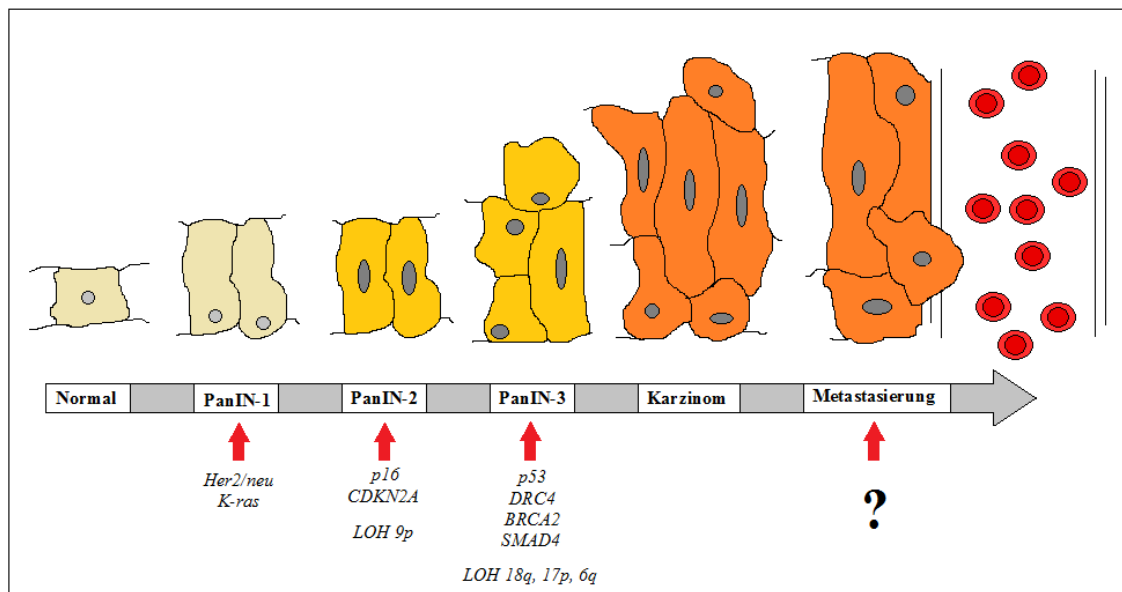


Abb.3. Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. PanIN-1 = Low-grade dysplasia, PanIN-2 = Moderate dysplasia, PanIN-3 = High-grade dysplasia. Je nach Stadium kann man unterschiedliche genetische Veränderungen nachweisen. Häufigste Mutationen: K-ras, Her2/neu in PanIN-1, p16, CDKN2a in PanIN-2, p53, DRC4, BRCA2, SMAD4 in PanIN-3.

Die verschiedenen Mutationen haben unterschiedliche Effekte auf das Tumorstadium oder dessen Metastasierungsfähigkeiten. So wurde beschrieben, dass eine Geninaktivierung von SMAD4 mit einer verkürzten Überlebenszeit (*Blackford et al. 2009*) oder auch mit dem Auftreten von multiplen Metastasen korreliert (*Jacobuzio-Donahue et al. 2009*). Dies basiert wahrscheinlich auf einem Verlust der Inhibition des Zellwachstums durch den Verlust der SMAD4-Proteinexpression (*Dai et al. 1998*). Weitergehend ist bekannt, dass SMAD4 und p53 Mutationen häufig gemeinsam auftreten und zu einem deutlich erhöhten Metastasierungsrisiko führen (*Yachida et al. 2012*).

Die Vielzahl an Mutationen, die während der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms auftreten, bedingt eine Vielzahl unterschiedlicher Zellklone, die im Primärtumor entstehen. In dem Primärtumor entsteht somit im Verlauf eine Mischung genetisch verschiedener Zelltypen, die untereinander ein unterschiedliches Potential für Zellwachstum und Metastasierung aufweisen (*Yachida et al. 2009*).

## 1.2 Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten zählen zu den Leukozyten und sind Vertreter des angeborenen Immunsystems. Sie entwickeln sich aus myeloiden Vorläuferzellen (siehe Abb.4) und zirkulieren nach dem Verlassen des Knochenmarks wenige Tage lang im Blut, bis sie auch die Blutbahn wieder verlassen und sich im Gewebe ansiedeln. Dort differenzieren sie sich zu verschiedenen Subtypen von Makrophagen weiter. Bei dieser Differenzierung erlangen die Makrophagen neue Rezeptoren und somit auch neue Funktionen (Ziegler-Heitbrock et al. 2010)

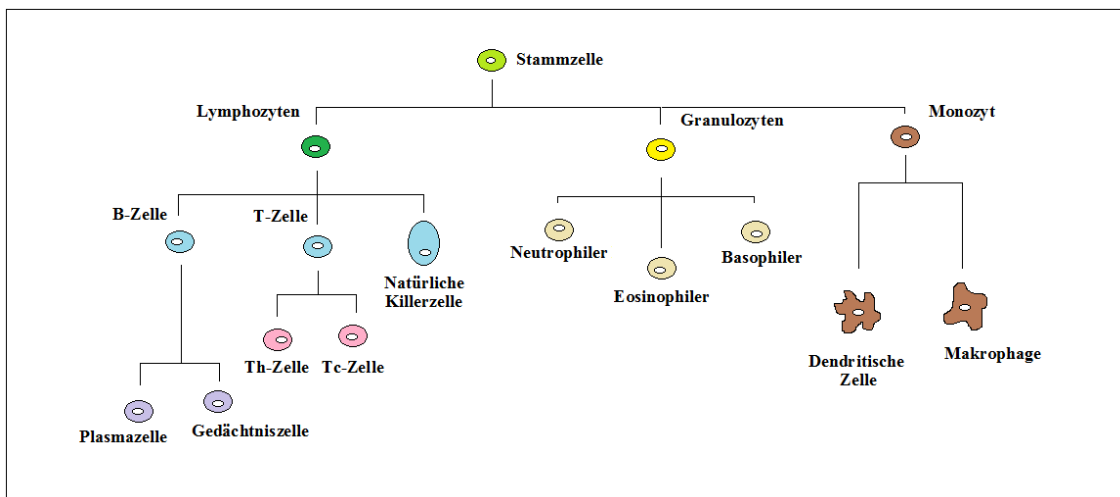


Abb.4. Myelopoese: Stammbaum der Makrophagenentwicklung in deutlich vereinfachter Darstellung (Adaptiert nach Kenneth Murphy: Janeway's Immunobiology)

Der schon bei Monozyten exprimierte CD14 Rezeptor stellt auch einen Oberflächenrezeptor der Makrophagen dar und ist ein wichtiger Co-Rezeptor bei der Erkennung von bakteriellen Infektionen. Er erkennt einen Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, das sog. Lipopolysaccharid (LPS). Durch die Bindung von LPS an den Rezeptor entsteht ein Komplex, der eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die zur Expression verschiedener Gene führt und damit eine Aktivierung und Stimulierung der Immunantwort bewirkt.

Neben der wohl bekanntesten Funktion als Phagozyten und Antigen-präsentierenden Zellen sind Makrophagen noch bei vielen weiteren, wichtigen Mechanismen im menschlichen Organismus vertreten, wie zum Beispiel bei der Aufrechterhaltung der

Homöostase und bei der Reparatur von Gewebsschäden. Man geht heute davon aus, dass sie zu den phylogenetisch ältesten Vertretern des angeborenen Immunsystems gehören (*Hoffmann et al. 1999*).

### **1.3 Zytokine**

Das Zytokinsystem zählt zu den Kommunikationssystemen des Körpers und ist vor allem für eine lokalisierte Wirkung, z.B. bei Entzündungsreaktion zuständig. Zytokine sind Polypeptide mit kurzer Halbwertszeit und hoher Bindungsspezifität. Man unterscheidet verschiedene Klassen: Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, TGF), Interleukine (z.B. IL-1, -4, -6), Interferone (z.B. IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) und Chemokine (z.B. MIP, IL-8). Sie werden von verschiedenen Zellen produziert und erfüllen unterschiedliche Funktionen.

Aktivierte Makrophagen, die den Erstkontakt mit einem Pathogen hergestellt haben, sind in erster Linie dafür zuständig, dass eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird, um so eine effektive Immunabwehrreaktion aufzubauen. Dafür sind neben Phagozyten auch andere Immunzellen und systemische Effekte notwendig. Signalgeber sind hier Zytokine, die von den Makrophagen produziert werden. Dazu zählen u.a. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, CXCL8, und IL-12. Mithilfe dieser Zytokine werden sowohl lokale Effekte (Endothel-Aktivierung, Lymphozyten-Aktivierung, NK-Aktivierung, etc.) als auch systemische Effekte ausgelöst, wie Fieber oder die Produktion von Akute Phase Proteinen (*Luster et al. 2002*).

Zytokine sind jedoch nicht nur Mediatoren im Entzündungsgeschehen. Vielmehr sind es Botenstoffe, die an allen Stellen des menschlichen Körpers von einer Vielzahl von Zellen sezerniert werden können, um eine interzelluläre Kommunikation über ein weites Spektrum von Aufgaben zu ermöglichen – auch in der Umgebung von Tumorzellen: Über Expression verschiedener Zytokine kann ein Karzinom andere Zellen beeinflussen und sich so ein habitables Mileu schaffen, welches die Progression und Metastasierung des Karzinoms begünstigt und beschleunigt (*Pollard et al. 2004*).

Es folgt eine Auswahl an Zytokinen, die eine nachgewiesene Wirkung auf Makrophagen haben und in den Experimenten dieser Arbeit verwendet wurden.

Zytokin	Aufbau	Ursprung	Funktion auf Makrophagen
<b>IL 4</b>	Monomer aus 129 AS	T-Zellen, Mastzellen	Inhibition der Aktivierung
<b>IL 10</b>	Heterodimer aus 160 AS	Monozyten, TH2, TH1	Inhibition der Zytokinfreisetzung
<b>IL 13</b>	Monomer aus 132 AS	T-Zellen	Inhibition der Aktivierung
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Homo- / Heterotrimere aus 112 AS	Chondrozyten, Monozyten, T-Zellen (Treg)	Inhibition der Aktivierung
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Homodimer aus 143 AS	TH1 und TH2, Natürliche Killerzellen	Aktivierung, Induktion der MHC- Expression
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Trimer aus 157 AS	TH1 und TH2, Makrophagen, Dendritische Zellen	Aktivierung und Induktion der NO- Produktion

Tab 1. Zytokine mit Makrophagenwirkung, die in dieser Arbeit verwendet wurden. IL = Interleukin, AS = Aminosäure, TGF $\beta$  = Tumorgrowthfactor  $\beta$ , IFN $\gamma$  = Interferon  $\gamma$ , TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ .

### Tumornekrosefaktor Alpha (TNF $\alpha$ )

TNF $\alpha$  ist ein multifunktionaler Botenstoff und wird u.a. an Entzündungsstellen von stimulierten Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert. Er wirkt dort auf das vaskuläre Endothel, infolgedessen es dann zur Expression von Cell-Adhäsionsmolekülen kommt. Dies führt im Zusammenspiel mit anderen Oberflächenmolekülen (z.B. ICAM-1) zur effektiveren Migration von Leukozyten durch das Endothel in das Gewebe hinein. Weitergehend kommt es durch die TNF $\alpha$  Wirkung zu Veränderungen in den Zell-Zell-Verbindungen, die zur Vasodilatation führen und so ebenfalls die Migration verbessern. Außerdem ist TNF $\alpha$  ein wichtiges Zytokin, welches über Stimulation der Koagulation verhindert, dass sich Pathogene über den Blutkreislauf im Organismus verbreiten können und so andere Organe befallen können. Durch die Ausschüttung von TNF $\alpha$  werden Makrophagen im Tumorgewebe stimuliert und zur Phagozytose angeregt. Zusätzlich kommt über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Gene zur Apoptose von Tumorzellen. TNF $\alpha$  stellt somit einen wichtigen Bestandteil in der Bekämpfung von Karzinomen dar (Pfeffer et al. 2003).

### Interleukin 4 / Interleukin 13

Die Zytokine IL-4 und IL-13 werden vor allem aus TH2-Helferzellen sezerniert und üben vergleichbare Funktionen aus, da sie auf die gleichen Rezeptoren wirken (*Gordon et al. 2003*). Aufgrund dessen werden sie im Folgenden gemeinsam besprochen. Ihre Hauptaufgabe entfalten sie in der T-Zell-Differenzierung und –Proliferation und spielen somit eine zentrale Rolle in der T-Zell-vermittelten Immunreaktion. Weitergehend führen sie über eine hemmende Wirkung auf Makrophagen zu antiinflammatorischen Prozessen, sowohl an Entzündungsstellen als auch im Tumorgewebe. (*Zdanov et al. 2008*)

### Interleukin 10

Interleukin-10 hat einen inhibierenden Effekt auf T-Zellen, Monozyten und Makrophagen, indem es die Zytokin-Produktion in diesen Zellarten unterbindet (*Moore et al. 2001*). Über diesen immunsuprimierenden Effekt scheint es einen Einfluss auf die Entstehung von Tumoren zu haben (*Eskdale et al. 1997*). Makrophagen im Tumorgewebe werden durch den Einfluss von IL-10 in eine Art deaktivierten Zustand versetzt (*Mantovani et al. 2004*) und können so nicht mehr die Bekämpfung des Tumorgewebes unterstützen.

### Transforming growth factor $\beta$

TGF- $\beta$  erfüllt verschiedene Funktionen in der Regulation der Proliferation und Differenzierung von unterschiedlichen Immunzellen und spielt somit ebenfalls eine wichtige Rolle in der Immunreaktion. Fehlfunktionen oder Dysregulationen im TGF- $\beta$  Haushalt finden sich bei unterschiedlichen Krankheitsbildern, wie beim Asthma bronchiale, Diabetes mellitus, Marfan Syndrom, Morbus Parkinson, AIDS, Herzerkrankungen - und auch in der Onkogenese. Physiologischerweise führt TGF- $\beta$  in epithelialen Empfängerzellen zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und somit zu einer Unterbrechung der Zellproliferation. In Tumorzellen kann es durch Mutationen dazu kommen, dass diese Regulation über TGF- $\beta$  gestört ist. Infolgedessen kommt es zu einem unkontrollierten Zellwachstum, auf welches die umliegenden Zellen mit einer Induktion der TGF- $\beta$ -Synthese reagieren. Die erhöhten TGF- $\beta$ -Spiegel im Tumorgewebe haben keinen Effekt mehr auf die proliferierenden Tumorzellen, führen jedoch über obige Mechanismen zu einer Proliferationshemmung der umliegenden

Zellen und somit auch zu einer Immunsuppression, was wiederum das Tumorstadium beschleunigt (*Elliott et al. 2005*).

### Interferon $\gamma$

Die Zytokine der Interferon-Familie werden u.a. als Reaktion auf eine virale Infektion von Körperzellen synthetisiert und sezerniert. Sie beeinflussen die virale Replikation und wirken so einer Ausbreitung der Infektion entgegen. Zu ihnen zählen IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ , wobei letzteres keinen unmittelbaren Einfluss auf eine virale Infektion hat, sondern erst im weiteren Verlauf der Infektion produziert wird. Es erfüllt wichtige übergeordnete Funktionen in der Immunreaktion gegen intrazelluläre Pathogene: So benötigen Makrophagen für ihre Aktivierung etwa eine Stimulation durch IFN- $\gamma$ , welches v.a. durch T-Zellen sezerniert wird. Erkennt eine CD8-zytotoxische T-Zelle eine durch ein intrazelluläres Pathogen infizierte Körperzelle, so kommt es zu einer Freisetzung von IFN- $\gamma$ , welches nun wiederum eine Makrophagenaktivierung auslöst und eine lokale Immunreaktion bahnt, um die Ausbreitung des Pathogens zu unterbinden. Eine deutliche Steigerung der IFN- $\gamma$  Wirkung wird durch das gleichzeitige Vorhandensein von bakteriellem LPS (Lipopolysaccharid) erzielt, um bei bakteriellen Infektionen eine schnelle und effektive Entzündungsreaktion auszulösen. (*Pietras et al. 2006, Schroder et al. 2004*).

## **1.4 TAMs und deren Wirkung**

Typisch für das PDA ist ein massiver Stromaanteil: Bis zu 80% der Tumormasse kann Stromagewebe darstellen (*Erkan et al. 2012*). Dieser Stromaanteil ist sehr heterogen und besteht zum Großteil aus Immunzellen, Sternzellen, Gefäßzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten und extrazellulären Matrixkomponenten. Alle diese Komponenten wurden bereits als Promotoren der Karzinogenese beschrieben (*Erkan et al. 2012, Olive et al. 2009, Erez et al. 2010, Beatty et al. 2011*).

Über chemotaktische Faktoren „locken“ Tumorzellen diese Zellen an. Unter ihnen sind auch Monozyten, die sich in der Tumorumgebung zu Makrophagen differenzieren. Diese als „tumorassoziierte Makrophagen“ bezeichneten Immunzellen erfüllen

verschiedene Funktionen, die das Tumorstadium auf der einen Seite hemmen, es auf der anderen Seite jedoch auch beschleunigen können (siehe Abb.5) - und sogar eine Metastasierung begünstigen können (Pollard et al. 2004). Zu welchem Subtyp sich die Monozyten polarisieren und welche Aufgaben sie im Folgenden erfüllen, hängt von der Zytokinexpression im Tumorumfeld ab (Sica et al. 2012). Man unterscheidet dabei Makrophagen vom Typ M1, die eine vorwiegend zytotoxische Wirkung ausüben und das Tumorstadium hemmen, vom Typ M2, die das Tumorstadium und eine Metastasierung begünstigen können.

M1-Makrophagen differenzieren sich unter anderem durch den Einfluss von  $\text{IFN-}\gamma$  / LPS und  $\text{TNF-}\alpha$ , während IL-4 / IL-13 und IL-10 eine M2-Differenzierung begünstigen. Die M2-Gruppe lässt sich noch einmal in verschiedene Subtypen einteilen (Mantovani et al. 2004), wobei man zwischen M2a, M2b und M2c unterscheidet. Diese Subtypen unterscheiden sich zwar im Hinblick auf die Expression verschiedener Genprodukte, ihnen allen ist jedoch gemein, dass sie wahrscheinlich die Tumorstadium begünstigen (Mantovani et al. 2010), weshalb diese Unterteilung im Folgenden nicht berücksichtigt wird.

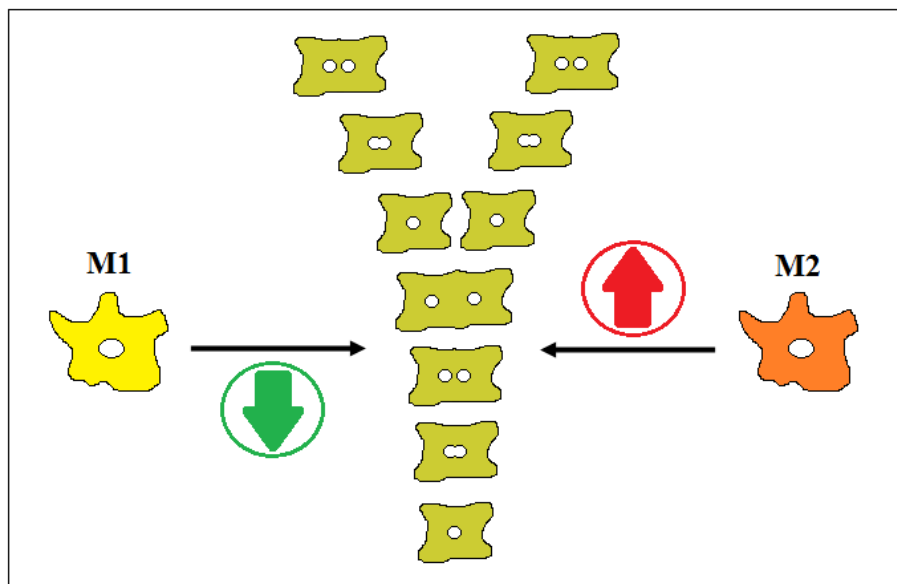


Abb. 5. Wirkung von Makrophagen auf das Tumorstadium je nach Polarisation

Der Phänotyp der TAMs verändert sich je nach Tumorstadium. M1-Makrophagen sind vor allem in der chronischen Entzündungsphase vertreten, in der ein Tumor entsteht (Greten *et al.* 2004, Karin *et al.* 2005). Im Verlauf der Karzinogenese verschiebt sich die Polarisation in Richtung M2-Phänotyp, was nun mit einer lokalen Tumorausbreitung, Vaskularisierung und weiteren Differenzierung des Tumorgewebes einhergeht (Lin *et al.* 2006, Qian *et al.* 2009, Ruffel *et al.* 2012). Eine hohe Belastung des Tumorgewebes mit M2-polarisierten Makrophagen korreliert dabei mit einer größeren Tumormasse, einer frühen Metastasierung in die Leber, lokaler Rekurrenz und verkürzter Überlebenszeit (Yoshikawa *et al.* 2012). Außerdem wird die Wirkung von TAMs auf Tumorstammzellen zunehmend diskutiert und untersucht (Jinushi *et al.* 2011).

Im Folgenden wird der wachstumsbegünstigende Einfluss von M2-polarisierten Makrophagen auf Tumorzellen genauer beschrieben (siehe Abb.6).

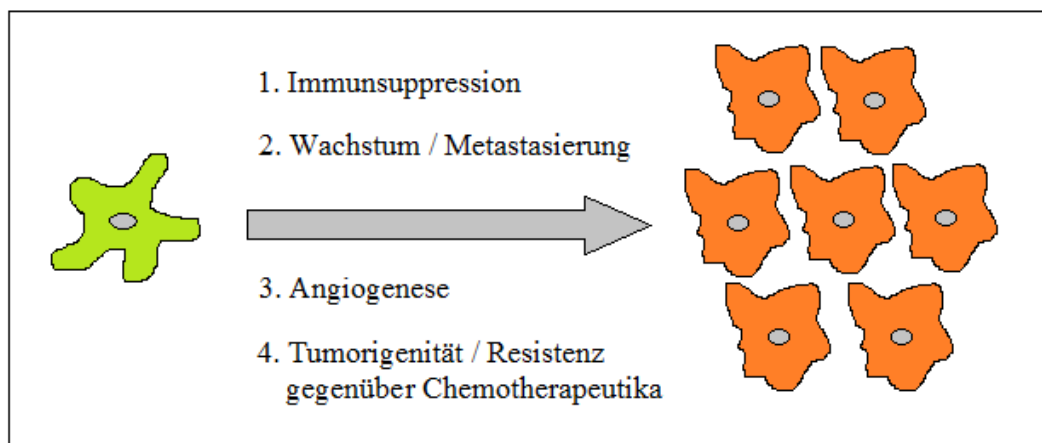


Abb. 6. Wirkungen von TAMs auf Körperzellen im Überblick

### TAMs und Immunsuppression

M2-polarisierte Makrophagen exprimieren verschiedene Gene, deren Genprodukte eine immunsupprimierende Wirkung aufweisen. Hierzu zählen z.B. Arginase I, IL-10 und TGF- $\beta$  (Biswas *et al.* 2010). Außerdem kommt es zu einer Reduktion von antigenpräsentierenden Rezeptoren auf den M2-Zellen, wie MHCII und CD11c (Mantonvai *et al.* 2010, Squadrito *et al.* 2012). Es ist bekannt, dass dieser

immunsupprimierender Effekt von TAMs auch im Pankreaskarzinom eine wichtige Rolle spielt: Mittels Applikation von CCR2- und CSF1R-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabine erzielte man eine Suppression und Reduktion von TAMs und einen prozentualen Anstieg von CD8+ T-Zellen im Tumorstroma von Pankreaskarzinomen. Dies ging im Vergleich zu einer Einzeltherapie mit Gemcitabine mit einer deutlichen Hemmung des Tumorwachstums einher (*Mitchem et al. 2013*). Dies ist ein gutes Beispiel dafür, dass TAMs ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Interventionsmöglichkeiten darstellen könnten.

### TAMs und Angiogenese

In differenzierten Geweben findet im Regelfall keine Angiogenese mehr statt, es gibt jedoch zwei Ausnahmen: Zum einen die zyklusabhängige Angiogenese in der Schleimhaut des weiblichen Reproduktionstraktes, zum anderen die Ausbildung von neuen Gefäßen in Tumorgeweben. Es ist bekannt, dass TAMs im Tumorgewebe pro-angiogenetische Faktoren ausschütten können, wie z.B. EGF (*Lewis et al. 2000*, *Sunderkotter et al. 1994*). Hierüber wird eine Kaskade aktiviert, die zur Ausbildung neuer Blutgefäße führt, welche das aufgrund des unkontrollierten Wachstums zunehmend schlechter perfundierte Tumorgewebe mit Nährstoffen versorgen.

Die Rolle der Angiogenese in PDAC ist bisher noch weitgehend ungeklärt, scheint jedoch weniger bedeutend zu sein als in anderen Tumor-Entitäten (*Olson et al. 2011*), trotzdem konnten gezeigt werden, dass man durch die Inhibition der Makrophagenmigration in das PDAC eine Reduktion der Angiogenese mit daraus resultierender Wachstumshemmung erzielen kann (*Schmid et al. 2011*). Weiterführende Forschung muss zeigen, ob auch hier neue Therapieansätze greifen könnten.

### TAMs und Metastasierung

Fernmetastasen sind die führende Todesursache im Rahmen einer Karzinomerkrankung. Das PDAC metastasiert seinerseits vor allem in die Leber, das Peritoneum, die Lunge und in die Knochen (*Vincent et al. 2011*). Auch hier scheinen TAMs unterstützend einzugreifen: Über die Expression verschiedener Faktoren, wie z.B. Proteasen oder Cathepsinen kommt es zu Umbauprozessen in der extrazellulären Matrix und zur Auflösung von Zell-Zell-Verbindungen, wodurch eine Loslösung von Tumorzellen aus dem Zellverband erleichtert wird oder überhaupt erst möglich gemacht werden kann

(Joyce *et al.* 2009). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass PDAC-Zellen und TAMs MIP-3a (macrophage inflammatory protein-3 alpha) sezernieren. Dieses induziert über Bindung an den Rezeptor CCR6 die Expression von MMP9, was zu einer signifikanten Progression der Tumorzell-Invasion in Gewebe vom Kollagen Typ IV führt (Campbell *et al.* 2005).

Ähnliche Wirkungen von TAMs auf Metastasenbildung wurden auch im Maus-Modell beobachtet (Mitchem *et al.* 2013). Vor allem M2-Makrophagen werden verdächtig, eine erhöhte Metastasierungstendenz zu begünstigen (Tugues *et al.* 2012). Neben der hämatogenen Metastasierung über Förderung der Angiogenese können Makrophagen auch die Lymph-Angiogenese fördern und so eine lymphogene Metastasierung begünstigen. Dies geschieht u.a. über die Sekretion von VEGF-C (Schoppmann *et al.* 2006). Eine erhöhte Anzahl an M2-Makrophagen im Primärtumor korreliert dabei aufgrund einer beschleunigten lymphogenen Metastasierung mit einer schlechteren Prognose (Kurahara *et al.* 2013). Interessant ist, dass dabei keine Korrelation mit der absoluten Anzahl an Makrophagen bestand, sondern nur mit deren prozentualer Polarisation in die Subtypen M1 oder M2.

#### TAMs und Tumorstammzellen

In jüngster Vergangenheit wendet sich der Blick zunehmend auf die Wechselwirkung von TAMs und Tumor-Stammzellen (CSC: cancer stem cells). Dies sind Zellen innerhalb des Tumorgewebes, die sich durch eine hohe Proliferationsfähigkeit auszeichnen und dadurch eine Vielzahl an Tochterzellen hervorbringen. Diese Tochterzellen sind ihrerseits weiter differenziert und haben dadurch meist die hohe Proliferationsfähigkeit der Stammzellen eingebüßt (Wang *et al.* 2010). TAMs stehen in Verdacht die Tumorigenität und auch die Chemotherapie-Resistenz von CSC zu fördern (Jinushi *et al.* 2011). Beispielsweise kommt es bei Inhibition der Makrophagen-Einwanderung in PDAC-Gewebe zu einer Reduktion des CSC-Markers ALDH (Mitchem *et al.* 2013), was ein Hinweis auf eine solche Suppression bzw. Reduktion der CSC sein könnte.

In Zusammenschau obiger Informationen könnte ein Eingriff in die Makrophagen-Polarisation einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellen. So könnte versucht werden den im Tumor vorherrschenden M2-Phänotyp in einen M1-Phänotyp

umzuprogrammieren und somit eine inflammatorische, tumorfeindliche Umgebung zu schaffen. Im Mausmodell wurde etwa durch die Einwirkung von anti-CD40 Antikörpern eine Aktivierung von M1-Makrophagen bzw. deren Einwanderung in das Pankreaskarzinomgewebe erzeugt, was die Effektivität einer Chemotherapie mit Gemcitabine deutlich verbesserte (*Beatty et al. 2011*).

### **1.5 micro-RNA**

Als mi-RNAs werden kurze, einzelsträngige RNAs bezeichnet, die wichtige Funktionen in der Genregulation von eukaryontischen Zellen ausüben, z.B. in der Zellentwicklung, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Sie werden im Zellkern als pre-miRNAs transkribiert, welche im weiteren Verlauf durch verschiedene Enzyme in kurze, etwa 21-24 Nucleotide lange und nun aktive miRNAs prozessiert werden (*Seton-Rogers et al. 2013*).

MiRNAs können komplementär an die in Zellen exprimierte mRNAs binden, deren Abbau sie dadurch fördern und somit die Proteinbiosynthese dieser mRNA in der Zelle hemmen (*Zhang et al. 2007*). Diese als „gene silencing“ bezeichnete Inhibition geschieht nach der Transkription eines Genes in mRNA und vor deren Proteinbiosynthese am Ribosom (Abb.7). Dabei bindet die miRNA über die sog. „seed“ Region (2-7 Nucleotide) an einen komplementären Abschnitt einer mRNA am 3'UTR Ende. Dies führt zu Deadenylation / Uncapping oder Unterbindung der Translation am Ribosom und somit zur Inhibition der Proteinbiosynthese (*Squadrito et al. 2013*).

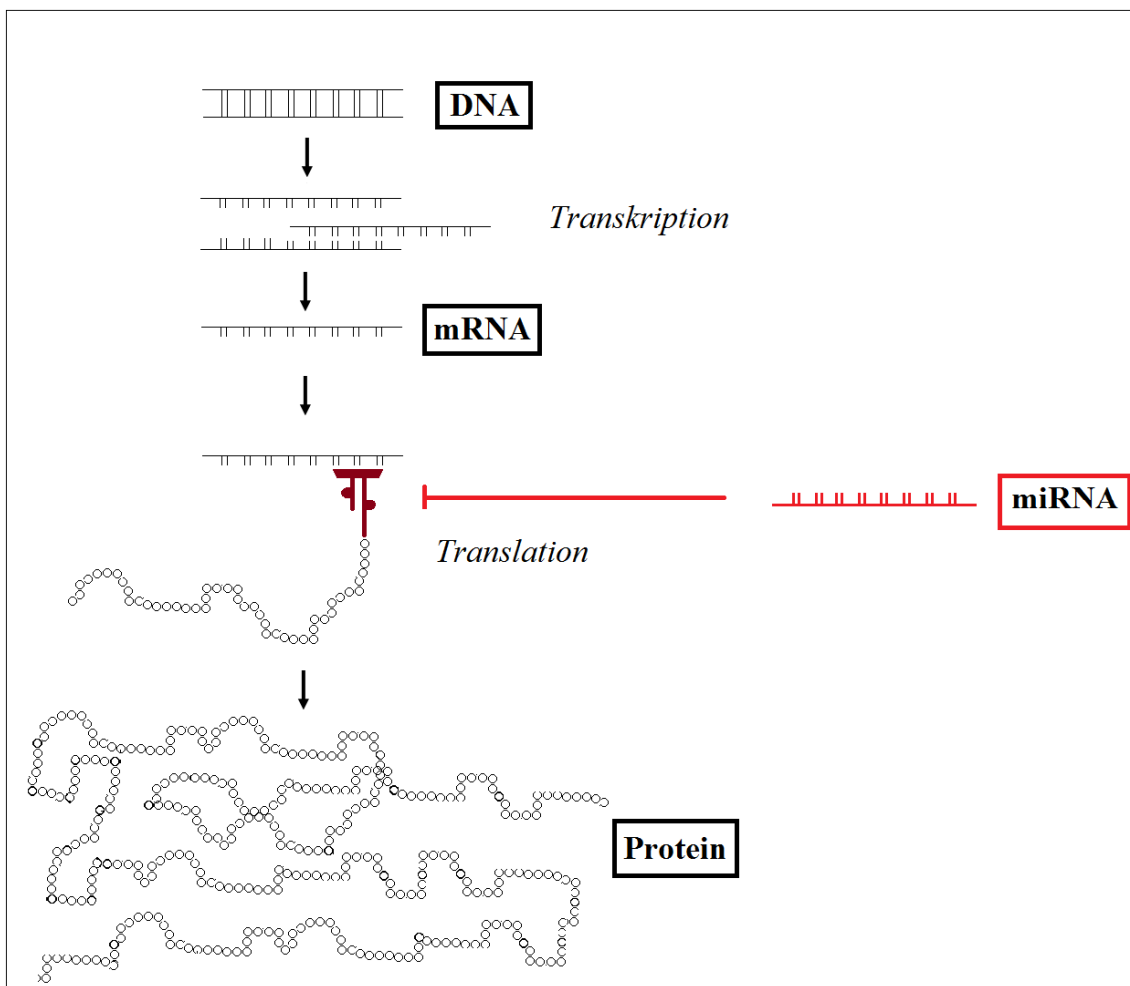


Abb.7. Mechanismus der miRNA-vermittelten Proteinbiosynthese-Inhibition. Nach Transkription der DNA in einen mRNA-Strang entsteht aus diesem über den Vorgang der Translation ein Protein. Dieser Vorgang kann durch die Einwirkung von spezifischen miRNAs blockiert werden.

In der Regel kann die „seed“ Region einer miRNA an hunderte verschiedene mRNAs unterschiedlicher Gene binden. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass miRNAs nur bis etwa 20% der mRNAs eines Genes inhibieren (Baek D. et al. 2008), miRNAs wirken sich also eher auf die Feinjustierung der Genexpression aus (Grimson et al. 2007, Pasquinelli et al. 2012).

Diese miRNAs spielen nicht nur in physiologischen Zellmechanismen eine Rolle – sie können auch in Tumorzellen dysreguliert sein und hier das Tumorstadium oder auch die Metastasierung begünstigen (Bartel et al. 2009). Eine solche Dysregulation wurde auch bereits untersucht und nachgewiesen (Croce et al. 2009). Sie können dabei entweder über- oder unterexprimiert sein und so Genprodukte vermehrt oder vermindert inhibieren.

In der Literatur finden sich zahlreiche Daten über die miRNA-Profile ganzer Tumorgewebe, bestehend aus Tumorzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und verschiedenen Immunzellen (*Hanahan et al. 2012, Lindsay et al. 2008, Mitra et al. 2012, O'Connell et al. 2012*). Dabei wurde auch der Einfluss von miRNA auf die Karzinogenese untersucht (*Henry et al. 2013, Zhang et al. 2007*). In diesem Rahmen wurden erste Hinweise dafür entdeckt, dass einige miRNAs auch eine wichtige prognostische Rolle bei Patienten mit Pankreaskarzinom spielen (*Giovannetti et al. 2010, 2012*). In jüngster Vergangenheit wurde der Einfluss der miRNA-Expression in Monozyten / Makrophagen bzw. TAMs genauer untersucht und ebenso die Auswirkung einer Über- bzw. Unterproduktion bestimmter miRNA's auf die Polarisation der Makrophagen. So konnte gezeigt werden, dass miR-21 und miR-29b von TAMs aufgenommen werden können und in diesen Zellen eine intrazelluläre Wirkung entfalten, die eine Polarisierung in Richtung M1-Phänotyp mit proinflammatorischer, als auch prometastatischer Funktion zur Folge haben (*Fabbri et al. 2012*).

Für die beiden in dieser Arbeit untersuchten micro-RNAs 155 und 203 lagen bereits Hinweise dafür vor, dass deren Über- bzw. Unterexpression in verschiedenen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose einhergeht (*Greither et al. 2010*).

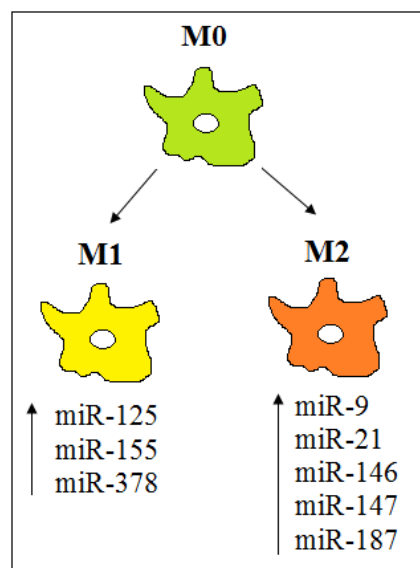


Abb.8. Wirkung von micro-RNAs auf die Makrophagenpolarisation.

Nach Squadrito et al. 2013

### miRNA-155

Das Gen der miRNA-155 ist im sog. BIC (B-Cell Interaction Cluster) kodiert. miRNA-155 wird durch NFκB in Makrophagen und Dendritischen Zellen im Rahmen einer Aktivierung durch TLR-Liganden und Interferonen (Typ I) reguliert (*O'Connell et al. 2007*). Diese miRNA besitzt vorwiegend proinflammatorische Funktionen, indem sie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in Makrophagen und anderen Immunzellen erhöht. Dies geschieht u.a. über eine Stabilisierung des TNF-α Transkriptes auf mRNA Ebene (*Bala et al 2011, Tili et al. 2009*).

Über die Wirkung von miRNA-155 auf Makrophagen finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass es durch deren Einwirkung zu einer Polarisation zu M1-Makrophagen kommt. Dies geschieht über eine Unterdrückung von Inhibitoren proinflammatorischer Zytokine, wie SOCS1 (*Wang et al. 2010*) oder BLC6 (*Nazari-Jahantigh et al. 2012*). Außerdem blockiert miRNA-155 den Interleukin 13 Rezeptor (IL13Rα1), welcher seinerseits sonst eine Polarisierung in Richtung M2 bewirken würde (*Martinez-Nunez et al. 2011*). Die direkte Einbringung von miR-155 in bereits M2-polarisierte Makrophagen führt zur Entwicklung eines eher proinflammatorischen, d.h. eher M1-polarisierten Phänotyps (*Cai et al. 2012*). Im Mausmodell wurde außerdem gezeigt, dass es in mir155 <sup>-/-</sup> Mäusen zu einem beschleunigten Tumorwachstum kommt (*Huffaker et al. 2012*).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass miR-155 in Makrophagen eine eher proinflammatorische Funktion erfüllt und eine Polarisierung in Richtung M1 bewirkt. Außerdem erfüllt es im Tumorgewebe ersten Hinweisen zur Folge eine wachstumshemmende Wirkung.

### miRNA-203

Ersten Erkenntnissen zur Folge hat miRNA-203 in bestimmten Geweben ebenfalls eine tumorsupprimierende Wirkung. So konnte gezeigt werden, dass miRNA-203 in Lungentumorgewebe herunterreguliert ist und eine Inhibition der Proliferation und Invasion bewirkt (*Jin et al. 2013*). Eine Unterexpression von miR-203 konnte ebenfalls in Larynx- (*Bian et al. 2012*) oder Ösophaguskarzinomen (*Takeshita et al. 2012*) nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass eine Überexpression von miR-203 im Pankreaskarzinom mit einer schlechteren Prognose korreliert. So haben Ikenaga N et al gezeigt, dass miR-203 im Pankreaskarzinom überexprimiert ist und es bei deutlicher Überexpression zu einer kürzer Überlebenzeit kommt (*Ikenaga et al. 2010*).

miR-203 steht weitergehend im Verdacht eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems zu spielen (*Moffatt et al. 2011*). In RAW264.7 Zellen (Makrophagen-Zelllinie) kommt es über die Einwirkung von miR-203 zu einer Suppression des Immunmodulators MyD88, was zu einer Unterexpression der proinflammatorischen Mediatoren NF-kB, TNFa und IL-6 in diesen Zellen führt (*Wei et al. 2013*).

Im Vergleich zu einigen anderen miRNAs ist die Datenlage bezüglich der miR-203 eher unübersichtlich und widersprüchlich, insbesondere über deren Funktion und Wirkung in TAMs ist bis dato wenig bekannt.

## **1.6 Mikrovesikel und Exosomen**

Neben den aktiven (unter Energieverbrauch über einen Carrier) und passiven (entlang des Konzentrationsgefälles) Transportmechanismen existieren noch weitere Transportwege, mit denen eine Zelle mit ihrer Umgebung kommunizieren kann. Darunter auch der sog. exosomenvermittelte Transport (*El et al.2013* ).

### Aufbau, Struktur und Herkunft

Exosomen gehören zur Gruppe der Mikrovesikel und bestehen aus einer Doppellipidschicht mit einem darin eingeschlossenem Zytosol. Dieses kann neben Proteinen, RNAs, Zytokinen und viralen Bestandteilen auch miRNAs beherbergen, die so transportieren werden (*Lasser et al. 2012, Gibbins et al.2009*). Es handelt sich dabei also um Transportvehikel, die durch ein abgeschlossenes Kompartiment eine hohe Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. RNAsen, gewähren, welche die in den Exosomen transportieren RNAs und miRNAs sonst leicht abbauen würden (*Mitchell et al. 2008*). Erstmals wurde ihre Existenz in Retikulozyten nachgewiesen. Sie sind etwa 40 bis 100 nm groß, werden von den unterschiedlichsten Zellarten produziert (*Denzer et al. 2000, Iguchi et al. 2010*), beherbergen je nach Zellherkunft unterschiedliche Inhalte

(van den Boorn et al. 2013) und scheinen somit eine wichtige Rolle in der inter- und intrazellulären Kommunikation zu spielen (Corrado et al. 2013).

### Einteilung

Die Gruppe der Mikrovesikel wird in Exosomen und Ektosomen eingeteilt (Abb.9). Die Ektosomen stellen eine eher heterogene Gruppierung mit einer Größenvarianz zwischen 0,1 und 1  $\mu\text{m}$  dar. Sie entstehen durch sog. „budding“ („Knospung“), d.h. durch Abkapslung an der Zellmembran (Camussi et al. 2011). Dem gegenüber steht die homogene Gruppierung der Exosomen. Mit einer Größe unter 100 nm sind sie im Durchschnitt deutlich kleiner als die Ektosomen und entstehen nicht durch „budding“ – stattdessen werden sie in sog. „multivesicular bodies“ gespeichert und durch deren Verschmelzung mit der Zellmembran an den extrazellulären Raum freigegeben (Lee et al. 2012, Fevrier et al. 2004). Die „multivesicular bodies“ haben ihrerseits eine endosomale Herkunft (Heijnen et al. 1999).

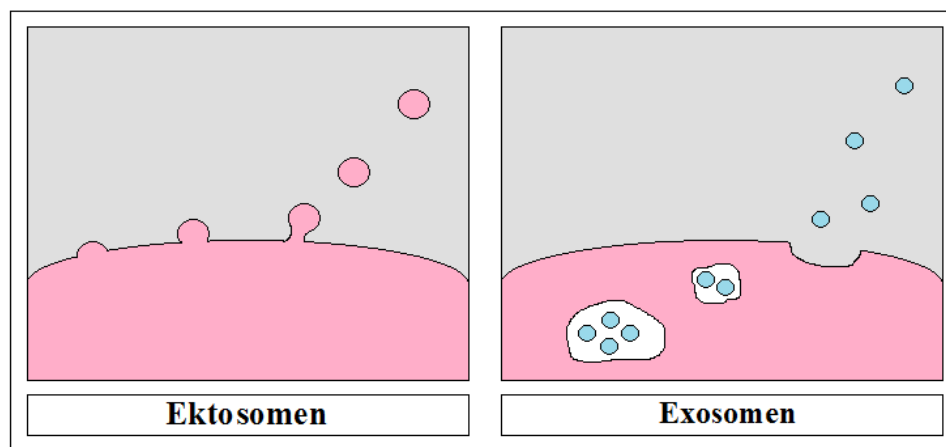


Abb.9. Entstehung von Mikrovesikeln (Nach Camussi G et al. 2011). Ektosomen entstehen durch „budding“, Exosomen werden hingegen durch die Verschmelzung von Transportvesikeln mit der Zellmembran sezerniert.

### Biogenese

Die Biogenese von Exosomen ist ein streng regulierter Prozess, der mit einer Rezeptoraktivierung beginnt (Keller et al. 2006). Dieser Rezeptor unterscheidet sich je nach Zellart. Bei Monozyten und Neutrophilen handelt es sich dabei z.B. um den P2X Purinorezeptor (Bhatnagar et al. 2007). Die Freisetzung unterliegt der Kontrolle bestimmter Regulationsproteine, wie z.B. Rab27a und Rab27b (Ostrowski et al. 2010),

als auch Rab35 (*Hsu et al. 2010*). Dabei verdichten sich Hinweise darauf, dass Rab27 – und damit womöglich auch Exosomen - in der Karzinogenese beteiligt sind (*Bobrie et al. 2012*).

Wie erwähnt unterscheidet sich der Inhalt der Exosomen zwischen den Zellarten (*Poliakov et al. 2009, Simons et al. 2009, Mathivanan et al. 2010, Simpson et al. 2009*). Neben verschiedenen Proteinen (Rab GTPasen, Annexinen, Integrinen, CD9, CD81-83, CD64,  $\beta$ -Aktin, MYosin, Cofilin, MHC I / II uvm.) können die Exosomen auch Proteine beinhalten, die in den Zellsignalweg eingreifen, wie Wnt- $\beta$ -catenin (*Gross et al. 2012*), Notch Ligand Delta-like 4 (*Sheldon et al. 2010*) und Interleukine (*Hasegawa et al. 2011*). Der Einfluss dieser Proteine auf die Karzinogenese und Resistenzentwicklungen gegenüber Medikamenteneinwirkung steht derzeit im Fokus von Experimenten verschiedener Arbeitsgruppen und könnte neue Ansatzpunkte für gezielte Therapien offenbaren.

### Funktion

Das Aufgabenspektrum der Exosomen ist enorm. So werden obsoleete Membranproteine aus Retikulozyten (z.B. der Transferrin Rezeptor) etwa über Exosomen ausgeschieden (*Geminard et al. 2002*), zytotoxische T-Zellen nutzen Exosomen um zytolytische Substanzen in Zielzellen einzubringen (*Quah et al. 2000*), und antigenpräsentierende Zellen sezernieren MHC I und II Moleküle mittels Exosomen, um die T-Zell-Proliferation zu stimulieren (*Denzer et al. 2000*). Durch die Übertragung von Molekülen über Exosomen könnten sie in Zellen des Immunsystems eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunreaktionen gegen Pathogene und Tumoren darstellen (*Gogolak et al. 2003*).

### Rolle in der Karzinogenese

Es werden immer neue Proteine identifiziert, die über Exosomen übertragen werden. Einige davon könnten eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen, indem sie etwa als Tumorsuppressoren oder –promotoren agieren. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem das HSP (*Cho et al. 2009*), das P53 (*Yu et al. 2006*), das PTEN (*Putz et al. 2012*) und das APC (*Lim et al. 2012*). Aber auch miRNAs können über einen exosomenvermittelten Mechanismus transportiert werden (*Stoorvogel et al. 2012*). So

konnte etwa gezeigt werden, dass die Mehrheit der in menschlichem Speichel gefundenen miRNAs in Exosomen beherbergt ist (*Gallo et al. 2012*).

In der Literatur finden sich bis dato erste Hinweise darauf, dass der Transport von miRNAs über Exosomen von einer Zellart zu einer anderen zumindest in vitro funktioniert (*Valadi et al. 2007, Mittelbrunn et al. 2011*) und dass dabei sogar funktionsfähiges Material in eine andere Zelle gebracht werden kann (*Lotvall et al. 2007*). Ebenso wurde nachgewiesen, dass die Aktivität von miRNA über einen exosomenvermittelten Transport modifiziert werden kann (*Gibbins et al. 2009*). Der Einfluss von via Exosomen übertragener miRNAs auf die Karzinogenese wird von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Dabei konnte bereits gezeigt werden, dass exosomenvermittelte miRNAs die Invasivität von Mammakarzinomen fördern (*Yang et al. 2011*) und dass Eingriffe in diese Signalkaskade direkt Auswirkungen auf die Karzinogenese haben (*Liu et al. 2013*).

#### Exosomen als Marker

Derzeitiger Gegenstand intensiver Forschung ist der Nutzen von exosomalen miRNAs, die eine hohe Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen aufweisen (*Koga et al. 2011*) – etwa für diagnostische oder prognostische Zwecke. Diese miRNAs werden von Tumorzellen in Exosomen verpackt sezerniert und können in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Es wurden bisher schon unterschiedlichste Karzinom-Entitäten untersucht (*Simpson et al. 2009*) und einige vielversprechende Kandidaten gefunden: Beispielsweise miRNA-650 für Gliome (*Sun et al. 2013*) oder miRNA-21 und miRNA-146a für das Mamma-Karzinom (*Kumar et al. 2013*).

## 2 Zielsetzung und Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Pankreaskarzinomzellen auf die Polarisierung von Makrophagen genauer zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf einer möglichen Änderung der Polarisierung der Makrophagen durch Partikel, die von den Karzinomzellen abgegeben werden. Grundlage war die Annahme, dass es zu einer Übertragung von Mikrovesikeln / Exosomen kommt, die von Makrophagen aufgenommen werden. Dies führt potenziell zu einem Transfer von Molekülen, u.a. micro-RNAs, die im Inneren der Vesikeln vor Umgebungseinflüssen geschützt sind und so auf andere Zellen übertragen werden können, wo sie wichtige Zellfunktionen wie Mitose, Apoptose, Zelldifferenzierung, Polarisierung etc. beeinflussen können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst Protokolle etabliert werden, um diese Vesikel durch Zentrifugationsverfahren zu gewinnen und deren Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen durch Vergleiche mit Makrophagen, die mit Hilfe von Zytokin-Stimulation gezielt in M1- und M2-Richtung polarisiert wurden, zu charakterisieren. Daneben sollte die spezifische Rolle der micro-RNAs 155 und 203 in diesem Kontext genauer untersucht werden, indem in verschiedenen Konstellationen zum einen rekombinante Expressionskonstrukte (RNAmimics) und zum anderen inhibitorische Konstrukte (anti-miRs) in (ko-)kultivierte Tumorzellen und/oder Makrophagen transfiziert werden sollten, um anschließend die entstehenden Effekte auf mRNA-Ebene ebenfalls mit zuvor polarisierten Makrophagen zu vergleichen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, stammen alle verwendeten Chemikalien von folgenden Herstellern: Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Riedel-de Haen (Seelze), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Acros Organics (New Jersey, USA), Fisher Scientific (Loughborough, Großbritannien), Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Niederlande), Laboratori Diaco Biomedicali (Triest, Italien), Qiagen (Hilden).

#### 3.1.2 Laborgeräte

AB 7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
AMAXA Nucleofector II	Lonza
Autoklav 3850 EL	Tuttnauer
Brutschrank Function Line BB 16	Heaeus Instruments
Eppendorf-Pipetten Discovery Comfort	Abimed
Feinwaage Mettler AE 163	Mettler-Toledo GmbH
Lichtmikroskop IMT-2	Olympus Optical Co
LSR II Flow Cytometer	BD Biosciences
Magnet OctoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
Magnetständer MACS® Multistand	Miltenyi Biotec
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	PeqLab
Pipetboy acu	Integra Biosciences
SterilBank Bio-II-A	TelStar
Sterilbank Lamin Air HB2448	Heraeus
Thermocycler	Techne
Tiefkühlschrank (-80°C) Hera Freeze	Thermo Electron LED
Tischkühlzentrifuge Mikro 200 R	Hettich
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf

---

Ultrazentrifuge Beckmann L8-70M	Beckman
Ultrazentrifugen-Rotor SW Ti 40	Beckman
Vortex	Heidolph
Wasserbad 1083	GFL
Zentrifuge J2-21 M/E	Beckman

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

---

Centricons Plus-70 / 100	Millipore
Combitips (0,2 -12,5 ml)	Eppendorf
Combitps plus (2,5 und 12,5 ml)	Eppendorf
Einmalhandschuhe Nobaglove Latex/Nitril	NOBA
Einmalspritzen für Eppendorfpipetten	Gilson
Filter für 500 ml; 75 mm <sup>2</sup> ; 0,2 µm Porengröße	Thermo Scientific
GeneAmp PCR-Reaktionsgefäße	PE Biosystems
Gewebekulturflasche 25, 75 und 175 cm <sup>2</sup> CellStar®	Greiner bio-one
Gewebekulturplatte 6-Well für Kokultur	BD Falcon
Gewebekulturplatte 6-, 12- und 48-Well	Thermo Scientific
Gewebekulturplatte 24-Well Falcon®	Becton Dickinson
Gewebekulturplatte 96-Well CellStar®	Greiner bio-one
Gewebekulturplatte 96-Well weiß	Greiner bio-one
Inserts (6-Well) für Kokultur; 0,4 µm Porengröße	BD Falcon
MACS MS-Column	Miltenyi Biotec
MACS Präseparationsfilter; 30 µm	Miltenyi Biotec
MicroAmp 96-Lochplatte (qPCR)	Applied Biosystems
Objektträger	Menzel
Objektträger mit Mattrand	Thermo Scientific
Parafilm „M“ Laboratory Film	American National Can
Reaktionsgefäße, versch. Volumina	Sarstedt
Röhren, versch. Volumina	Greiner Bio-One
Rundboden-Röhrchen	Greiner Bio-One
Skalpell CUTFIX	Braun
Spritzen BD Plastipak®; 1 ml	Becton Dickinson

Spritzen BD Plastipak®; 10 ml	Becton Dickinson
Spritzenfilter Nalgene; 0,2 µm Porengröße	Thermo Scientific
Sterile Einmalpipetten, versch. Volumina	Sarstedt
Zellkulturschale; 10 cm Durchmesser	Thermo Scientific
Zellkulturschale; 14,5 cm Durchmesser	Greiner Bio-One
Zellschaber	Greiner Bio-One

### 3.1.4 Buffy Coat

Angefordert aus der Blutbank des Universitäts-Klinikums Gießen-Marburg, Standort Gießen

### 3.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle	Kulturmedium
Panc-1	Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie, adhären	ATCC	DMEM + 10% FCS
IMIM-PC1	Humane duktale Pankreaskarzinom-Zelllinie, adhären	FX Real, Barcelona, Spanien	DMEM + 10% FCS

### 3.1.6 Zytokine

LPS	Sigma Aldrich
IFN $\gamma$	Sigma Aldrich
TGF $\beta$	Peptotech
TNF $\alpha$	Peptotech
Interleukin-4	Peptotech
Interleukin-10	Peptotech

Interleukin-13

Peptidech

### 3.1.7 Primer

MR for	5'-GGCCTTGCCGCCTATTTTC-3'
MR rev	5'-TCCTGGGCTTGACTGACTGTT-3'
CD36 for	5'-GTGATGATGAACAGCAGCAACA-3'
CD36 rev	5'-CCTCAGCGTCCTGGGTTACA-3'
hCCL5 for	5'-CGGGAGTACATCAACTCTTTGGA-3'
hCCL5 rev	5'-CAAGCTAGGACAAGAGCAAGCA-3'
hCXCL9 for	5'-CCCACCCGAACGTCTTATCTAA-3'
hCXCL9 rev	5'-TGGGTCACAGACTCTCAAATTTATG-3'
CXCL9 for	5'-GCAGGTGCTGGCTCTTTCC-3'
CXCL9 rev	5'-CATCATCCCTGGTCCCTGTAGT-3'
CXCL10 for	5'-ACGCTGTACCTGCATCAGCAT-3'
CXCL10 rev	5'-CTCAACACGTGGACAAAATTGG-3'
IL10 for	5'-TGAGAACCAAGACCCAGACA-3'
IL10 rev	5'-AAAGGCATTCTTCACCTGCT-3'
IL12 for	5'-CCTCAGTTTGGCCAGAAACC-3'
IL12 rev	5'-GGTCTTTCTGGAGGCCAGGC-3'
h/m XS13 for	5'-TGGGCAAGAACACCATGATG-3'
h/m XS13 rev	5'-AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT-3'

*Alle hier erwähnten und in meiner Arbeit genutzten Primer wurden mit der Software "Primer Express V3.0" von Applied Biosystems entworfen.*

### 3.1.8 miRNAs

Pre mi-RNA 155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	Ambion
Anti mi-RNA 155	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU	Ambion
Pre mi-RNA 203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	Ambion
Anti mi-RNA 203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	Ambion

Kontrolle pre	Random Sequence	Ambion
Kontrolle anti	Random Sequence	Ambion

### 3.1.9 Zellkulturmedien und Zusätze

---

Dulbeccos PBS 1x	PAA
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA
Fetal Bovine Serum (FCS)	PAA
L-Glutamine (200 mM), liquid	Invitrogen
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Gibco
RPMI 1640 + L-Glutamine	Gibco
Trypsin-EDTA 1x (0,05% / 0,02% in D-PBS)	PAA
X-VIVO 10 with L-glutamine	Lonza
Humanes AB-Serum	PAA

### 3.1.10 Erythrozytenlyse

---

In 500 ml PBS suspendieren  
 + 0,15 M NH<sub>4</sub>Cl  
 + 0,01 M KHCO<sub>3</sub>  
 + 0,1 mM EDTA

### 3.1.11 MACS-Puffer

---

In 500 ml PBS suspendieren

- 2 mmol EDTA
- 0,5 % BSA

---

**3.1.12 Reagenzsysteme (Kits)**

---

CD14-MicroBeads für MACS	Miltenyi Biotec
Human Macrophage Nukleofector® Kit	Lonza
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077, Ficoll™	PAA
Omniscript RT Kit	Qiagen
PKH67	Sigma-Aldrich
RNeasy® Midi Kit	Qiagen
RT2 First Strand cDNA Kit	Qiagen
SuperScript III Reverse Transcriptase	Life Technologies
SYBR®Green PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems
Tryphanblau Lösung	Sigma-Aldrich

### 3.2 Methoden

Grundlage aller Experimente dieser Arbeit war die Isolation von CD14+ Zellen (Monozyten) aus „Buffy Coats“, die bei der Blutbank des Universitäts-Klinikums Gießen-Marburg, Standort Gießen bestellt wurden (Abb.10). Diese Buffy Coats entstanden bei der hauseigenen Verarbeitung von Vollblutspenden und bestanden größtenteils aus Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten. Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte mit Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll), gefolgt von der Isolation CD14+ Zellen mittels Miltenyi Biotec CD14+ MicroBeads. Die hier extrahierten Zellen wurden über 5 Tage in einem speziellen Medium bei 37°C inkubiert, um eine Differenzierung in Makrophagen zu induzieren. Am Ende der Inkubationszeit standen differenzierte Makrophagen in ausreichender Anzahl zur Verfügung, um die unten aufgeführten Experimente durchzuführen.

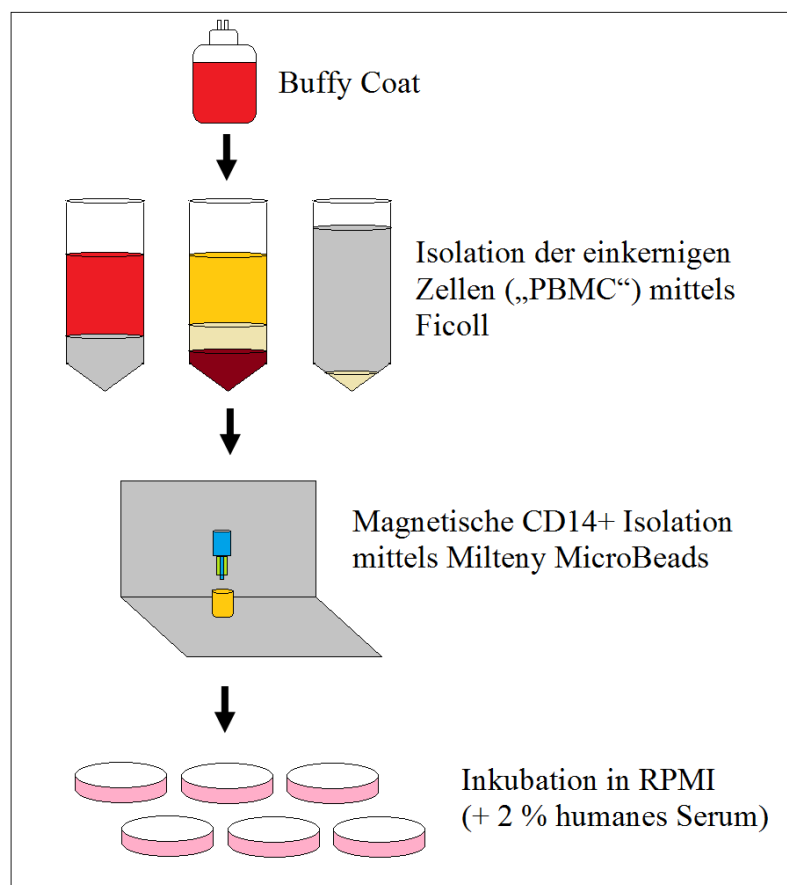


Abb 10. Grundlage aller Experimente ist die Isolation von Makrophagen aus Buffy Coats.

Es folgt eine kurze Übersicht über die Experimente

- Vorbereitung
  - Monozytenisolation mit Ficoll-Paque-Plus (17-1440-02, GE Healthcare)
  - CD14-Isolation (MicroBeads, 130-050-201, Miltenyi Biotec)
    - Kultur der Zellen in 2% humanem Serum und 83 ng/ml M-CSF
    - 5 Tage Inkubation zur Differenzierung zu Makrophagen
  
- Experimente
  - (1) Polarisation mit Zytokinen als Zeitversuch
    - Stimulation und Inkubation über 2h / 4h / 8h / 25h
    - Lyse → RNA-Isolation → cDNA-Synthese → RT-PCR
  
  - (2) Polarisation mit Zytokinen / 100ka Retentat / Ultrazentrifugat
    - Stimulation und Inkubation über 8 Stunden (2 Tage)
    - Lyse → RNA-Isolation → cDNA-Synthese → RT-PCR
  
  - (3) Transfektion von Makrophagen mit mi-RNA via AMAXA-Elektroporation
    - Transfektion von Makrophagen mit miRNA
    - Inkubation über 1-2 Tage
    - Lyse → RNA-Isolation → cDNA-Synthese → RT-PCR
  
  - (4) Cokultur mit PKH67-gefärbten Panc1-Zellen
    - Färbung von Panc1-Zellen mit PKH67
    - Cokultur mit Makrophagen über 1-2 Tage
    - FACS-Analyse
  
  - (5) Cokultur von polarisierten Makrophagen mit Panc1-Zellen
    - Cokultur von Panc1-Zellen und Makrophagen über 8 Stunden
    - Lyse → RNA-Isolation → cDNA-Synthese → RT-PCR

- (6) Cokultur mit miRNA-transfizierten Panc1-Zellen
  - Cokultur von transfizierten Panc1-Zellen mit Makrophagen über 2 Tage
  - Lyse → RNA-Isolation → cDNA-Synthese → RT-PCR

### 3.2.1 Monozytenisolation

Alle (anonymisierten) Spenderdaten der Buffy Coats wurden notiert. Hierfür lag ein Ethikvotum vor: Die Patienten mussten bei der Blutspende ihr schriftliches Einverständnis abgeben, dass das Blut, falls es klinisch nicht weiter verwendet werden sollte, stattdessen anonymisiert für Forschungszwecke verwendet werden kann. Die frisch gewonnenen Buffy Coats wurden gekühlt von Gießen nach Marburg transportiert und dort über kurze Zeit bei 4°C weiter gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden für jeden Buffy Coat drei 50 ml Röhren (Falcon) mit 13 ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll) befüllt. Nun wurde unverzüglich mit der Isolation begonnen. Je Ficoll-Röhren wurden 23 ml des Buffy-coat langsam auf das im Röhren befindliche Ficoll gegeben (übergeschichtet), sodass 2 Phasen entstanden. Diese Röhren wurden nun zuerst bei 800 x g und Raumtemperatur über 30 Minuten zentrifugiert. Um einer Phasenvermischung entgegenzuwirken musste zuvor unbedingt die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet werden. Nach der Zentrifugation fand sich eine milchig-weiße Schicht im Röhren, in der die mononukleären Zellen des peripheren Blutes enthalten waren (PBMC: „peripheral blood mononuclear cells“). Diese Schicht wurde nun vorsichtig mit einer 10 ml Pipette aus allen zuvor zentrifugierten Röhren entnommen und je Buffy Coat in einem weiteren 50 ml Röhren gesammelt. Diese Zellsuspension wurde anschließend zweimalig mit PBS („phosphate buffered saline“) gewaschen und für 10 min bei 160 x g und 4°C zentrifugiert. Um noch enthaltene Erythrozyten zu entfernen wurden 10 ml des Erythrozyten-Lyse-Puffer hinzugegeben, für 10 min auf Eis inkubiert und dann wie zuvor erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert und eine Zellzählung in einer Newton-Zählkammer vorgenommen. Von den ausgezählten Zellen wurden 50 Millionen in 2 ml Eppendorf-Tubes („tubes“) verteilt und anschließend erneut zentrifugiert. Es entstand je 2 ml Eppendorf-Tube ein Zellpellet aus 50 Millionen mononukleären Zellen, welches weiterverarbeitet werden konnte.

### 3.2.2 CD14+ Isolation

Das wie oben beschrieben gewonnene Zellpellet, bestehend aus insgesamt ca. 50 Millionen Zellen, wurde nun in 400  $\mu$ L MACS-Puffer (entspricht 80  $\mu$ l je  $10^7$  Zellen) aus eigener Herstellung resuspendiert, anschließend wurden 100  $\mu$ L CD14-MicroBeads (entspricht 20  $\mu$ l je  $10^7$  Zellen) hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde gut durchgemischt und für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Microbeads selektiv an CD14+ Zellen binden. Um überschüssige, ungebundene Beads herauszuwaschen, wurde anschließend 1 ml MACS-Puffer hinzugegeben und die Suspension für 10 min bei 300 x g und  $-4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dann in 500  $\mu$ L MACS-Puffer resuspendiert. Unter sterilen Bedingungen wurden nun der Separator und die MS-Columns („Säulen“) der Firma Miltenyi Biotec vorbereitet. Die einzelnen Säulen wurden mit 500  $\mu$ L MACS-Puffer befeuchtet, die Zellsuspension auf die Säule gegeben und anschließend dreimal langsam mit 500  $\mu$ L MACS-Puffer nachgespült, um die unmarkierten Zellen herauszuwaschen. Jene Zellen, die zuvor mit den CD14-MicroBeads markiert wurden, wurden durch magnetische Kräfte in der Säule zurückgehalten (Abb.11). Die Säulen mit diesen Zellen wurden nach dem dritten Waschschrift aus dem Magnetfeld entfernt und auf ein neues Eppendorf-tube („Collection-tube“) gesetzt, anschließend wurde unverzüglich 1000  $\mu$ L MACS-Puffer auf dieses tube gegeben. Der im Kit mitgelieferte Kolben wurde vorsichtig auf die Säule gesetzt und langsam hinuntergedrückt. Der Durchfluss war nun milchig-trüb und enthielt alle markierten Zellen. Diese wurden nun erneut bei 300 x g und  $-4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml Kultur-Medium (RPMI mit 2% humanem AB-Serum) resuspendiert und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte eine erneute Zellzahlbestimmung in der Newton-Zählkammer, diese entsprach nun der Anzahl der CD14+ Zellen. Anschließend wurde eine adäquate Menge RPMI-Medium (mit 2% humanem AB-Serum) hinzugegeben, so dass die Zellsuspension auf eine gewünschte Anzahl Platten bzw. Wells verteilt werden konnte. Je nach vorhandener Zellzahl wurden pro 10 cm Zellkulturplatte etwa 7 Millionen Zellen, pro Well einer 6-Well Platte etwa 2,5 Millionen Zellen verwendet. Auf die Platten wurde vorher eine adäquate Menge (z.B. 3 ml pro Well einer 6-Well-Platte) Medium (mit 2% humanem AB-Serum) gegeben, welches mit M-CSF versetzt wurde (in einer Endkonzentration von 83 ng/ml), wodurch eine Differenzierung in Makrophagen

erreicht werden sollte. Es folgte eine Inkubation über 5 Tage bei 37°C, am 3. Tag nach Isolation wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt.

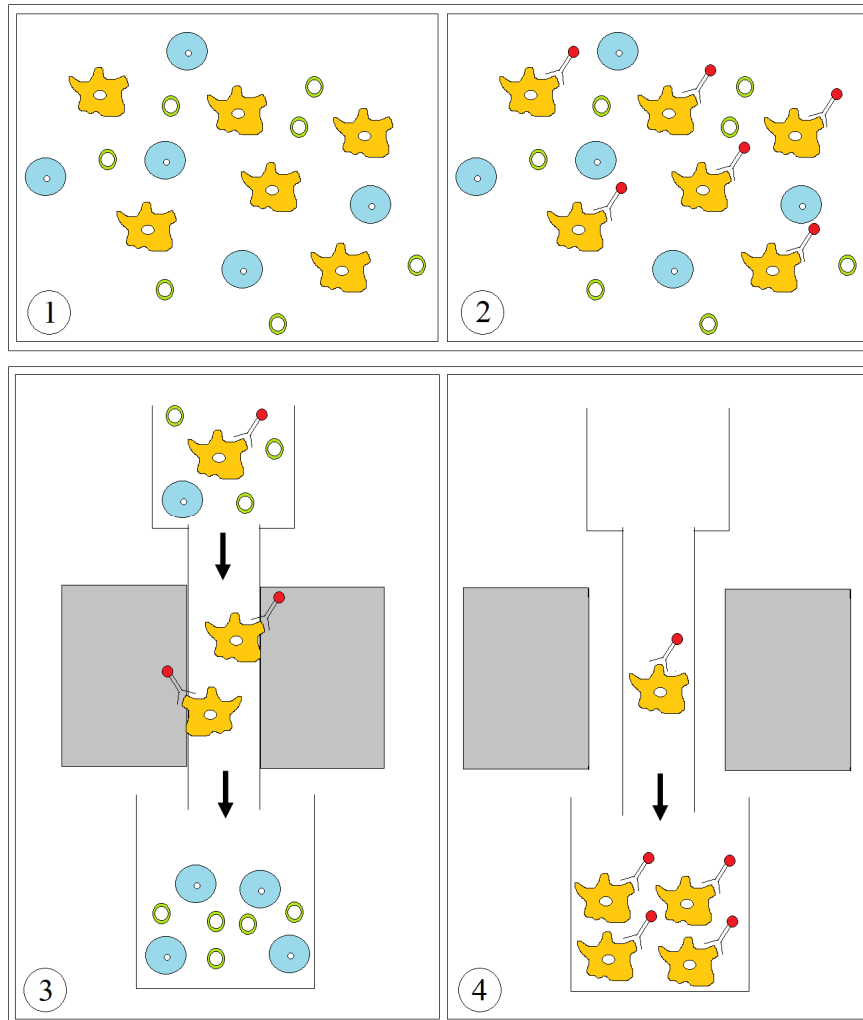


Abb.11. Magnetische Separation von CD14+ Zellen. Die Zellen (1) werden mittels Beads markiert (2) und magnetisch aufgetrennt (3), anschließend werden die Magneten entfernt und die in der Säule verbliebenen Zellen herausgewaschen (4).

Während der 5 Tage andauernden Inkubation bei 37°C vollzog sich ein mikroskopisch nachweisbarer Wandel der zuerst runden, nicht adhärenen Zellen (Monozyten) an Tag 0 (Abb.12) zu spindelförmigen, adhärenen Zellen (Makrophagen) an Tag 5 (Abb.13). Am Ende der Inkubationszeit standen genug Makrophagen für die weiteren Experimente zur Verfügung.

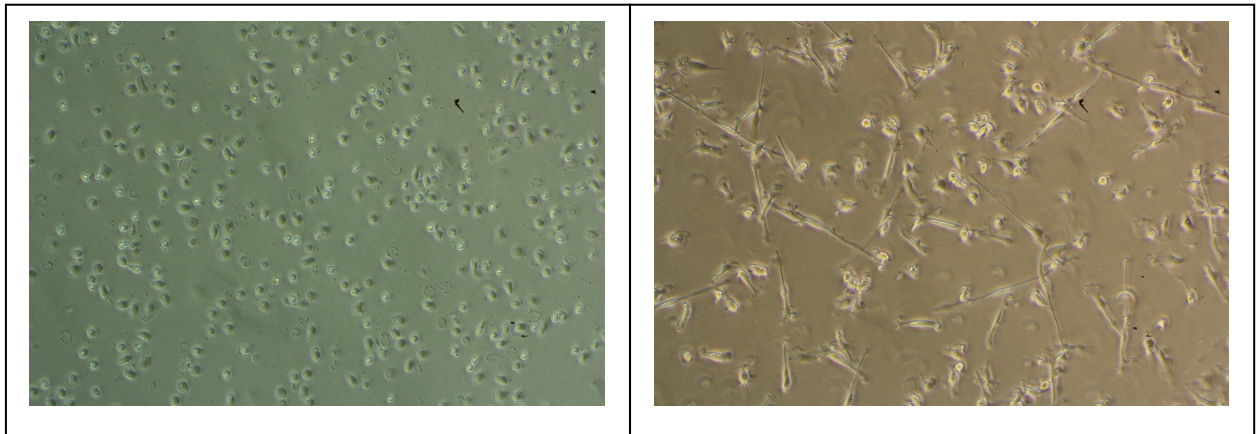


Abb.12: CD14+ Zellen an Tag 0

Abb. 13: CD14+ Zellen an Tag 5

### 3.2.3 Polarisation als Zeitversuch

Die Zytokine / Stimulanzen wurden wie folgt vorbereitet und bei -20°C gelagert:

Zytokin	Stammkonz	Zielkonz
LPS	1 µg/µl	100 ng/ml
IFN-γ	0,5 mg/ml	20 ng/ml
IL-10	10 ng/µl	20 ng/ml
IL-13	10 µg/ml	20 ng/ml
IL-4	10 µg/ml	20 ng/ml

Tab.2. Konzentrationen der verwendeten Zytokine

Je Zeitfaktor (2 / 4 / 8 / 24 h) wurden vier 15 ml Falcon-Röhrchen mit 3 ml Kultur-Medium (RPMI mit 2% humanem AB Serum) befüllt und wie folgt behandelt:

Probe	Stimulation mit	Volumen	Konzentration
1	Unbehandelt	---	---
2	IL-4 / IL-13	6 µL / 6 µL	Je 20 ng/ml
3	IL-10	6 µL	20 ng/ml
4	IFN-γ / LPS	1,2 µL / 3 µL	100 ng/ml + 20 ng/ml

Tab.3: Stimulation der Makrophagen mit Zytokinen im Zeitversuch

Die 6-Well-Platten mit den kultivierten Makrophagen wurden nun zweimal mit Medium gewaschen. Anschließend wurde der Inhalt eines Röhrchens jeweils in ein Well gegeben, für eine bestimmte Zeiteinheit (2 / 4 / 8 / 24 h) bei 37°C inkubiert und danach direkt mit QIAzol Lysis Reagent der Firma Qiagen lysiert. Es folgte die RNA-Isolation, mRNA-Synthese und die Durchführung einer Realtime-PCR (RT-PCR) mit verschiedenen Primern zur Bestimmung von mRNA-Profilen für die jeweiligen Stimulationszeiträume.

### **3.2.4 Polarisationsversuche**

Neben der Isolation und Kultivierung von Makrophagen in 10 cm Zellkulturplatten mussten mit einigen Tagen Vorlauf Überstände aus Panc1 gewonnen werden, um Exosomen zu erhalten, die für die Stimulation verwendet werden konnten. Hierfür wurden 2 verschiedene Verfahren genutzt: Die Gewinnung von 100ka Retentat und die Ultrazentrifugation.

#### a) 100ka Retantat

Zellen bestimmter Pankreaskarzinom-Zelllinie "Panc-1" wurden je Versuchsansatz auf zwei 10 cm Zellkulturplatten ausgesetzt und über 5 Tage in DMEM mit 10% FCS bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Platten mehrmals gewaschen und ab Tag 2 (hier war die Oberfläche der Platten zu etwa 60-70% bewachsen) in DMEM ohne Zusätze weiterkultiviert. An Tag 3 wurden die Platten erneut gewaschen und für weitere 48 Stunden (Tag 5) in je 10 ml DMEM ohne Zusätze inkubiert. Anschließend wurde der Überstand gewonnen und bei 1200 x g für 3 min abzentrifugiert, um Zellfragmente zu entfernen. Der Überstand wurde nun in einem 100kDa Centricon der Firma Millipore zentrifugiert (4000 x g, 10min, -4°C). Im Filter des Centricons sammelte sich dabei das 100 kDa Retentat („Exosomen“), welches herausgewaschen und gesammelt wurde. Der Durchfluss wurde als zusätzliche Kontrolle asserviert (Abb.14).

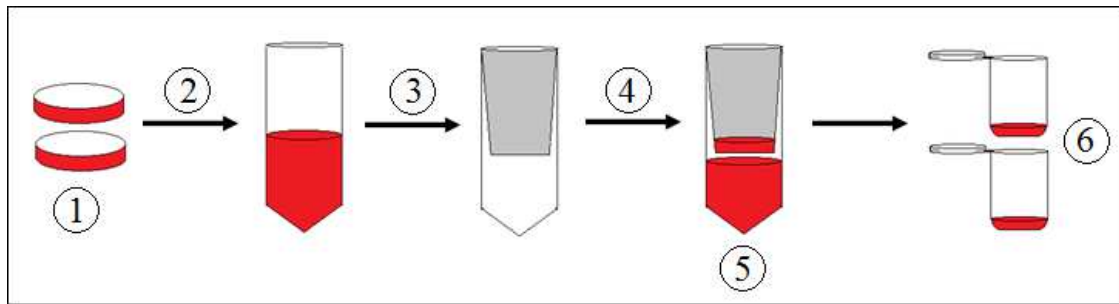


Abb.14: Überstandsgewinnung / Exosomengewinnung mittels 100 kDa-Centricon: Panc1 / IMIM PC1 Zellen werden auf 2 Platten ausgesät und in DMEM 10% FCS kultiviert (1). An den folgenden Tagen werden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gewaschen und anschließend in DMEM (pur) weiterkultiviert. Nach weiteren 48 Stunden wird das Medium gesammelt und zentrifugiert (2). Am Boden sammeln sich Zellfragmente, die verworfen werden. Das übrige Medium wird in einem 100kDa Centricon erneut zentrifugiert (3+4). Im Filter sammeln sich die 100kDa Retentate (5). Das Retentat im Filter und der Durchfluss werden gesammelt (6).

#### b) Ultrazentrifugation

Zu Beginn wurden je Versuchsansatz ausreichend viele Panc1-Zellen auf 14 Zellkulturplatten mit 10 cm Durchmesser verteilt und bei 37°C in DMEM mit 10% FCS inkubiert, bis die Oberfläche der Platten zu über 70% mit Zellen bewachsen war. Nun wurden die Platten dreimal gründlich mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und über weitere 4 Stunden in DMEM ohne Zusätze inkubiert. In der Zwischenzeit wurde folgendes Medium hergestellt: 150 ml DMEM ohne Zusätze mit 3 µL Hydrocortison, 750 µL Transferrin und 150 µL Insulin. Obige Platten wurden nach der Inkubation mit jeweils 10 ml dieses Mediums beschichtet und für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. In diesem Zeitraum wurden die Pankreaskarzinomzellen durch das hinzugegebene Medium zur Sekretion von Exosomen stimuliert. Das Medium, welches nun die sezernierten Exosomen enthielt, wurde anschließend gesammelt und für 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, wodurch sich größere Zellfragmente am Boden sammelten, die Exosomen jedoch im Überstand verweilten. Dieser Überstand wurde nun steril in ein Falcon-Röhrchen filtriert (0,2 µm Porengröße), um letzte Zellfragmente zu entfernen. Das verbleibende Medium wurde in 70 kDa Centricons überführt und bei 4000 x g für 15 min (4°C) konzentriert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (2 min bei 1200 x g, 4°C), um die konzentrierten Überstände wieder zu sammeln. Diese Überstände wurden nun für 90 min bei 120.000 x g und 4°C in einer Ultrazentrifuge (Beckmann L8-70M, Rotor SW40) zentrifugiert, dabei entstand ein kaum sichtbares Pellet („Exosomen“) am Boden, welches in 70 µL PBS resuspendiert wurde (Abb.15). Es erfolgte nun eine Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Methode.

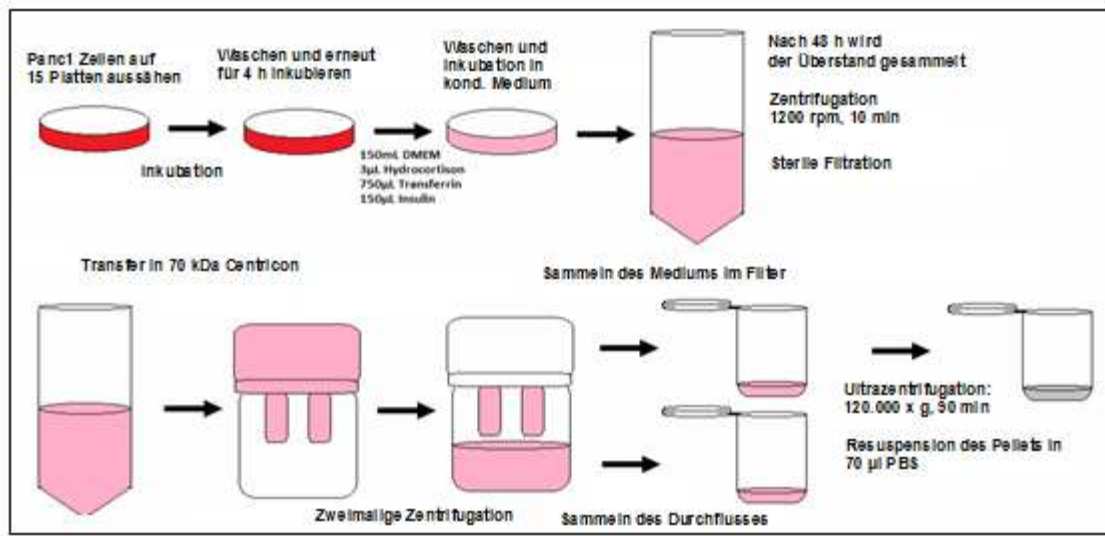


Abb.15: Überstandsgewinnung / Exosomengewinnung mittels Ultrazentrifugation (siehe Text)

Weitere, zur Stimulation benötigte Zytokine wurden wie folgt vorbereitet und bei -20°C gelagert:

Zytokin	Stammkonz	Zielkonz
LPS	1 µg/µl	100 ng/ml
IFN-γ	0,5 mg/ml	20 ng/ml
IL-10	10 ng/µl	20 ng/ml
IL-13	10 µg/ml	20 ng/ml
IL-4	10 µg/ml	20 ng/ml
TGFβ	1 µg/ml	10 ng/ml

Tab.4. Zytokine und deren Konzentrationen zur Stimulation im Polarisationversuch

Nach 5 Tagen Inkubation wurden acht 15 ml Rörchen (Falcon) mit 6 ml Kultur-Medium (RPMI mit 2% humanem AB Serum) befüllt und wie folgt behandelt:

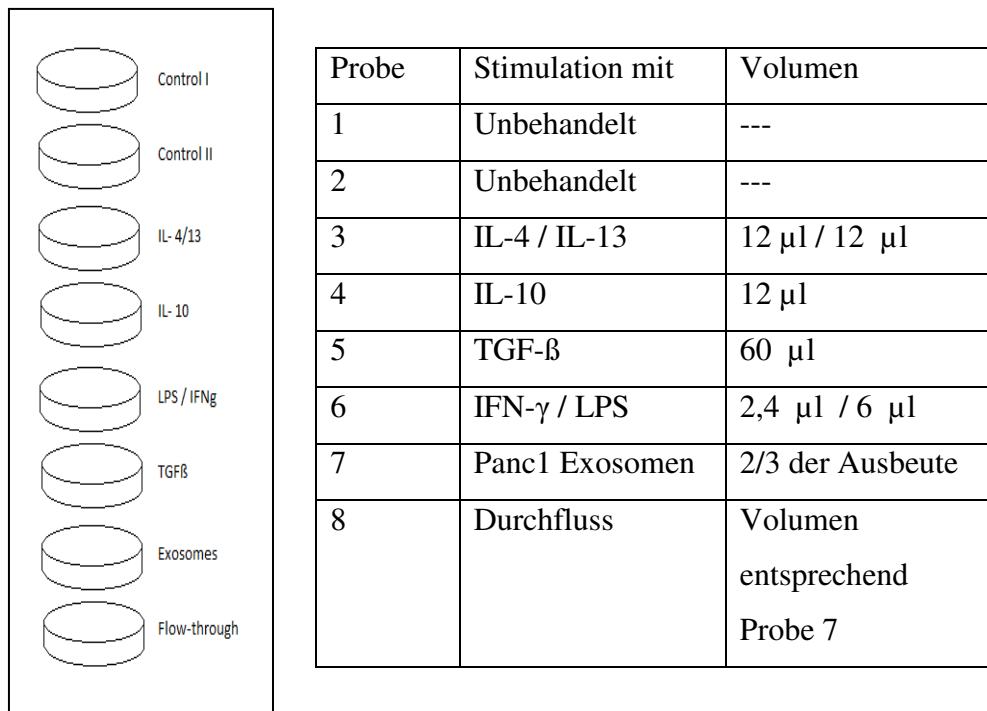


Abb.16: Versuchsaufbau der Stimulation

Die 10 cm Zellkulturplatten mit den kultivierten Makrophagen wurden nun zweimal mit RPMI-Medium gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Inhalt eines Röhrchens jeweils auf eine dieser Platte gegeben und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation, mRNA-Synthese und die Durchführung einer Realtime-PCR (RT-PCR) mit verschiedenen Primern zur Bestimmung von mRNA-Profilen.

### 3.2.5 Transfektion von Makrophagen mit mi-RNA (AMAXA)

- Voraussetzung:
  - Makrophagen nach 5 tägiger Inkubation in 10 cm Zellkulturplatten

#### Vorbereitung

- Makrophagen wurden mit PBS gewaschen
- 0,5 ng/mL Trypsin + 0,2 mg/mL EDTA in PBS (je Platte 3 ml)
- Inkubation über 25-30 min bei Raumtemperatur
- Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von RPMI gestoppt

### Transfektion

Pro Ansatz wurden benötigt:

- 700.000 Makrophagen nach 5 tägiger Inkubation
- 300 nM miRNA: pre-miR155, anti-miR155, pre-miR203, anti-miR203, Kontrollen
- 100 µL Human Macrophage Nucleofector Solution

Zuerst wurde eine 12-well Platte mit je 1,5 ml Kulturmedium (RPMI + 2% humanem AB-Serum) pro Well befüllt und im Inkubator bei 37°C inkubiert. Die (wie oben beschrieben) mit Trypsin-EDTA abgelösten Makrophagen wurden nun in einer Newton-Zählkammer gezählt und je 700.000 Zellen auf einen Reaktionsansatz verteilt. Diese Zellen wurden nun für 10 Minuten bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und im Pellet konzentriert, der Überstand wurde anschließend verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µl Nucleofection Lösung resuspendiert, anschließend wurde die miRNA hinzugegeben (1,5 µL in 1,5 ml → 300 nM). Diese Lösung wurde nun in die im Kit mitgelieferten Küvetten überführt, diese wurden verschlossen und nacheinander in das AMAXA Gerät gesetzt. Die Transfektion wurde mittels vorgegebenem Herstellerprogramm (Y-010) durchgeführt, indem die Zellen kurzzeitig einer Stromspannung ausgesetzt wurden. Hierdurch konnte die miRNA die Zellmembran passieren. Nach Entfernen der Küvette wurden 500 µL Medium hinzugegeben und die Zellsuspension in die vorbereiteten 12-Well Platten überführt. Diese wurden nun über 24 (48) Stunden inkubiert, die Zellen anschließend lysiert. Es folgte die RNA-Isolation, mRNA-Synthese und die Durchführung einer Realtime-PCR (RT-PCR) mit verschiedenen Primern zur Bestimmung von mRNA-Profilen.

### **3.2.6 Co-kultur mit PKH67-gefärbten Panc1-Zellen**

- Voraussetzung:
  - Makrophagen nach 5 tägiger Isolation
  - Mehrere Platten mit ausreichend Panc1 Zellen

In diesem Experiment erfolgte die Markierung von Zellen mittels PKH67, einem grün-fluoreszierendem Farbstoff, der sich in Zellmembranen anlagerte. An Tag 5 nach der

Isolation wurden die Makrophagen dreimalig mit RPMI gewaschen und mit ausreichend Kultur-Medium (RPMI + 2% humanem Serum) beschichtet. Die passenden Inserts wurden auf die Wells gesetzt, mit 1500  $\mu$ L Kultur-Medium (RPMI + 2 % humanem Serum) beschichtet und bei 37°C im Inkubator vorgewärmt. Die Panc1 (IMIM-PC1) Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und durch Hinzugabe von 2 ml Trypsin-EDTA von den Platten abgelöst. Nachdem sich alle Zellen gelöst hatten, wurde 8 ml DMEM mit 10% FCS hinzugegeben und je 2 Platten in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und insgesamt 5.000.000 entnommen. Diese wurden in einem 2 ml Eppendorf-Tube mit PBS gewaschen und 5 min lang bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 250  $\mu$ L Diluent C, einem speziellem Zellmedium, resuspendiert (Tube A). In einem weiteren Tube wurden 250  $\mu$ L Diluent C mit 1  $\mu$ L des Farbstoffes PKH67 vermischt (Tube B), ein anderes Tube wurde mit 500  $\mu$ L FCS befüllt (Tube C). Nun wurde der Inhalt von Tube A in Tube B überführt und 2 Minuten lang gut mit der Pipette gemischt.

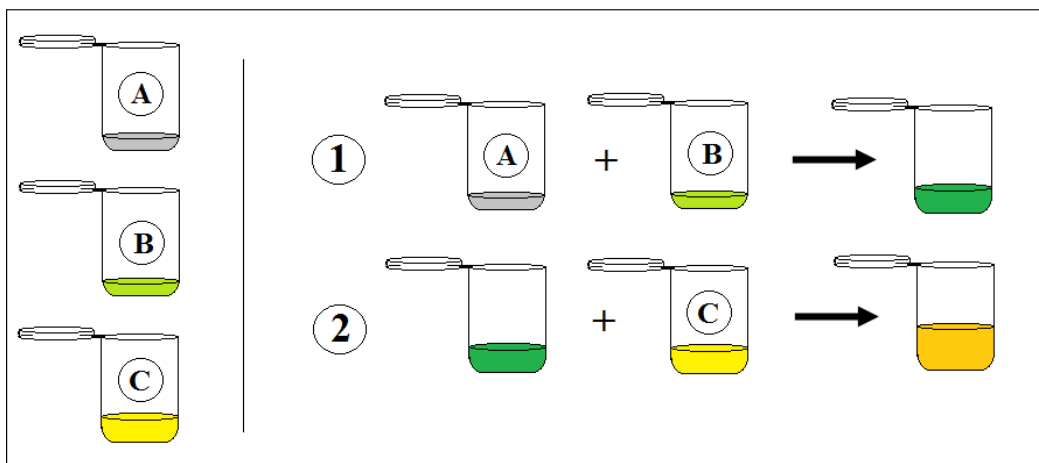


Abb.17: Durchführung der PKH67-Färbung (siehe Text)

Anschließend wurde diese Suspension in Tube C überführt und für 10 Minuten bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nun zweimal mit PBS gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und in einem kleinen Volumen mit Kultur-Medium (RPMI + 2% humanem Serum) resuspendiert. Die Zellen

wurden gezählt und 200.000 gefärbte Zellen in die Inserts gegeben, die zuvor auf die Wells mit den Makrophagen platziert wurden (Abb.18).

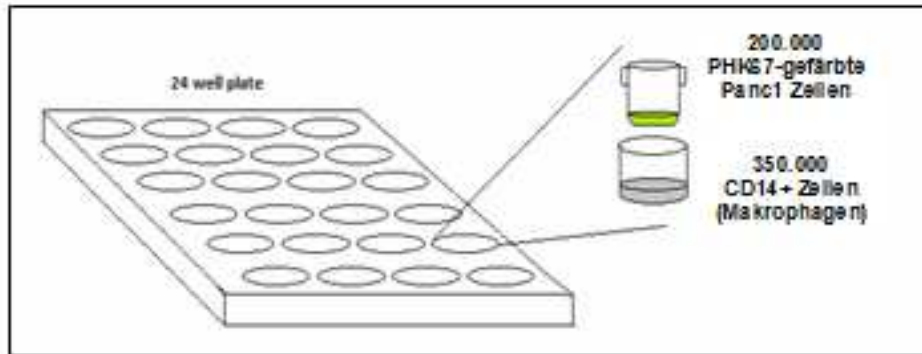


Abb.18: Versuchsaufbau Kokultur mit PKH67-gefärbten Panc1-Zellen und Makrophagen

Nach 2 tägiger Inkubation wurden die Zellen mit EDTA-Trypsin von der Oberfläche gelöst und mittels FACS-Analyse (s.u.) untersucht, ob - und in welchem Maße - eine Übertragung von PKH67-markierten Zellmembranbestandteilen stattgefunden hatte (siehe Abb.19). Dies könnte ein Hinweis auf die Entstehung von Exosomen in den Panc1-Zellen sein, welche im Laufe der Co-Kultur auf die Makrophagen übertragen wurden. Diese Vesikel entstehen aus sog. „budding“, d.h. sie bestehen aus Zellmembranbestandteilen, welche in diesem Experiment mit PKH67 markiert wurden und so, falls eine Übertragung stattgefunden hat, in den Makrophagen nachgewiesen werden konnten.

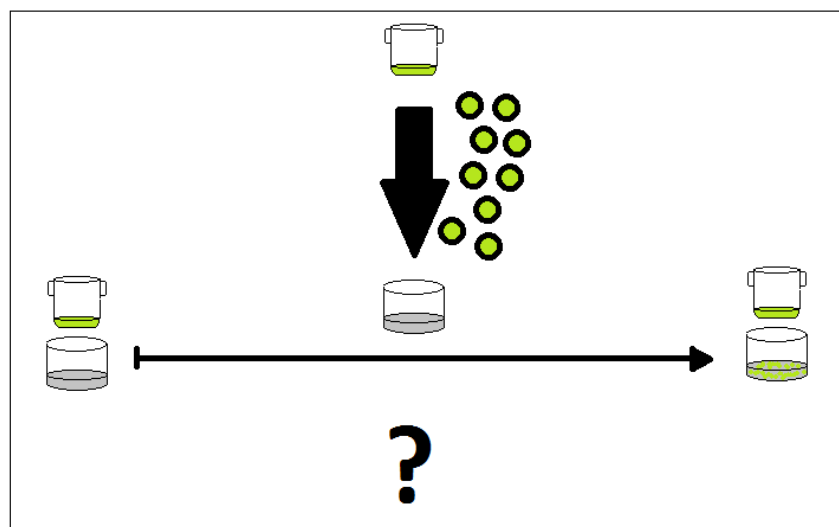


Abb.19: Exosomentransfer in Kokultur

### 3.2.7 Co-Kultur von polarisierten Makrophagen mit Panc1-Zellen

- Voraussetzung:
  - Drei 6-Well-Platten mit Makrophagen nach 5 tägiger Isolation
  - Mehrere Platten Panc 1 / IMIM-PC1

Die vorbereiteten Makrophagen wurden mit RPMI gewaschen und analog zu den vorangegangenen Experimenten stimuliert (s.o.). Die Stimulation erfolgte in Zweierpaaren, sodass je Versuchsansatz zwei Wells mit Makrophagen unter gleichen Konditionen vorhanden waren (Abb.20).

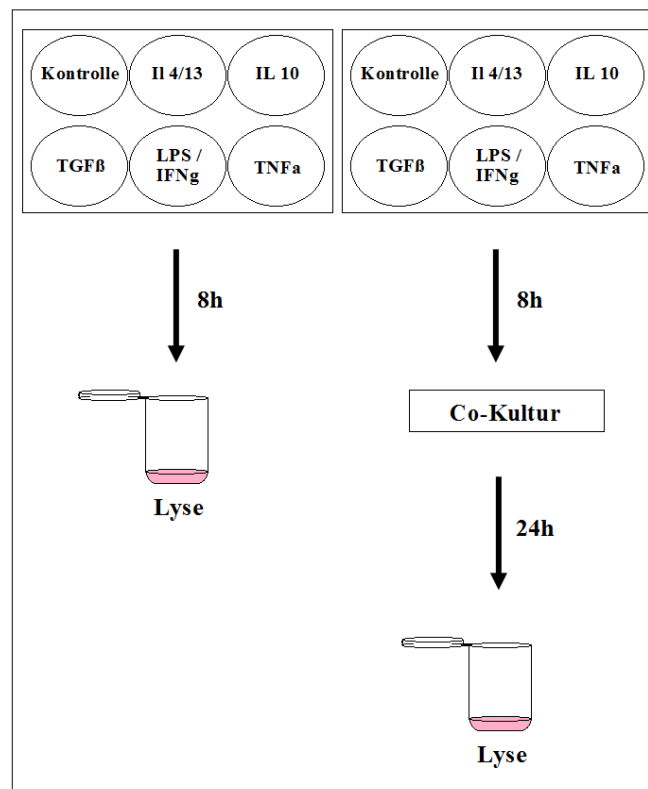


Abb.20: Versuchsdurchführung der Co-Kultur

Die Zellen wurden für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Eine Platte eines Versuchsansatzes wurde nun erneut mit RPMI gewaschen und anschließend mit Qiazol Lysis Reagent lysiert. Die zweite Platte wurde mit Panc1-Zellen co-kultiviert. Dazu wurde zuerst die zugehörige Platte des Versuchsansatzes ebenfalls mit RPMI gewaschen. Dann wurden je 300.000 Panc1-Zellen von vorbereiteten Zellkulturplatten mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche gelöst, gewaschen und auf passende Inserts verteilt. Je ein Insert wurde auf

das zugehörige Well der 6-Well-Platte gesetzt und über 24 Stunden bei 37°C inkubiert (Abb.21).

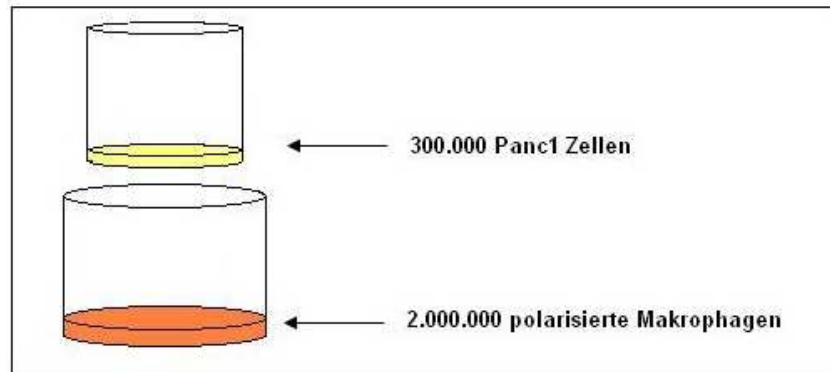


Abb.21: Versuchsaufbau Cokultur Panc1-Zellen mit polarisierten Makrophagen

So wurde mit allen Versuchsansätzen verfahren. Anschließend erfolgt die Lyse mittels Qiazol Lysis Reagent. Aus beiden Ansätzen wurde RNA gewonnen, cDNA synthetisiert und ein mRNA Profil mittels RT-PCR angefertigt. So konnte je Versuchsansatz die Polarisierung der Makrophagen zu Beginn der Cokultur nachgewiesen werden und anschließend die Auswirkung der Cokultur auf die vorausgegangene Polarisierung beurteilt werden (Abb.22).

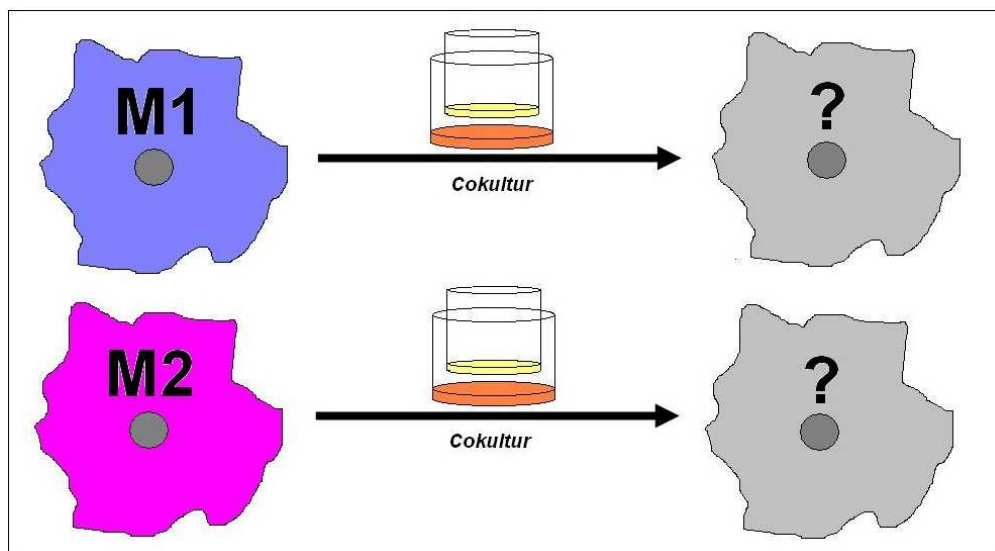


Abb.22: Auswirkung der Cokultur auf die Polarisation der Makrophagen

### 3.2.8 Co-Kultur mit miRNA-transfizierten Panc1-Zellen

- Voraussetzung:
  - Eine 6-Well-Platte mit adhärennten Makrophagen nach 5 tägiger Inkubation
  - Mehrere Platten Panc 1 / IMIM-PC1, zu 70-90% bewachsen

Die Transfektion mittels Silentfect stellte eine Alternative zur Transfektion via Elektroporation dar. Hier wurde eine Übertragung von miRNA's in die Zelle hinein durch chemische Reagenzien ermöglicht. In diesem Experiment wurden Pankreaskarzinomzellen mit miRNA transfiziert und anschließend eine Co-Kultur mit Makrophagen durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob dieses einen Einfluss auf die mRNA Profile der Makrophagen hatte.

Es wurden je Ansatz ein 1,5 ml und ein 2 ml Tube wie folgt vorbereitet:

- 1,5 ml Tube (Tube A):
  - 500 µl DMEM + 10 µl Silentfect
- 2 ml Tube (Tube B):
  - 500 µl DMEM + 10 µl miRNA (155, 155n, 203, 203n / neg / mock / cntrl)

Alle Tubes wurden nun vorsichtig im Vortex durchmischt. Anschließend wurde der Inhalt des A-Tubes in das B-Tube überführt, gut durchgemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Platten mit Panc1-Zellen, die transfiziert werden sollten, zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 9 ml DMEM befüllt.

Nach 20 min wurde nun je 1 ml aus den vorbereiteten Tubes auf eine Platte gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die transfizierten Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und in die bereitgestellten Inserts gesetzt. Diese wurden nun auf die Wells gesetzt, in denen sich CD14+ Zellen nach 5 tägiger Inkubation befanden. Nach weiteren 24-48 Stunden Cokultur wurden die transfizierten Zellen und die CD14+ Zellen lysiert. Wie gewohnt folgte die RNA-Isolation, mRNA-Synthese und die

Durchführung einer Realtime-PCR (RT-PCR) mit verschiedenen Primern zur Bestimmung von mRNA-Profilen.

### 3.2.9 Weitere experimentelle Methoden

#### Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammern durchgeführt. Hierzu wurden aus einer Zellsuspension ca. 10 µl entnommen, auf die Zählkammer gegeben und alle Zellen in den vier Quadraten gezählt. Der Mittelwert aus allen Quadraten wurde mit  $10^4$  multipliziert, wodurch man die Zellzahl pro ml erhielt.

#### cDNA-Herstellung (Superscript)

Je Probe wurden 0,5 µg RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Das hierfür nötige Volumen aus den RNA-Proben wurde in PCR-Röhrchen gegeben und jeweils auf 24 µL mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl Oligo dT [50µM] in jedes Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mittig in das PCR-Gerät gesetzt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Hierdurch wurde die Sekundärstruktur der RNA aufgelöst und Anlagestellen für die Primer offengelegt. In der Zwischenzeit wurde der Master-Mix je Probe wie folgt zusammengestellt:

<b>Substanz</b>	<b>Pro Probe [µL]</b>
<b>5x Puffer</b> (First-strand Buffer P/N Y02321)	8
<b>DTT</b> (P/N Y00147)	4
<b>dNTPs</b> (10mM) (#R0192, Fermentas)	2
<b>Superscript</b> (Invitrogen P/N 56575)	1
<b>Gesamtvolumen</b>	15

*Tab.5. Herstellung des Master-Mix zur Synthese von cDNA*

15 µl des Master-Mix wurden in jede Probe gegeben und gut vermischt. Das PCR-Gerät wurde erneut mittig beladen und wie folgt programmiert:

- 50 min bei 42°C
- 10 min bei 70°C
- Warten bei 4°C

Während dieser Reaktion lagerten sich die Primer an und die hinzugegebene Reverse Transkriptase synthetisierte aus den RNA-Strängen komplementäre cDNA-Stränge.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der Zellen nach Größe, Struktur und einzelnen Oberflächeneigenschaften aufgetrennt und somit analysiert werden können. Die Zellen treten dabei nacheinander durch einen Laserstrahl und es kommt zu einer Emission von optischen Signalen: Die hierbei entstehende Vorwärtsstreuung wird von einem Detektor gemessen und gibt Auskunft über die Größe der passierenden Zellen (Forwardscatter). Das zur Seite abgelenkte Licht wird durch einen weiteren Detektor gemessen (Sidescatter) und gibt Auskunft über die Oberflächenbeschaffenheit und Granularität der einzelnen Zellen, die den Laserstrahl passieren. Durch antikörpervermittelte Markierung der Zellen eröffnen sich weitere Möglichkeiten, um die Zellen aufzutrennen.

In meinen Experimenten kam vorwiegend die zuvor vorgestellte Methode mit PKH67-Markierung der Zellen zur Anwendung, bei der die Zellen schon in (Co-)Kultur angefärbt wurden und nach geeigneter Inkubationszeit mittels FACS-Analyse aufgetrennt wurden (s.o.).

#### Lyse

Die Platten wurden zweimal gewaschen, mit 700 µl Trizol lysiert und die Zellen mittels Cellscrapper von den Platten abgelöst. Das Lysat wurde in 1,5 ml Rörchen gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### Monozyten Isolation mittels Elutriation

Die Elutriation ist eine weitere Methode, mit der man Monozyten aus Buffy-Coats isolieren kann. Dem Elutriationsverfahren liegt das Prinzip der Gegenstromzentrifugation zugrunde. Dabei wirken zwei Kräfte auf das Zellgemisch, welches sich in der Elutriationskammer befindet: Die Zentrifugalkraft, die nach außen gerichtet ist und die Zentripedalkraft, die nach innen gerichtet ist. Befinden sich beide Kräfte in einem Gleichgewicht, so können Zellen bestimmter Beschaffenheit (z.B. Größe) in der Kammer konzentriert werden, während andere Zellen hinausgewaschen werden. Je nachdem, wie die einzelnen einwirkenden Faktoren gewählt bzw. verändert werden (Dichte, Temperatur, Viskosität, Rotorgeschwindigkeit, Strömungsgeschwindigkeit), können unterschiedliche Zellpopulationen in der Kammer konzentriert werden.

### RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem miRNeasy Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Hierzu wurde das zuvor gewonnene und bei -80 °C gelagerte Lysat langsam auf Eis aufgetaut und kurz im Vortex durchmischt, um es zu homogenisieren. Jeweils 700 µl des Lysats wurden auf eine „shredder column“ gegeben und eine Minute lang bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend in ein 2 ml Röhrchen überführt. Dies wurde so lange wiederholt, bis das gesamte Lysat verbraucht wurde, in der Regel war eine Wiederholung notwendig. Nun wurden 140 µl Chloroform zum Durchfluss hinzugegeben und für 15 Sekunden gut durchmischt, bis ein Farbumschlag festgestellt werden konnte. Daraufhin wurde das Gemisch für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen bei 12.000 rpm und 4°C über 15 Minuten zentrifugiert. Dabei entstand eine oben gelegene, wässrige Phase, die entnommen und in einem neuen 2 ml Röhrchen mit der 1,5-fachen Menge ihres Volumens mit Ethanol vermischt wurde. 700 µl dieser Mixtur wurden nun auf eine RNeasy Mini Spin column gegeben und für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Zentrifugationsschritt wurde mit jeweils 700 µl der Suspension so lange wiederholt, bis die gesamte Mixtur verbraucht war. Nun wurden 350 µl RWT-Puffer in die Säule hinzugegeben und diese erneut für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der gesamte Waschvorgang wiederholt. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben und

die Säule wurde erneut für 15 Sekunden zentrifugiert. Es wurde nun erneut mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen und die Säule wird bei 8000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde herausgenommen und in einem neuen Röhrchen bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert, um Reste der Puffer zu entfernen. Die Säule wurde nun aus dem Tube herausgenommen, auf ein neues 1,5 ml Röhrchen umgesetzt, 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser hinzugegeben und eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 8000 x g über 60 Sekunden. Hierbei wurde die RNA aus dem Filter der Säule gelöst und im Durchfluss gesammelt. Die Säule konnte nun entfernt und verworfen werden, die Röhrchen wurden über kurze Zeit auf Eis gelagert, während die Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop durchgeführt wurde. Dabei wurden je 1,5  $\mu$ l der Probe auf den Sensor gegeben und gemessen.

#### qRT-PCR

Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerten cDNA-Proben wurden 1:10 verdünnt (2  $\mu$ l Probe + 18  $\mu$ l RNase-freies Wasser). Anschließend wurde je verwendetem Primer ein Master-Mix wie folgt vorbereitet:

<b>Sywer-Green</b>	260 $\mu$ L
<b>Primer Forward</b>	5,2 $\mu$ L
<b>Primer Reward</b>	5,2 $\mu$ L
<b>Wasser</b>	223,6 $\mu$ L

*Tab.6. Herstellung des Master-Mix zur Durchführung der RT-PCR*

Die Primer wurden in Triplets (später Duplets) auf eine 96-Well-Platte ausgelegt: Je Probe wurden 12 Slots benötigt, in welche jeweils 19  $\mu$ l des jeweiligen Master-Mix und 1  $\mu$ l Probe pipettiert wurden. Je Durchlauf einer RT-PCR wurden 4 Primer verwendet. Dazu 7 cDNA-Proben und eine Wasserprobe. Die Platte wurde versiegelt, kurz zentrifugiert (bis 1000 rpm) und schließlich in die RT-PCR gesetzt. Das Programm wurde wie folgt gestartet:

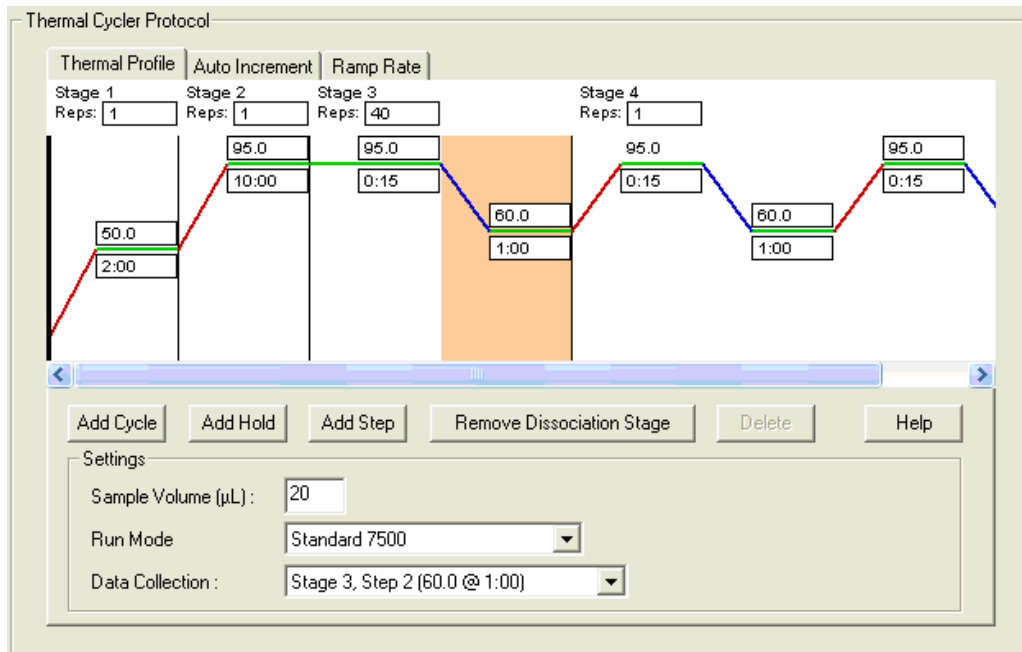


Abb.23. Thermal Cycler Protokoll: Screenshot der Einstellungen

Nach etwa 200 Minuten konnte die Auswertung mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgen. Dabei wurden je Probe Mittelwerte gebildet und diese mit dem sog. „Haushalts-Gen“ RPLP0 in Korrelation gesetzt, welches in dieser Arbeit immer als Referenz-Gen diente. Anschließend wurde der Kehrwert des Quadrats gebildet ( $=1/\text{POTENZ}(2;x)$ ), um die Unterschiede zu verdeutlichen. Dieses Ergebnis ließ sich nun grafisch unter Verwendung von Microsoft Excel darstellen.

### Zellkultur

Die verwendeten Pankreaskarzinom-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien kultiviert, dies erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen und -schalen. Sobald die Zellen einer Charge eine Konfluenz von über 70% aufwiesen wurden diese mittels PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA von der Oberfläche abgelöst. Die Zellen wurden nun in ein steriles Röhrchen überführt und in diesem bei 1200 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde resuspendiert und die gewünschte bzw. benötigte Zellzahl in neue Kulturgefäße überführt.

### **3.2.10 Statistische Methoden**

Dargestellt wird, sofern nicht anders angemerkt, der Mittelwert und die Standardabweichung. Ein Zweiseitiger ungepaarter Student's t-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet.

## 4 Ergebnisse

### ***4.1 Kultivierung und Polarisation von Monozyten***

Die Entwicklung eines Verfahrens, mit welchem ausreichende Mengen an vitalen Monozyten aus Buffy Coats gewonnen werden konnte, war sehr aufwändig und zeitintensiv. Anfänglich wurde versucht eine ausreichende Ausbeute durch direkte Abnahme an Probanden zu erzielen. Hierzu wurden im Eigenversuch und bei freiwilligen Probanden Blut in EDTA Monovetten abgenommen, mittels Dichtegradientenverfahren aufgetrennt und anschließend in RPMI 1640 mit 10% FCS über 7 Tage kultiviert. Mikroskopisch ließ sich schnell erkennen, dass nur wenig Material gewonnen werden konnte und dass viele Zellen nicht adhärent wurden. Auch auf RNA-Ebene lag die Ausbeute meist unter 20 ng/µl. Durch eine Kooperation mit dem Transfusionszentrum des Universitäts-Klinikums Gießen-Marburg, Standort Gießen, konnten wir im weiteren Verlauf Buffy Coats aus Spenderblut beziehen. Es hat sich gezeigt, dass das Material zeitnah, d.h. direkt nach Lieferung verarbeitet werden sollte, um eine möglichst große Anzahl an vitalen Monozyten zu erhalten. In den ersten Versuchen wurden noch Präparationen verwendet, die zunächst mehrere Stunden bei +4°C gelagert worden waren. Dabei zeigte sich, dass bei der weiteren Verarbeitung deutlich weniger Zellen adhärent wurden und somit nicht brauchbar waren, als bei sofortiger Verarbeitung. Deshalb versuchten wir fortwährend, die Monozytenisolation fast nahtlos nach Abnahme am Spender zu vollziehen. Die geschätzte extrakorporale Lagerung der Monozyten vor Isolationsbeginn belief sich hierbei optimalerweise auf weniger als 3 Stunden.

Im weiteren Verlauf wurde versucht, die Monozytenisolation und Makrophagendifferenzierung weiter zu optimieren. Hierbei wurden verschiedene Isolationsverfahren (Elutriation, CD14-Isolation mittels MicroBeads) getestet und ein Protokoll erstellt, mit dem eine reproduzierbare Isolation von vitalen Monozyten möglich war.

Die aus dem Buffy-Coat gewonnenen Monozyten wurden in dieser Arbeit zunächst mittels Elutriation isoliert. Die oben erwähnte relativ kurze extrakorporale Haltbarkeit der Monozyten ohne Kulturmedium verschuldete wahrscheinlich auch die schlechten

Ergebnisse der Monozytenisolation durch diese Methode. Aufgrund technischer und logistischer Schwierigkeiten mussten die Zellen hierbei deutlich länger gekühlt werden, was sich auf deren Vitalität auswirkte. Es gelang dabei nicht ausreichend viel Material zu gewinnen. Aufgrund dessen etablierten wir in Zusammenarbeit mit einer anderen Arbeitsgruppe (Michl et al.) die Isolation der Monozyten via MicroBeads, mit der es uns im weiteren Verlauf gelang genügend vitales Material zu isolieren.

Desweiteren wurden für die Kultur der Monozyten verschiedene Platten (Nunc, Primaria, Zellkulturplatten), verschiedene Kulturmedien (RPMI 1640, DMEM, X-Vivo), verschiedene Zusätze (FCS, AB-Serum) in verschiedenen Konzentrationen (FCS 10%, AB-Serum 5%, AB-Serum 2%) und verschiedene Inkubationszeiträume (5 Tage, 7 Tage) getestet. Zuletzt wurden für die Polarisation verschiedene Stimulationszeiträume (2h, 4h, 8h, 24h) und eine Stimulation mit bzw. ohne m-CSF getestet und miteinander verglichen. Die Polarisation zu M1 / M2 wurde mittels folgender Zytokine durchgeführt:

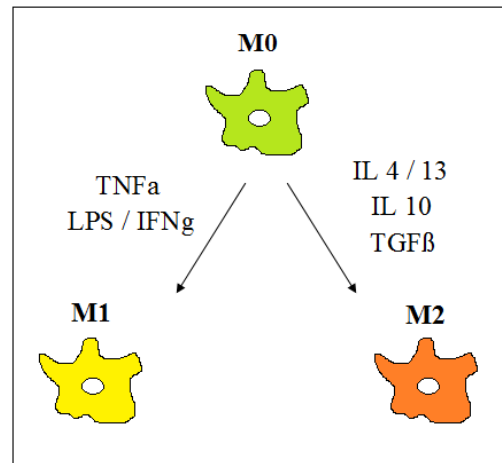


Abb. 24. Polarisation der Makrophagen

Es zeigte sich, dass die beste Ausbeute unter folgender Konstellation zu erzielen war:

- Verwendung von „frischen“ Buffy Coats nach möglichst kurzer Lagerung
- PBMC-Isolation mittels Ficoll nach optimiertem Protokoll
- CD14 Isolation mittels MicroBeads nach optimiertem Protokoll
- Kultur der Monozyten über 5 Tage in RPMI 1640 mit 2 % humanem AB-Serum und 83 ng/ml MCSF in 6-Well-Platten (Falcon)
- Stimulation in RPMI 1640 mit 2 % humanem AB-Serum

## 4.2 Polarisation als Zeitversuch

Das Ziel dieses Experimentes war die Erstellung eines mRNA-Profiles von polarisierten Makrophagen, in dem sich zeigen sollte, wann im Laufe der Polarisation die Expression polarisationstypischer Marker erhöht ist. Dies sollte dazu dienen, einen Zeitpunkt festzulegen, an welchem die Makrophagen gut in M1 und M2 differenziert werden können. Dieses Experiment wurde aufgrund des Umfangs nur einmalig durchgeführt und besitzt ausschließlich einen richtungsweisenden Charakter.

Um zuerst einen Überblick zu erhalten, wie sich die Expression verschiedener Genprodukte über einen gewählten Zeitraum von 24 Stunden verändert, wurden CD14+ Monozyten isoliert und über 5 Tage kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden über einen Waschschrift entfernt, die übrigen Zellen wurden nun stimuliert, um eine Polarisation in Richtung Makrophagen vom Typ M1 oder M2 zu bewirken. Dazu nutzten wir IL-4/-13 (20 ng/ml; 20 ng/ml), IL10 (20 ng/ml), LPS / IFN- $\gamma$  (100 ng/ml; 20 ng/ml) und eine Kontrollgruppe, die nicht stimuliert wurde. Nach 2, 4, 8 und 24 Stunden wurden jeweils Zellen lysiert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde eine Realtime-PCR durchgeführt. Hierzu wählten wir Primer für verschiedene mRNAs aus, die größtenteils bereits in früheren Publikationen als M1- bzw M2-Marker beschrieben wurden (*Mantovani et al. 2004*), darunter Mannose-Rezeptor, CD36, CXCL9, CCL5, CCL13 und CCL17. In diesem Versuch zeigte sich, dass nach 8 Stunden eine gute Unterscheidung zwischen M1 und M2 Makrophagen möglich ist. Dabei führte eine Stimulation mit LPS / IFN- $\gamma$  und somit eine Polarisation zum M1-Phänotyp zu Überexpressionen von CXCL9 und CCL5. Im Gegensatz dazu führte ein Stimulation mit IL-10 und somit eine Polarisation zum M2-Phänotyp zu einer Überexpression von Mannose-Rezeptor und CD36 wobei insbesondere die Expression von CXCL9 keinen Anstieg zu verzeichnen hatte. Eine Stimulation mit IL-4/-13 (ebenfalls M2) führte zu einer Überexpression von CCL13 und CCL17.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Experimente als Standard festgelegt, die Stimulation der Makrophagen über einen Zeitraum von 8 Stunden durchzuführen und anschließend eine Analyse der Genexpressionen der polarisierten Zellen durchzuführen.

### **4.3 Polarisationsversuche**

Aufbauend auf den rein orientierenden Ergebnissen des vorangegangenen Zeitversuchs folgten nun Versuche, in denen die Auswirkung einer Stimulation von Makrophagen mit behandelten Überständen von Pankreaskarzinomzellen untersucht wurde. Diese wurden mit Makrophagen verglichen, welche zuvor mit Zytokinen behandelt wurden und so zu M1 bzw. M2 Makrophagen polarisiert wurden.

In den ersten Experimenten dieser Arbeit erfolgte die Stimulation mit 100kDa Retentat. Dabei wurden die Makrophagen nach 7 Tagen Inkubation über insgesamt 48 Stunden stimuliert.

Dabei wurde zunächst die Expression von CD36, CXCL9 und Mannose-Rezeptor betrachtet (Abb.27). Als Kontrollen dienten Makrophagen, die mit IL-10, IL4/13 und TGF $\beta$  (M2), sowie LPS/ IFN- $\gamma$  (M1) polarisiert wurden. Es zeigte sich eine veränderte Polarisation der Makrophagen durch die Einwirkung von 100kDa Retentat bzw. dem dabei gewonnenem Durchfluss. So führte eine Stimulation mit Panc1-Durchfluss etwa zu einer Überexpression von Mannose-Rezeptor (Abb.27-3), die wir ebenso bei M2 polarisierten Makrophagen beobachten können. Weitergehend kam es zu einer Überexpression von CXCL9 (Abb.27-2), jedoch in anderen Dimensionen, als es bei M1 polarisierten Makrophagen zu beobachten ist. Die Expression von CD36 (Abb.27-1) verändert sich im Vergleich zur Kontrolle nur gering, im Vergleich zu M1 polarisierten Makrophagen (LPS/ IFN- $\gamma$ ) kann man aber von einer Überexpression sprechen.

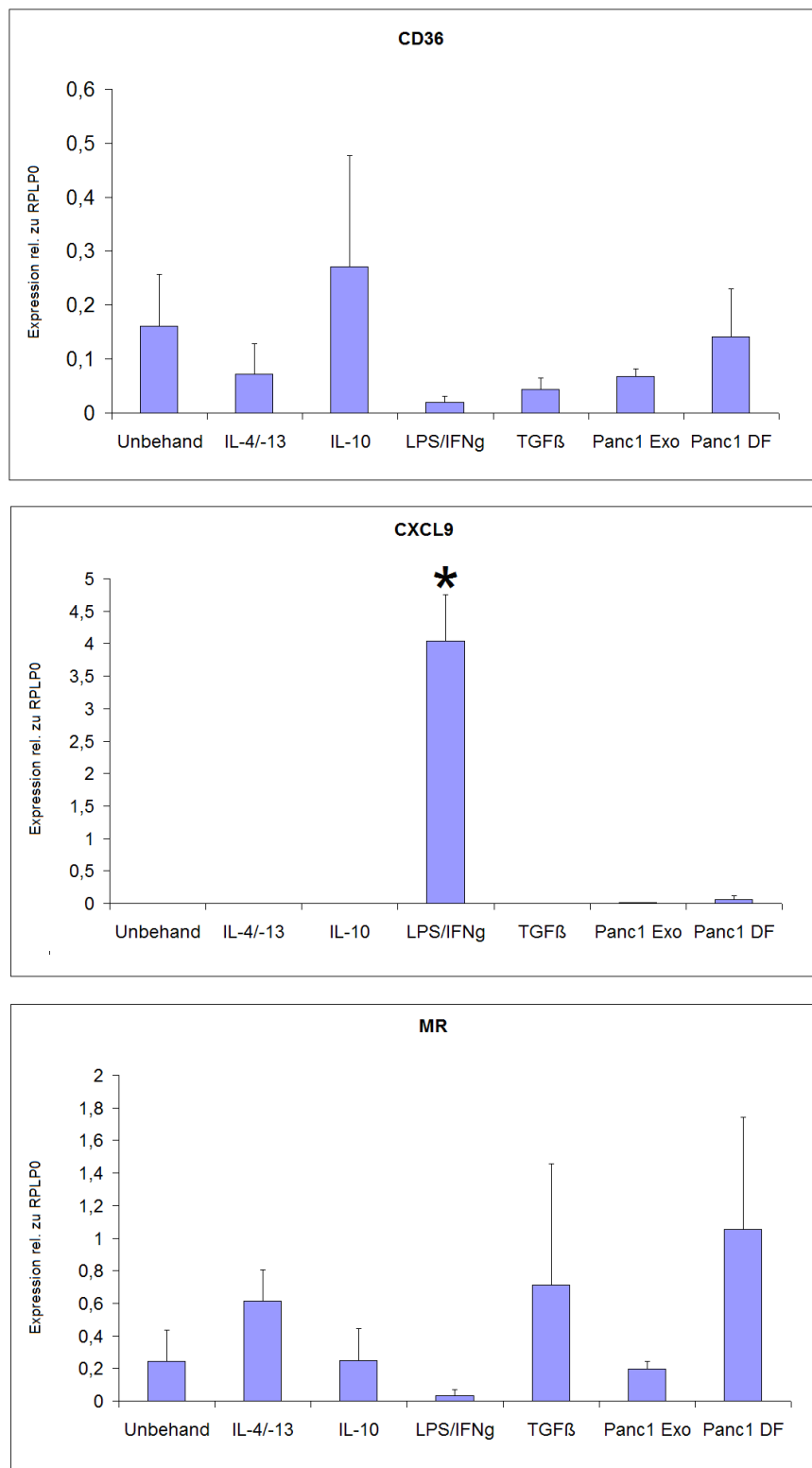


Abb.25. mRNA-Profile (qRT-PCR, n=3) nach Stimulation von Makrophagen mit verschiedenen Zytokinen (x-Achse). Die Berechnung erfolgte nach  $\Delta\Delta C_t$ -Methode in Korrelation zum "Haushalts-Gen" RPLP0 (y-Achse). CD36 und Mannose-Rezeptor dienten hierbei als M2-Marker, CXCL9 als M1-Marker. Es zeigte sich eine erhöhte Expression aller drei Marker durch den Einfluss von Panc1-DF, dieser ist bei den M2-Marker deutlicher stärker ausgeprägt als bei dem M1-Marker. ( $p < 0,5$  \* |  $p < 0,01$  \*\* |  $p < 0,001$  \*\*\*; Student's t-Test)

Bei Stimulation mit 100 kDa Retentat aus Panc1-Zellen kam es zu einer verringerten Expression von CD36 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vergleicht man den Wert jedoch mit M1 polarisierten Makrophagen, so zeigte sich immer noch eine Überexpression. Die Expression von CXCL9 war im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, im Vergleich zu M1 polarisierten Makrophagen jedoch stark supprimiert (Abb.28). Zuletzt veränderte sich die Expression von Mannose-Rezeptor im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kaum, im Vergleich zur gereinigten Durchfluss-Kontrolle war sie jedoch stark erniedrigt.

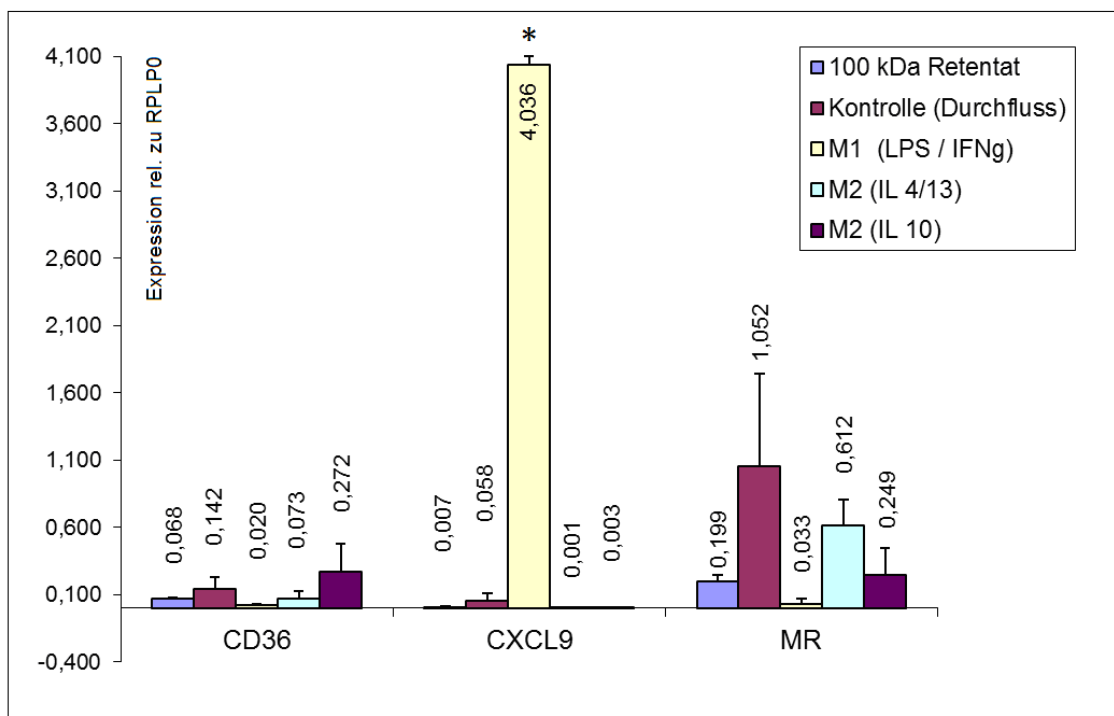


Abb.26. Polarisation mittels 100kDa-Retentat (qRT-PCR, n=3). Die Berechnung erfolgte nach  $\Delta\Delta Ct$ -Methode in Korrelation zum "Haushalts-Gen" RPLP0 (y-Achse). CD36 und MR dienten als M2-Marker, CXCL9 als M1-Marker (x-Achse). Es zeigt sich eine erhöhte Expression von MR und CD36 unter dem Einfluss der Kontrollgruppe (Durchfluss aus der Herstellung von 100kDa-Retentat).

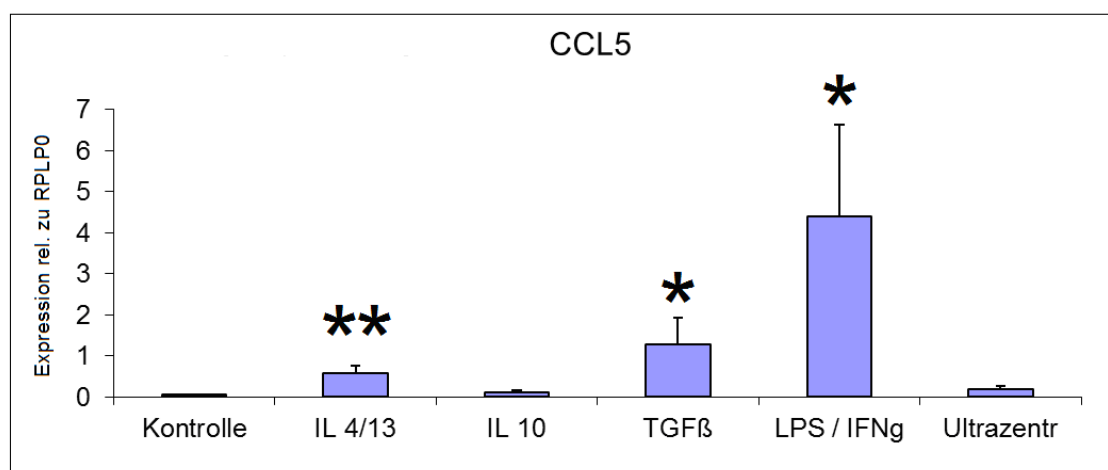
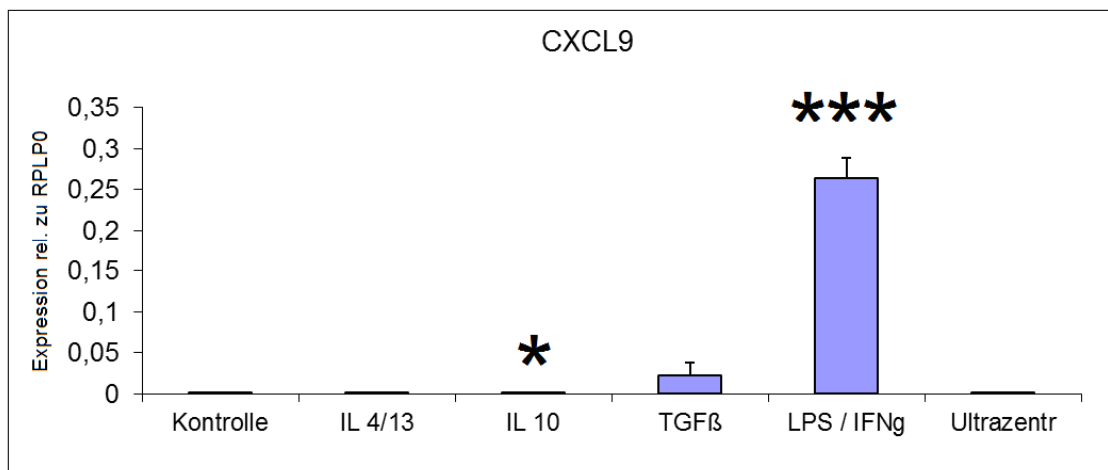
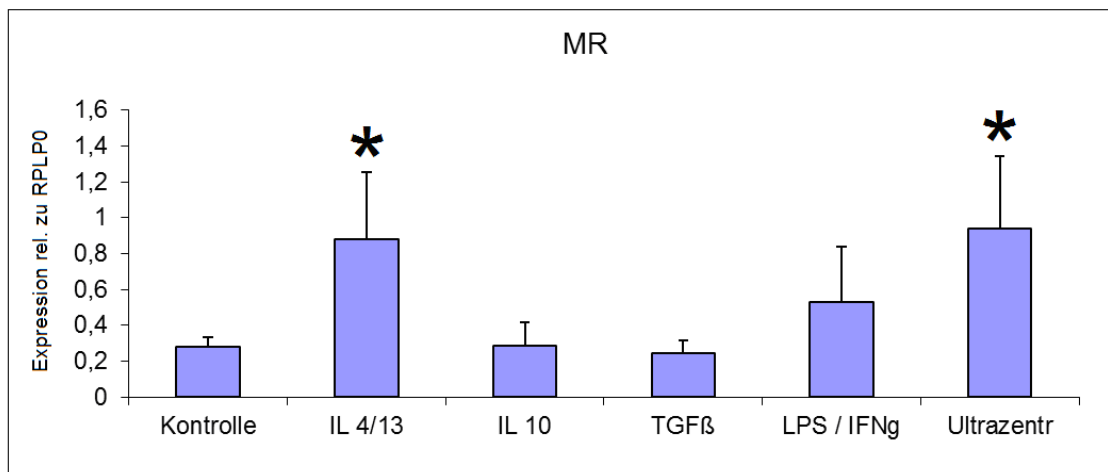
Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass eine Stimulation mit 100 kDa Retentat nicht zu einer signifikanten Polarisation zu M2-Makrophagen führte. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit der Kontrollsubstanz (Durchfluss) zu einer stark erhöhten Expression von Mannose-Rezeptor, welcher auch bei M2-Makrophagen zu erwarten gewesen wäre.

Ursächlich für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte eine unzureichende Reinheit des Retentats gewesen sein. Aufgrund dessen wurde die Stimulation in den folgenden Experimenten mit Material durchgeführt, das ebenfalls aus dem Überstand von Pankreaskarzinom-Zellen gewonnen wurde, jedoch mittels Ultrazentrifugation konzentriert wurde (Abb.29). Dies sollte eine höhere Konzentration und auch eine höhere Reinheit an Material gewährleisten. Als Vergleichsgruppen dienten Makrophagen, die mittels IL 4/13, IL 10, TGF $\beta$  und LPS/IFN $\gamma$  polarisiert wurden, sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe.

Dabei zeigte sich, dass eine Stimulation mit Ultrazentrifugat von Panc1-Karzinomzellen eine Polarisation in Richtung M2 auslösen konnte. Als zuverlässiger Marker haben sich hier Mannose-Rezeptor und CCL17 erwiesen: Die Expression von MR stieg nach IL 4/13 Stimulation (M2) sowie ebenfalls unter Stimulation mit Ultrazentrifugat statistisch relevant an, während eine LPS / IFN- $\gamma$  Stimulation zu keiner signifikanten Polarisation der Zellen. Ebenso kam es unter der Stimulation mit IL 4/13 neben einer erhöhten Expression von CCL17 zu einer gesteigerten Expression unter dem Einfluss von Ultrazentrifugat, während die LPS / IFN $\gamma$  Stimulation und die Kontrolle keine erhöhte Expression zu verzeichnen hatte (Abb.29-5). Auch die Expression von CCL13 (Abb. 29-4) zeigte einen deutlichen Anstieg unter Stimulation sowohl mit IL 4/13 als auch Ultrazentrifugat, letzteres jedoch nicht statistisch relevant.

Auch die Expression des Mannose-Rezeptors verzeichnete einen Anstieg nach Behandlung mit Ultrazentrifugat, dies lässt sich auch durch Stimulation mit IL 4/13 bewirken (Abb.29-1).

Im Gegensatz dazu kam es unter dem Einfluss von LPS / IFN- $\gamma$  zu einer stark erhöhten Expression von CXCL9, während der Anstieg von CXCL9 unter dem Einfluss des Ultrazentrifugats im Vergleich zur Kontrollgruppe keine gesteigerte Expression auslöste (Abb.29-2). Auch die Expression von CCL5 ließ sich durch Einwirkung von Ultrazentrifugat nicht steigern (Abb.29-3).



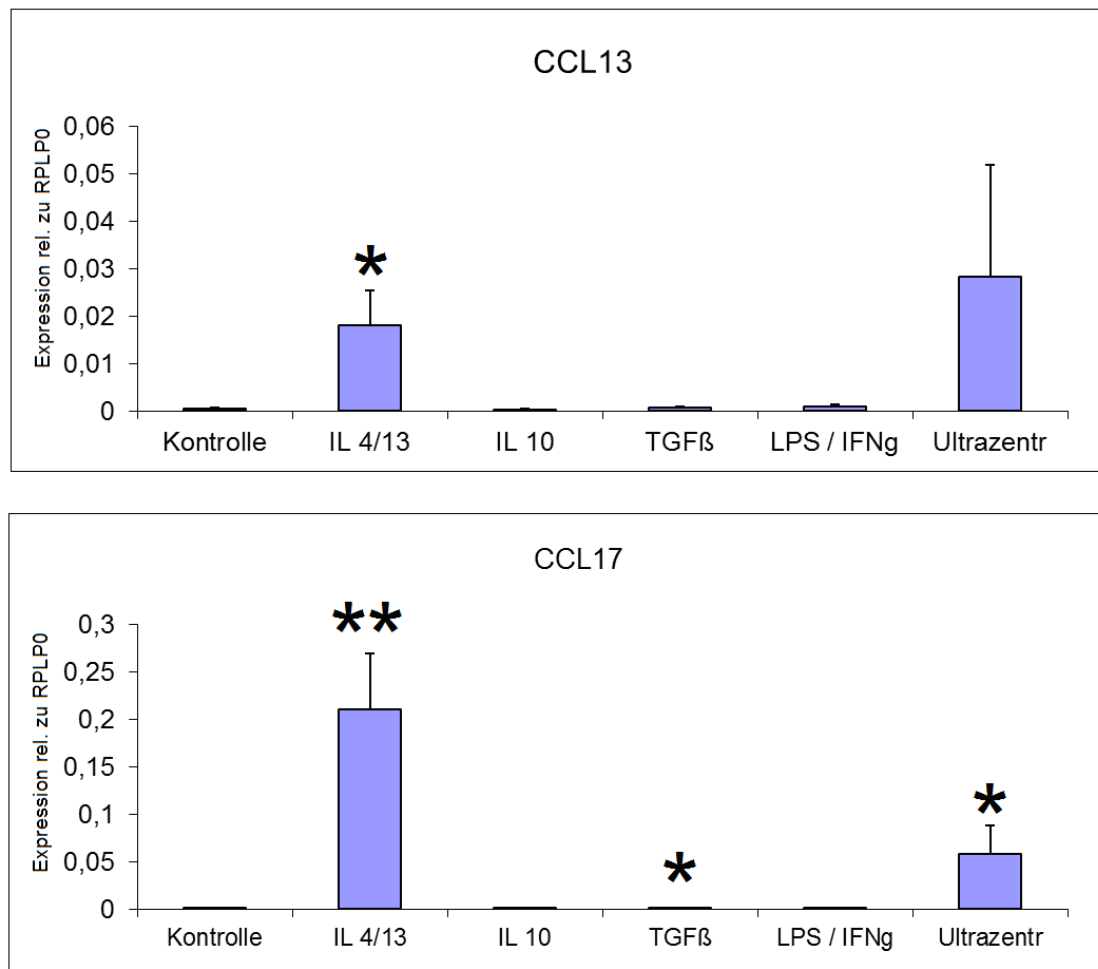


Abb.27. mRNA-Profil (qRT-PCR, n=3) von Makrophagen nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen sowie Ultrazentrifugat, gewonnen aus Panc1-Zellen (x-Achse). Die Berechnung erfolgte nach  $\Delta\Delta Ct$ -Methode in Korrelation zum "Haushalts-Gen" RPLP0 (y-Achse). Als M1-Marker dienten CXCL9 und CCL5, als M2-Marker Mannose-Rezeptor, CCL13 und CCL17. Die Behandlung mit Ultrazentrifugat führt zu einer Polarisation in Richtung des M2-Subtyps. ( $p < 0,5$  \* |  $p < 0,01$  \*\* |  $p < 0,001$  \*\*\*; Student's t-Test)

Somit konnte demonstriert werden, dass die Behandlung mit Ultrazentrifugat, welches aus Überständen von Pankreaskarzinomzellen gewonnen wurde, zu einer M2-Polarisation von Makrophagen führte, wohingegen es nicht zur Expression von M1-typischen mRNAs kam.

#### 4.4 Transfektion mit miRNA mit AMAXA

In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob die Einbringung von miRNA in Makrophagen eine Auswirkung auf die Polarisierung dieser Zellen hat. Auch nach wiederholter Transfektion von primären Makrophagen, welche vorher als Monozyten aus Buffy-Coats gewonnen und anschließend kultiviert wurden, kam es jedoch zur raschen Apoptose der Zellen. Es konnten keine brauchbaren Ergebnisse erzielt werden.

Um die Auswirkung der Transfektion mittels Elektroporation auf die Vitalität der Zellen zu prüfen wurde beispielhaft ein Versuch durchgeführt, bei dem Monozyten von einem Spender in zwei Gruppen aufgeteilt wurden: Eine Gruppe wurde mittels AMAXA-Elektroporation mit miRNA transfiziert, die andere Gruppe wurde genau wie die Transfektionsgruppe behandelt, jedoch nicht transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation im Brutschrank wurden Fotoaufnahmen angefertigt (Abb.30).

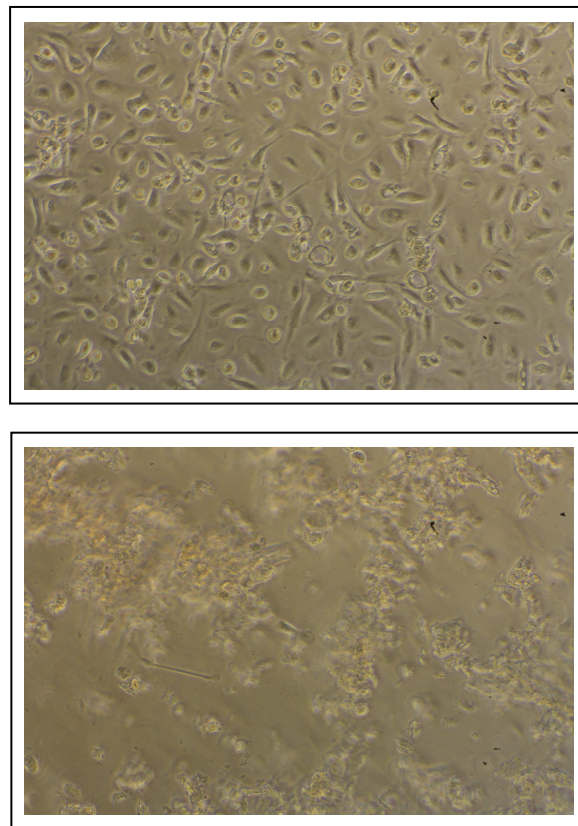


Abb 28. Mikroskopische Darstellung der kultivierten Makrophagen. Oben: Native Makrophagen. Unten: Makrophagen nach Transfektion von miRNA mittels AMAXA-Elektroporation.

Hier zeigte sich, dass die nicht-transfizierten Zellen wieder adhären geworden sind und einen vitalen Eindruck machten, während die transfizierten Zellen nicht adhären wurden und sich stattdessen Zellklumpen mit abgestorbenen Zellen bildeten. Es machte hierbei keinen Unterschied mit welcher miRNA die Transfektion durchgeführt wurde. Es zeigte sich dieses Bild bei allen verwendeten miRNA, mit denen die Transfektion durchgeführt wurde. Somit kann geschlossen werden, dass die Transfektionsprozedur selbst die Zerstörung der Zellen bewirkte.

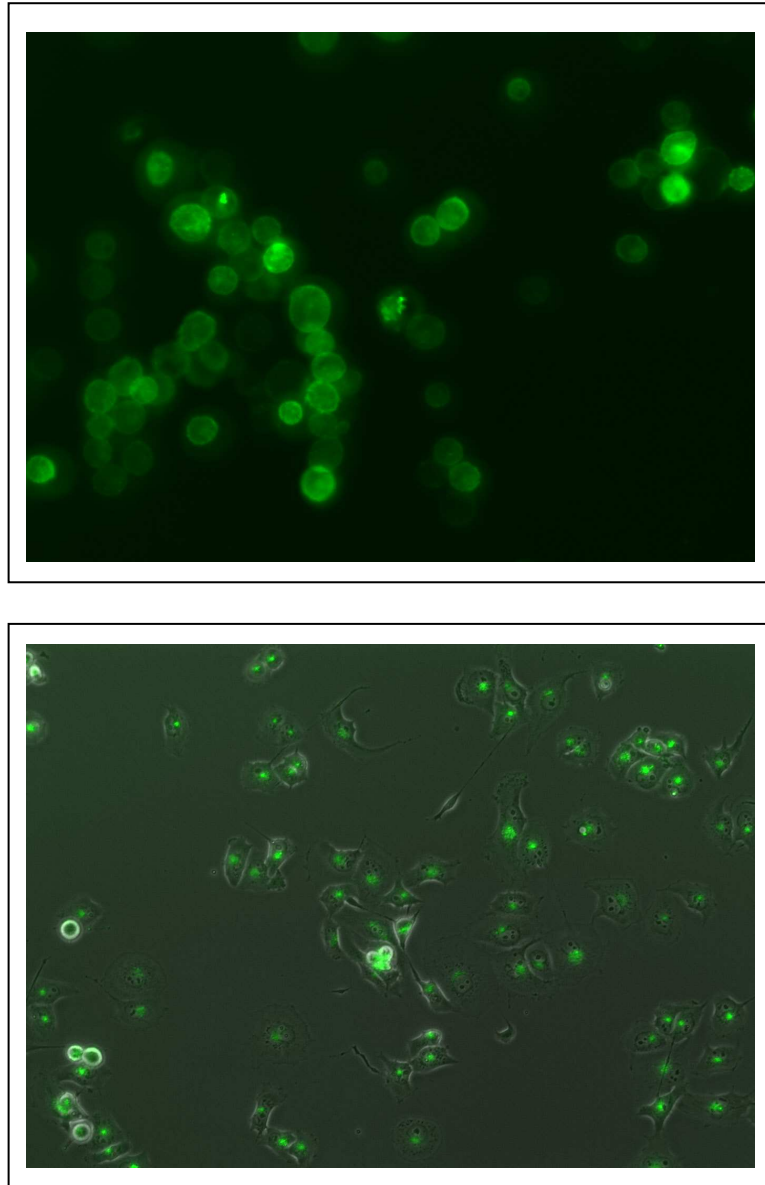
Aufgrund dessen wurde dieser Versuchsaufbau nach mehreren vergeblichen Versuchen aufgegeben und in Folge eine indirekte Herangehensweise, bei der Pankreaskarzinomzellen zunächst mit mi-RNAs transfiziert wurden und diese anschließend mit Makrophagen co-kultiviert wurden, intensiver untersucht (siehe unten).

#### **4.5 Cokultur mit PKH67-gefärbten Panc1-Zellen**

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob eine Übertragung von Molekülen aus Pankreaskarzinom-Zellen auf Makrophagen möglich ist. Zuerst wurde untersucht, ob die Markierung der Panc1-Zellen mit dem aliphatischen Fluoreszenz-Farbstoff PKH67, der sich vorwiegend in Lipidmembranen anreichert, erfolgreich war. Hier zeigte sich eine deutliche Anfärbung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb.31).

Anschließend wurde mit diesen Zellen eine Co-Kultur mit Makrophagen über 48 Stunden durchgeführt. Mittels FACS-Analyse wurde dann geprüft, ob es zu einer Übertragung von markierten Membranpartikeln auf die Makrophagen gekommen war (Abb.32). Hierzu wurden verschiedene Proben analysiert: Gefärbte Panc1-Zellen aus den Inserts (Positiv-Kontrolle), ungefärbte Makrophagen (Negativ-Kontrolle), sowie Makrophagen nach Co-Kultur mit gefärbten Panc-1-Zellen. Es zeigte sich, dass etwa 80% der mit PKH67 behandelten Panc1 Zellen positiv (=markiert) waren, unter den ungefärbten Makrophagen fanden sich hingegen keine positiven Zellen. Unter den Makrophagen, die mit PKH67-markierten Panc1-Zellen co-kultiviert wurden, konnte

man hingegen mehrere Signale erkennen (entsprechend 3,2 % der Zellen), die für markierte Membranpartikel sprechen.



*Abb.29: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Panc-1-Zellen, die mit PKH67 markiert worden sind, 12h und 48h nach Cokultur.*

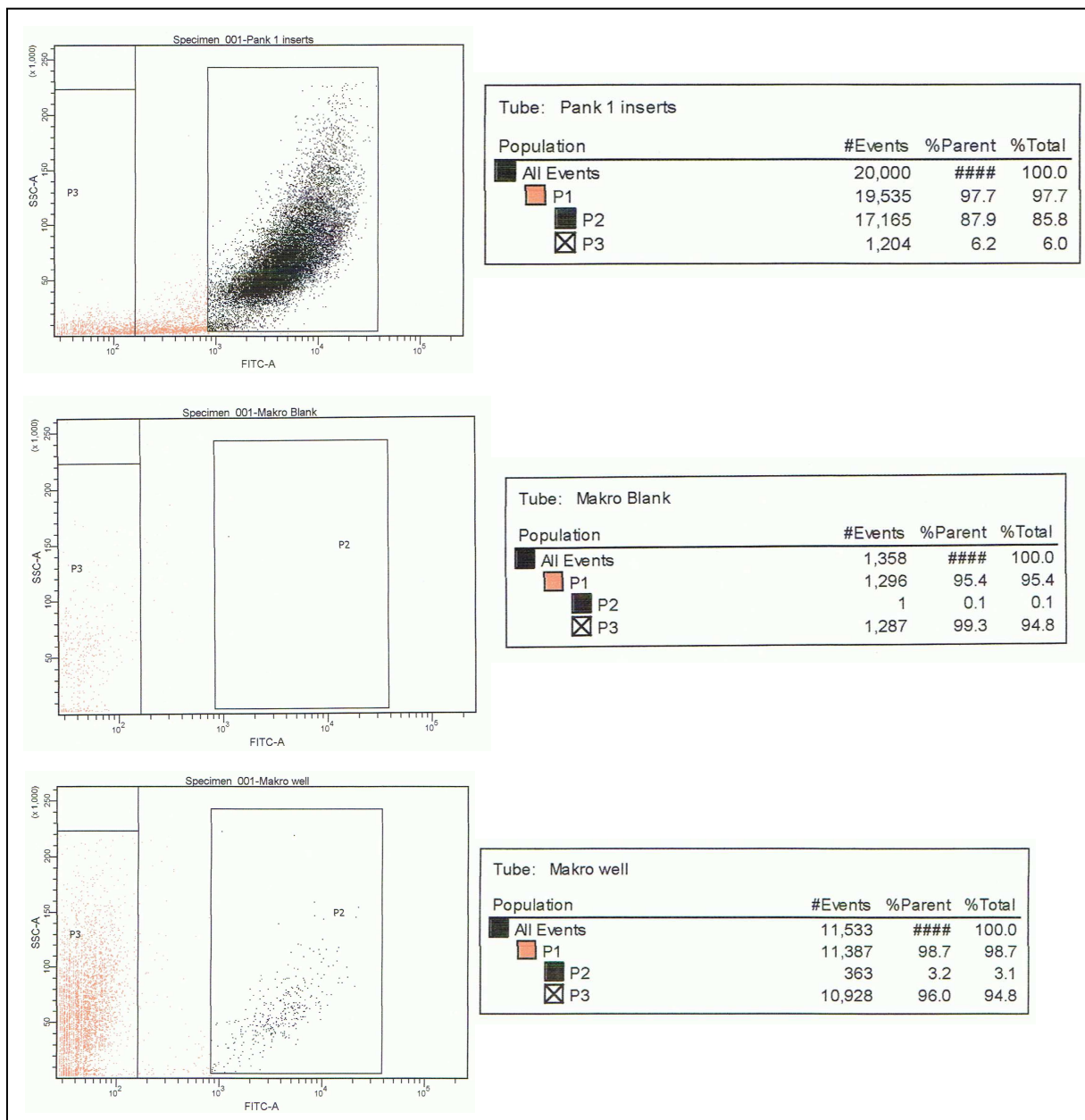


Abb.30: FACS-Analyse einer Co-kultivierung von PKH67-markierten Panc1-Zellen (Spender) und Makrophage. (Empfänger). Oben: Mit PKH67 markierte Panc1-Zellen (Positivkontrolle), insgesamt 20.000 Signale. Mitte: Ungefärbte Makrophagen (Negativkontrolle, 0,1 % der Zellen. Unten: Markierte Makrophagen nach Cokultur mit markierten Panc1-Zellen, 3,2 % der Zellen. Durch die Co-Kultivierung kam es zur Übertragung von markierten Zellmembranbestandteilen von Panc-1-Zellen auf Makrophagen.

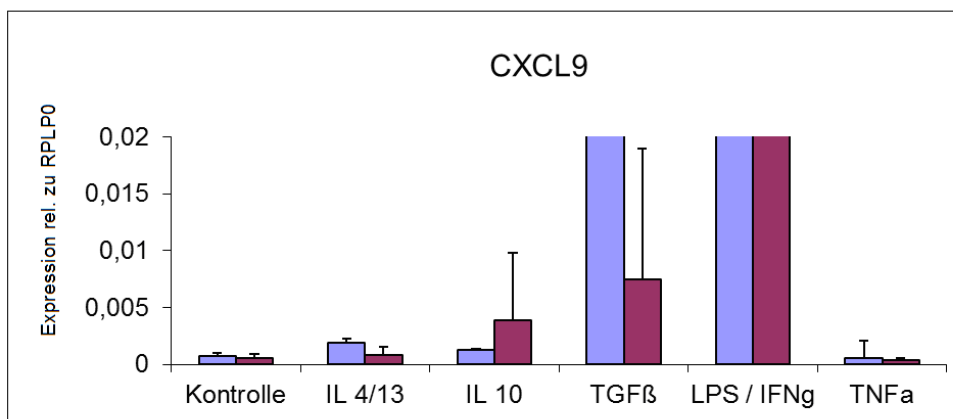
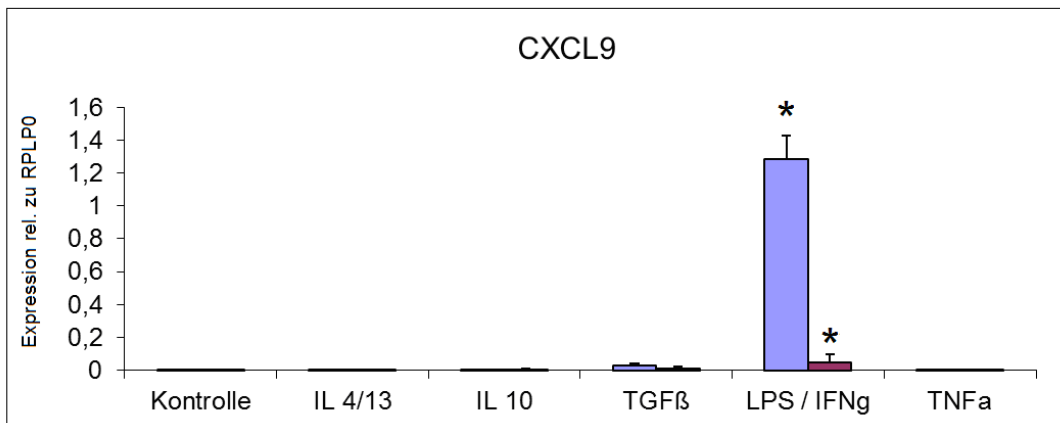
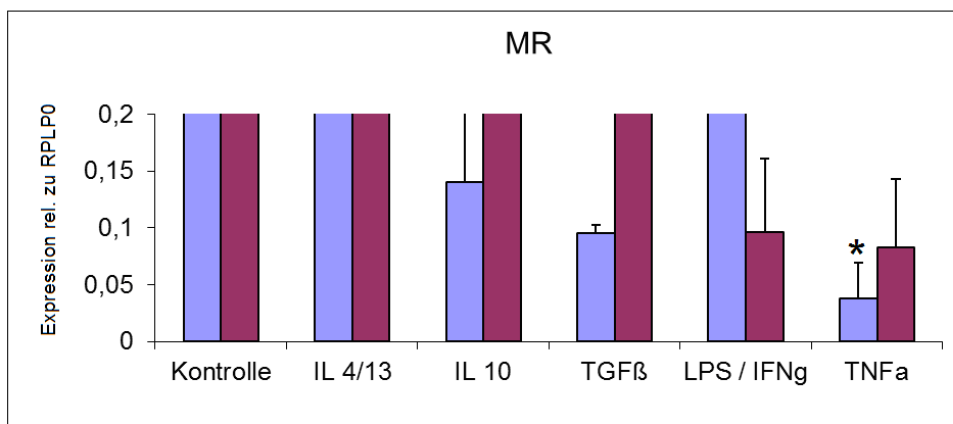
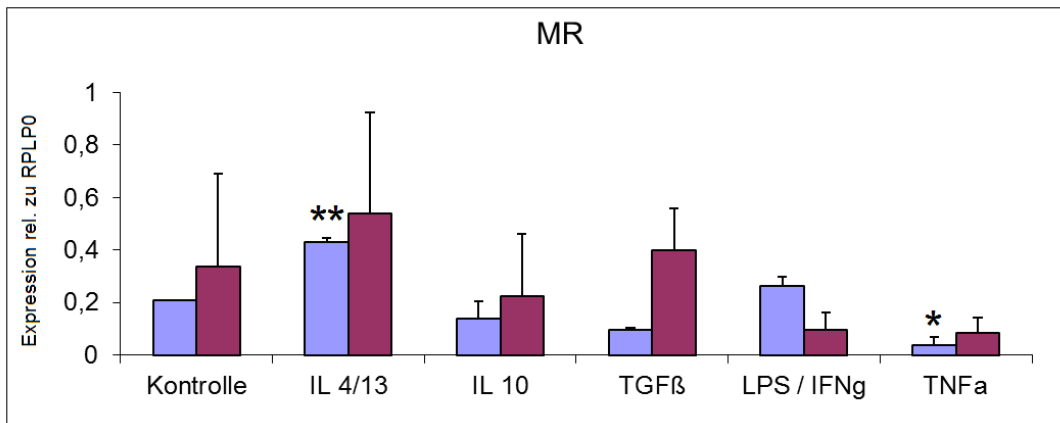
Somit konnte geschlussfolgert werden, dass es ausgehend von den Panc-1 Zellen zu einer Übertragung von Partikeln gekommen ist, die durch eine Membran mit einer 0,4  $\mu\text{m}$  Porengröße hindurch diffundieren konnten und anschließend von Makrophagen aufgenommen wurden. Da sich der Farbstoff PKH67 in Zellmembranen anreichert, handelt es sich bei den übertragenen Molekülen also um Membranbestandteile - es könnte sich also um Mikrovesikel handeln, welche klein genug sind, um durch die Poren der Membran zu gelangen. (*Fitzner et al. 2011, Katakowski et al. 2010*)

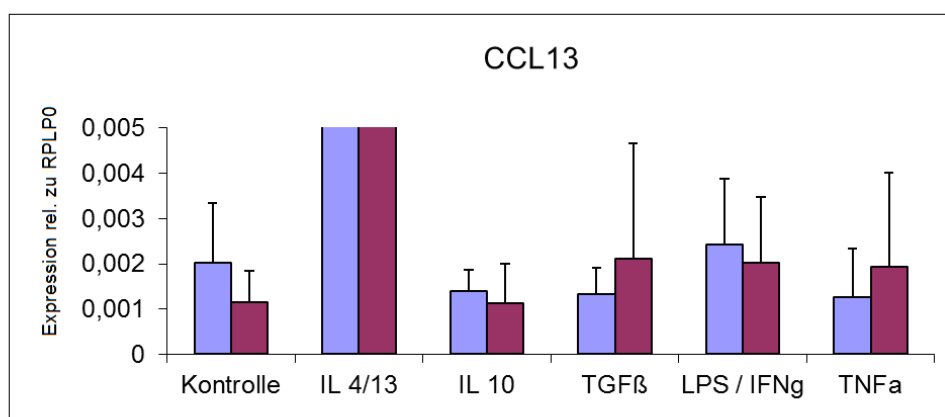
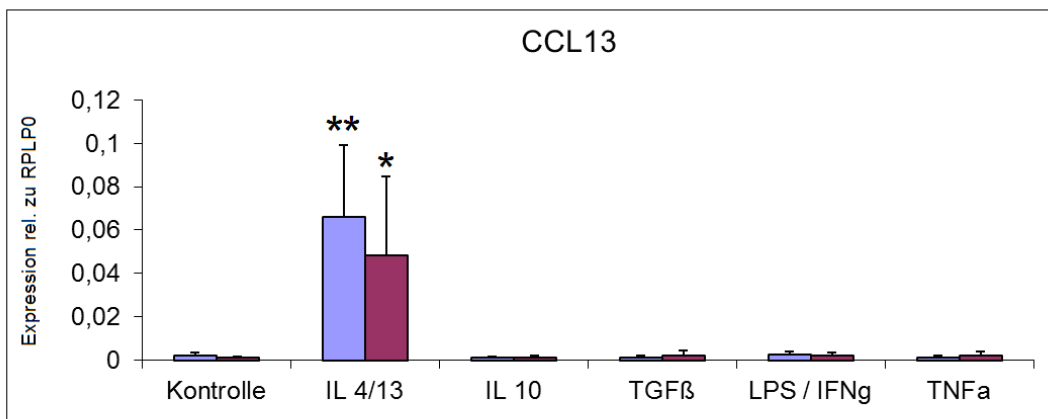
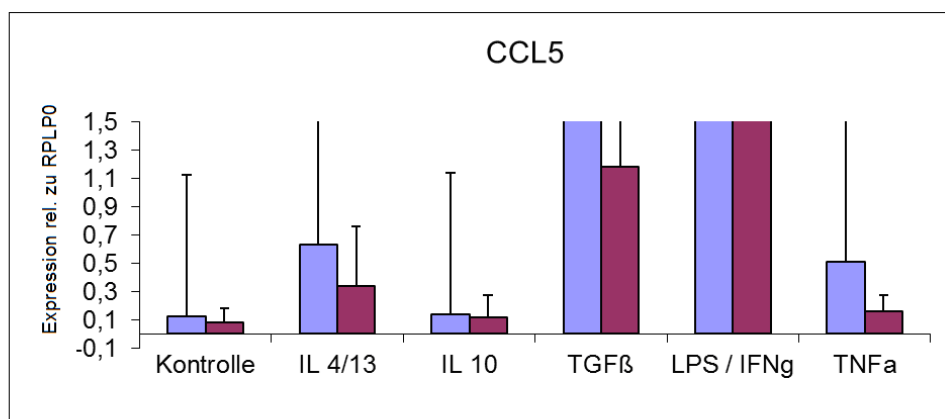
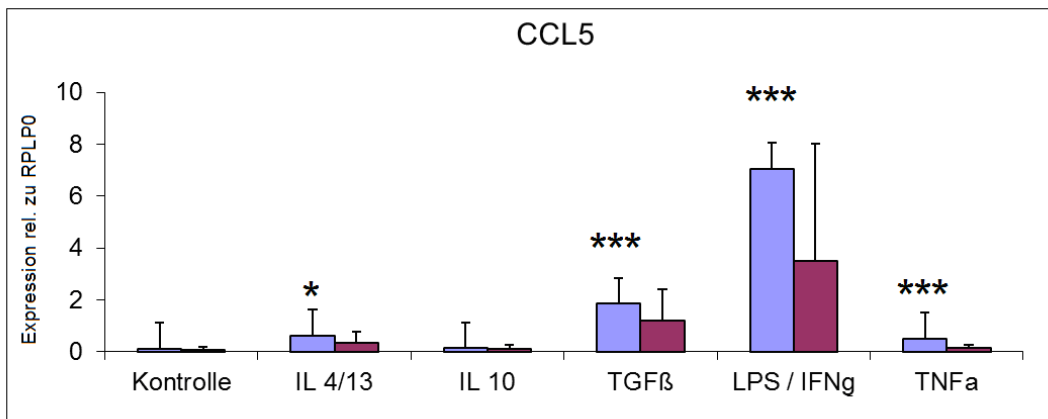
#### **4.6 Cokultur (Transwell) von polarisierten Makrophagen mit Panc1-Zellen**

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob es einen Einfluss auf die Polarisation von Makrophagen hat, wenn diese mit Pankreaskarzinomzellen in einer Co-Kultur nur durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  voneinander getrennt sind. Aufbauend auf dem vorangegangenen Versuch war die Übertragung von Partikeln durch diese Membran hindurch bereits nachgewiesen.

Als mRNA-Marker wurden analog zu den vorausgegangenen Experimenten MR, CCL13, CCL17 (alle M2), sowie CXCL9 und CCL5 (beide M1) verwendet.

Bei Betrachtung der "klassischen" Marker zeigte sich, dass es unter dem Einfluss der Co-Kultur mit Panc-1-Zellen zu einer Suppression von M1-typischen mRNAs bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung von M2-typischen mRNAs kam (Abb.33). So kam es nach der Co-Kultur zu einer deutlichen Abschwächung der Expression von CXCL9 (Abb.33-1), die weniger deutlich auch für CCL5 (Abb.33-2) nachweisbar war. Im Gegensatz dazu ließ sich eine weiterhin hohe Expression der M2-typischen mRNAs CCL13 (Abb.33-4) und CCL17 (Abb.33-5) nachweisen, bei letzterem kam es sogar zu einer erhöhten Expression als Folge der Co-Kultivierung, dies lässt sich aufgrund der großen Standardabweichung jedoch nicht zweifelsfrei festhalten. Die Expression von Mannose-Rezeptor zeigte sich für die M2-Polarisation durch IL4/13 und IL10 unter der Co-Kultivierung stabil, wohingegen sie bei M1-Makrophagen deutlich abnahm (Abb.33-3).





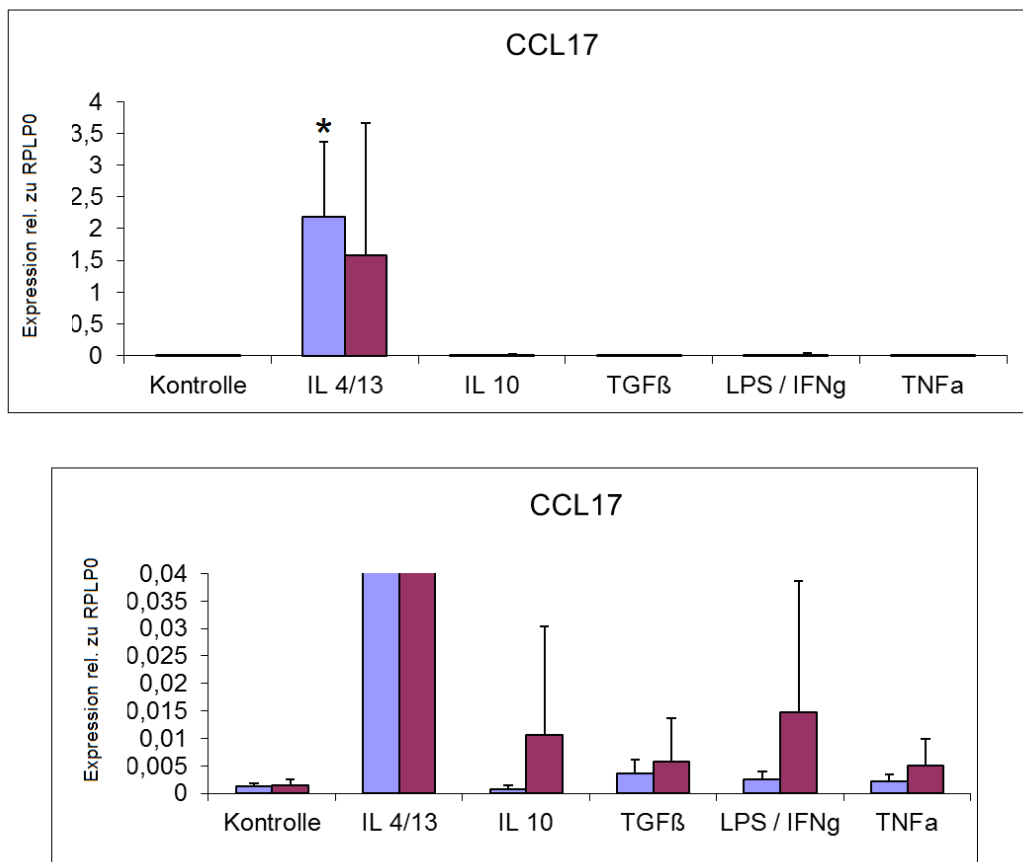


Abb. 31: Co-Kultivierung von Panc1-Zellen mit polarisierten Makrophagen (qRT-PCR, n=3), jeweils mit anhängender Vergrößerung der Skalierung. Blau = Kontrollgruppe (stimulierte Makrophagen), Rot = Co-kultivierte Makrophagen. Die Berechnung erfolgte nach  $\Delta\Delta Ct$ -Methode in Korrelation zum "Haushalts-Gen" RPLP0 (y-Achse), die Polarisierung erfolgte zunächst über 8 Stunden mit den auf der x-Achse angegebenen Zytokinen, anschließend erfolgte die Co-Kultur mit Panc-1-Zellen über weitere 24 Stunden. Als M1-Marker dienten CXCL9 und CCL5, als M2-Marker Mannose-Rezeptor, CCL13 und CCL17. Es zeigt sich eine reduzierte Expression der M1-Marker, insbesondere CXCL9, sowie eine im Verlauf weiter aufrechterhaltene, erhöhte Expression der M2-Marker- CCL15 und CCL17. ( $p < 0,5$  \* |  $p < 0,01$  \*\* |  $p < 0,001$  \*\*\*; Student's t-Test)

In diesem Experiment fanden sich somit Hinweise darauf, dass eine vorbestehende Polarisation von Makrophagen durch die Einwirkung von Pankreas-Karzinomzellen geändert werden kann. Die Karzinomzellen schienen Mediatoren zu sezernieren, die durch  $0,4 \mu\text{m}$  große Membranporen diffundieren konnten und eine M2-Polarisation der Makrophagen aufrechterhalten haben. Im Gegensatz dazu wurde eine M1-Polarisation nicht weiter unterhalten, da sich die Expression der M1-typischen mRNAs wieder verringerte.

#### **4.7 Cokultur (Transwell) mit miRNA-transfizierten Panc1-Zellen**

In den vorangegangenen Experimenten konnte dargestellt werden, dass es sowohl zu einem Transfer von Membranpartikeln von Panc1-Zellen auf Makrophagen kommt als auch zu einer Veränderung der Polarisierung im Zuge einer Co-Kultur beider Zellarten miteinander. Darauf aufbauend sollte nun untersucht werden, ob sich die Polarisierung von Makrophagen ändert, wenn diese mit Pankreaskarzinomzellen co-kultiviert werden, welche ihrerseits mit verschiedenen miRNA transfiziert wurden.

Die Panc1-Zellen wurden dabei mit pre- und anti-Strängen der micro-RNAs miR-155 und miR-203 transfiziert. Als Kontrollgruppen dienten Zellen, die mit nicht-kodierenden "pre-" bzw. "anti-" Kontroll-Strängen transfiziert wurden. Es wurden verschiedene mRNA-Produkte untersucht, die in der vorliegenden Arbeit bereits als M1 und M2 Marker für polarisierte Makrophagen beschrieben wurden.

##### miR-203

Es zeigte sich, dass die Expression des M2-typischen Mannose-Rezeptors in Makrophagen unter dem Einfluss pre-miR-203 gesteigert wird, wenn diese mit transfizierten Panc1-Zellen co-kultiviert wurden; dabei kam es gleichzeitig auch zu einer deutlich reduzierten Expression der mRNA unter Einfluss von anti-miR-203. Für die beiden anderen M2-typischen mRNAs CCL13 und CCL17 ließ sich der Effekt nicht nachweisen; CCL13 wurde unter dem Einfluss von pre- und anti-miR-203 supprimiert, CCL17 hingegen durch beide vermehrt exprimiert. Die Expression von CCL5 als M1-typische mRNA zeigte ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression unter dem Einfluss von pre-miR-203 und gleichfalls eine deutlich reduzierte Expression unter anti-miR-203. Zuletzt konnte eine supprimierte Expression von CXCL9 unter dem Einfluss von anti-miR-203 gezeigt werden, dies konnte zwar auch durch pre-miR-203 bewirkt werden, jedoch nicht im gleichem Ausmaß (Abb.34).

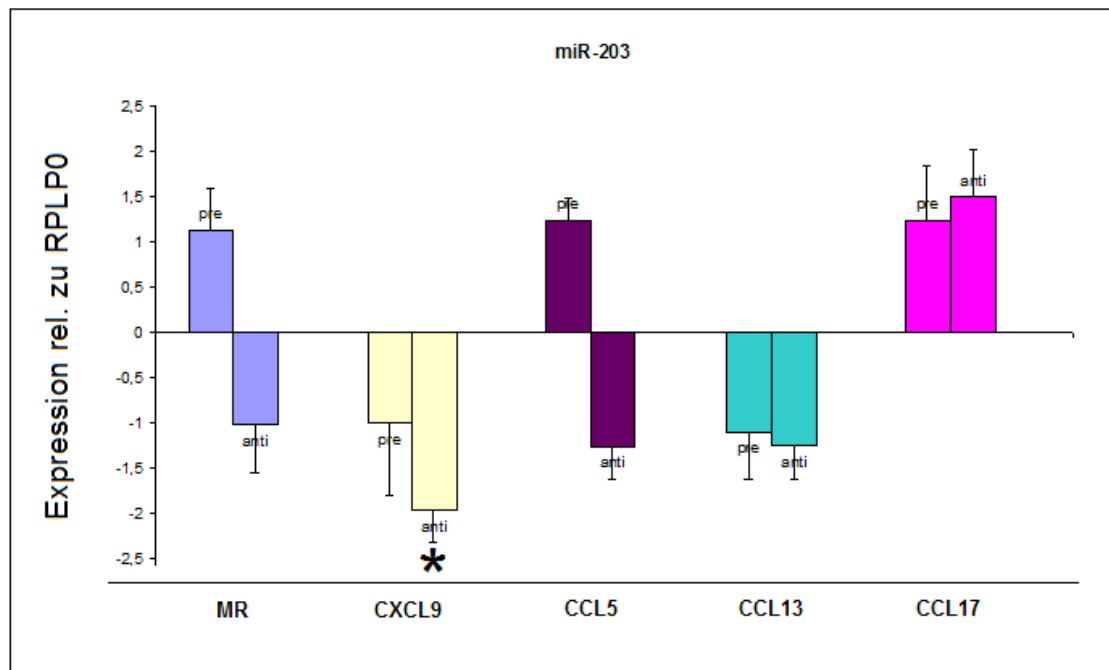


Abb.32: Polarisation von Makrophagen durch Einwirkung von "pre-" und "anti-" miR-203, (qRT-PCR, n=3) Erstellung des mRNA-Profiles anhand der vorbekannten M1- / M2-typischen Marker (x-Achse). Die Berechnung erfolgte nach  $\Delta\Delta Ct$ -Methode in Korrelation zum "Haushalts-Gen" RPLP0 als Bezugswert (Fold Change, y-Achse). Die co-kultivierten Zellen exprimieren nach der Co-Kultivierung sowohl M1- als auch M2-typische mRNAs. ( $p < 0,5$  \* |  $p < 0,01$  \*\* |  $p < 0,001$  \*\*\*; Students t-Test)

Dies ist also kein eindeutiges Ergebnis: In der vorliegenden Arbeit konnte miR-203 nicht zweifelsfrei als typischer M2-Polarisator in der Co-Kultur nachgewiesen werden. Die co-kultivierten Zellen exprimieren nach einer Co-Kultur mit miR-203-transfizierten Panc-1-Zellen sowohl M2- als auch M1-typische mRNAs. Es handelt sich bei Betrachtung der vorliegenden Marker also um eine Art Hybridpopulation, die sowohl M1- als auch M2-typische Marker exprimiert.

### miR-155

Die M2-typische mRNA CCL17 zeigte nach der Co-Kultur eine Abnahme der Expression unter Einfluss von pre-miR-155 und eine deutlich höhere Expression unter Einfluss von anti-miR-155. Anti-miR-155 führte zwar zu einer Zunahme der CCL13-Expression, es kam jedoch unter pre-miR-155 ebenfalls zu einer Zunahme, weshalb dies kein eindeutiges Ergebnis darstellt. Die Expression von Mannose-Rezeptor wurde unter dem Einfluss von pre-miR-155 und anti-miR-155 gesteigert. Unter pre-miR-155 kam es

sowohl zu einer erhöhten Expression der M1-typischen mRNA CXCL9, gegenseitig unter anti-miR-155 zu einer reduzierten Expression der mRNA (Abb.35). Die Expression von CCL5 war sowohl unter dem Einfluss der pre- als auch der anti-miR-155 gesteigert.

Es finden sich somit Anzeichen dafür, dass die Co-Kultur mit pre-miR-155-transfizierten Panc-1-Zellen zu einer Polarisation der Makrophagen in Richtung M1 führt, gleichzeitig kommt es zu einer Suppression des M2-Markers CCL17. Dies ließ sich jedoch für die anderen, in dieser Arbeit angewandten M2-Marker Mannose-Rezeptor und CCL13, nicht nachweisen. Es handelt sich hier also analog zu obigen Ergebnissen ebenfalls um einen Hybriden, der sowohl M1, als auch M2 Marker exprimiert.

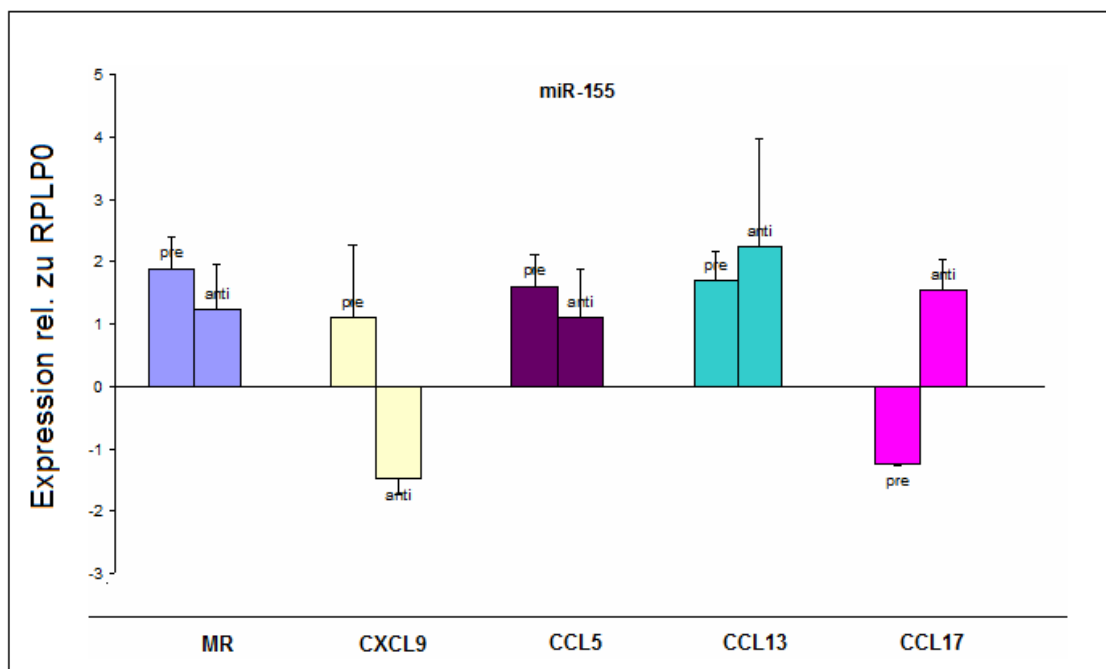


Abb.33: Polarisation von Makrophagen durch "pre-" und "anti-" miR-155. qRT-PCR, n=3. Erstellung des mRNA-Profiles anhand der vorbekannten M1- / M2-typischen Marker (x-Achse). Die Berechnung erfolgte nach  $\Delta\Delta Ct$ -Methode in Korrelation zum "Haushalts-Gen" RPLP0 als Bezugswert (Fold Change, y-Achse). Analog zu den obigen Ergebnissen entsteht eine Hybridpopulation von Makrophagen, die sowohl M1- als auch M2-typische Marker exprimieren. Hier finden sich jedoch Hinweise darauf, dass die Polarisation eher in Richtung M1-Makrophagen führt, dies im Sinne einer Überexpression von CXCL9 und CCL5 (als M1-typische Marker), sowie einer Suppression von CCL17 (als M2-typischer Marker). ( $p < 0,5$  \* |  $p < 0,01$  \*\* |  $p < 0,001$  \*\*\*; Students t-Test)

## 5 Diskussion

Der Einfluss des Immunsystems auf die Malignität und Invasivität von Tumoren hat in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit erlangt. Obwohl die genauen Mechanismen dieser Beeinflussung noch weitgehend unbekannt sind, ist es gelungen einzelne Zellentitäten zu bestimmen, die hieran beteiligt sind (*Erez et al. 2010.*, *Beatty et al. 2011*), unter diesen auch Makrophagen (*Kimura et al. 2007*, *Pollard et al. 2004*, *Oian et al. 2009*). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Makrophagen in der Tumorumgebung zu einem Subtyp differenzieren, welcher das Wachstum und die Metastasierungstendenz des Tumors beeinflusst (*Yoshikawa et al. 2012*). Ebenfalls sind Moleküle identifiziert worden, die hierbei als Botenstoffe fungieren; unter anderem gehören hierzu auch micro-RNA's (*Fabbri et al. 2012*), die potenziell in membrangeschützten Exosomen übertragen werden können (*Yang et al. 2011*)

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Moleküle aus Pankreaskarzinomzellen zu einer Änderung der Polarisation von Makrophagen führen und ob micro-RNAs auch hierbei eine Rolle spielen. In früheren Arbeiten konnte etwa gezeigt werden, dass es durch den Transfer von miR-142 und miR-223 zu einer Inhibition des Wachstums von Karzinomzellen kommt (*Aucher et al. 2013*) und dass es durch den Transfer anderer micro-RNAs (z.B. miR-150) zu einem beschleunigten Tumorwachstum kommt (*Liu et al, 2013*). Aus der stetig wachsenden Anzahl an bekannten miRNAs - im Juni 2014 finden sich in der Datenbank "www.mirbase.org" insgesamt 1872 humane Sequenzen - wählten wir zwei micro-RNAs aus, deren Funktion in der Polarisation von Makrophagen in der Tumorumgebung zu Beginn meiner Arbeit noch unzureichend geklärt war: miR-155 und miR-203.

### **5.1 Kultivierung von Monozyten und Makrophagen**

Um Monozyten aus Blutprodukten zu isolieren existieren verschiedene Verfahren. Zu Beginn meiner Arbeit wurde die Elutriation genutzt, aufgrund unzureichender Adhärenz und damit einhergehenden verminderten Vitalität der isolierten Zellen jedoch wieder

---

verlassen und die Isolation in den folgenden Experimenten ausschließlich mittels CD14+ MicroBeads durchgeführt. Dies ist eine Methode, die auch in anderen Studien weit verbreitet angewandt wird und gute Ergebnisse erzielt: So konnte in vorangegangenen Arbeiten demonstriert werden, dass über die Isolation mittels MACS Micro-Beads mehr als 80% der Monozyten aus einem Buffy Coat gewonnen werden können (Mayer *et al.* 2011). Dennoch ist auch die Isolation mittels Elutriation eine verbreitete Methode (de Carvalho *et al.* 2004, Lund *et al.* 2001), besonders, weil die Zellen hierbei nicht durch die Einwirkung von Molekülen selektiert werden und somit nicht voraktiviert werden. Auch entstehen deutlich weniger Materialkosten – allein die Kosten für CD14 MicroBeads von Miltenyi Biotec belaufen sich für  $1 \times 10^9$  Zellen auf 469,00 € (Stand Juni 2014). Neben diesen beiden erwähnten Verfahren existieren noch weitere Isolationstechniken, wie durch Kurzzeit-Adhäsion, Gradienten-Zentrifugation und Flow-Zytometrie (Wahl *et al.* 2006). Um die Reinheit der Monozyten weiter zu steigern, kombinierten wir das Verfahren der Gradienten-Zentrifugation schließlich mit der magnetischen Separation über CD14+ MicroBeads.

Nach Separation der Monozyten aus dem Buffy-Coat entsprechend eines optimierten Protokolls erfolgte die Kultur in Anlehnung an frühere Arbeiten, unter anderem von M. Fisher vom Roslin Institut der Universität Edinburgh. Dieses Protokoll wurde insbesondere dahingehend modifiziert, dass die Kultur nicht in 10% FCS, sondern in 2% humanem AB-Serum durchgeführt wurde, um das natürliche Habitat der Makrophagen und die darin vorkommenden Ressourcen besser imitieren zu können. Auch die Kulturdauer wurde um 24 Stunden verkürzt. Hier finden sich in der Literatur unterschiedliche Vorgaben. Eine anfänglich gewählte Kulturdauer von 7 Tagen wurde schließlich sukzessive bis auf 5 Tage verringert. Wir wählten diese kurze Kulturdauer aufgrund technischer und logistischer Limitationen. Unter Berufung auf andere Arbeiten, in denen ebenfalls mit Makrophagen gearbeitet wurde, die zuvor fünf Tage lang kultiviert wurden (Hoffman *et al.*, 2014), konnten keine Nachteile festgestellt werden. Weitergehend zeigte sich auch lichtmikroskopisch nach fünftägiger Kultur ein höherer Anteil an vitalen, adhären Zellen als nach siebentägiger Kultur

---

## **5.2. Polarisation von Makrophagen**

### **5.2.1 Polarisation durch Zytokine**

Es ist bereits beschrieben worden, dass die Polarisation von Makrophagen durch definierte Zytokine in Richtung M1 oder M2 erfolgen kann (Mantovani et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. So haben sich die Zytokinkombination LPS / IFN- $\gamma$  als verlässliche Stimulanzen zur Polarisation in Richtung M1 Makrophagen erwiesen. Als mRNA-Marker wurden CXCL9 und CCL5 ausgewählt. In Richtung M2 zeigte sich vor allem IL 4/13 als zuverlässiger Polarisator, hier wurde Mannose-Rezeptor, CCL13 und CCL17 als Marker auf mRNA-Ebene gewählt.

Die Arbeit von Mantovani et al. verzeichnete ähnliche Ergebnisse, es kam unter dem Einfluss von LPS / IFN- $\gamma$  ebenfalls zu einer gesteigerten Expression von CXCL9 auf mRNA-Ebene, ferner wurden noch andere mRNA-Marker getestet, die ebenfalls eine Polarisation in Richtung M1 anzeigen, u.a. CXCL10, CXCL11, CCR7. Auch wurde CCL5 von Mantovani et al. als M1-Marker beschrieben. Dies konnte in dem Zeitversuch dieser Arbeit zunächst nicht bestätigt werden, hier kam es vor allem durch die Stimulation von IL-10 zu einer Expression von CCL5. IL-10 wurde ebenfalls von Mantovani et al. als Polarisator in Richtung M2, genauer M2c, beschrieben. In den folgenden Experimenten kristallisierte sich jedoch heraus, dass LPS / IFN- $\gamma$  die Expression von CCL5 doch deutlicher verstärkte als es durch Stimulation mit IL-10 möglich war. Ursache hierfür war wahrscheinlich die größere Anzahl an Versuchen, die in die Ergebnisse eingeflossen sind. So diente der Zeitversuch mit n=1 nur als grundlegendes Experiment, um die Parameter der folgenden Versuche festzulegen. In den darauf aufbauenden Experimenten wurde mit n=3 deutlich aussagekräftigere Ergebnisse erzielt. Das Nutzen von CCL5 als M1-Marker unter LPS/IFN- $\gamma$ - Stimulation kann diese Arbeit somit auch bestätigen.

Mantovani et. al zeigten weitergehend, dass es unter der Stimulation mit IL 4 / 13 zu einer Polarisation in Richtung M2, genauer M2a kommt, als mRNA-Marker wurden unter anderem CCL17, CCL22 und CCL24 benannt. In dieser Arbeit konnte der Stellenwert von CCL17 als M2-Marker bestätigt werden. Außerdem wurde beobachtet,

---

dass es unter dem Einfluss von IL 4 / 13 zu einer deutlichen Steigerung der Expression von CCL13 kommt, was in der grundlegenden Arbeit von Mantovani et al. noch nicht beschrieben wurde. Später folgende Arbeiten konnten CCL13 ebenfalls als M2-Marker bestätigen (*Martinez et al. 2006*)

Der letzte in dieser Arbeit untersuchte mRNA-Marker für die Polarisation von Makrophagen war Mannose-Rezeptor. Dieser Membranrezeptor wurde bereits als M2-Marker beschrieben (*Mantovani et al. 2004, Martinez et al 2006*), dies konnte hier, wenn auch nur unter Vorbehalt, ebenfalls bestätigt werden. Es kam vor allem unter dem Einfluss von IL 4/13 zu einer gesteigerten Produktion des Rezeptors, jedoch ließ sich diese erhöhte Expression durch eine Stimulation mit LPS / IFN- $\gamma$  ebenfalls nachweisen. Der Anstieg unter IL 4/13 war mit einem  $\Delta$ CT von 0,879417 im Vergleich zu einem  $\Delta$ CT von 0,531593 zwar deutlich größer, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Ursache hierfür liegt bei einer mit n=3 immer noch zu geringen Anzahl der Ergebnisse, so dass es zu einer breiten Streuung der Ergebnisse kam. Der Versuch müsste mit verschiedenen Spendern noch deutlich öfter wiederholt werden, um signifikante Ergebnisse zu erhalten, um somit auch Mannose-Rezeptor als signifikanten M2-Marker bestätigen zu können.

### 5.2.2 Polarisation durch Überstände

Zur Isolation von Exosomen lassen sich in der Literatur vielfältige Möglichkeiten finden, z.B. mittels OptiPrep™ über einen Dichtegradienten, mittels anti-EpCAM beschichtete magnetische "beads" oder mittels Ultrazentrifugation von Kulturmedium. Letztgenanntes Verfahren wurde auch in dieser Arbeit genutzt. Dabei verwendeten wir ein Protokoll in Anlehnung an eine Arbeitsgruppe der Ruhr-Universität Bochum (Dr. I. Schwarte-Waldhoff, Zentrum Klinische Forschung), die zeigen konnten, dass über die Isolation mittels Ultrazentrifugation Exosomen aus Pankreaskarzinomzellen gewonnen werden können (Disserationen von *Mhd Bassel Malas* und *Kamila Anna Adamczyk*).

Welches Verfahren am effektivsten ist, um Exosomen aus Karzinomzelllinien zu isolieren, ist in der Literatur weiterhin umstritten (*Thery et al. 2006*). Entgegen der Ergebnisse der Arbeitsgruppe aus Bochum konnten andere Untersuchungen etwa

---

zeigen, dass die Isolation von Exosomen aus Kolon-Karzinomzellen durch magnetische "beads" den anderen oben genannten Methoden überlegen zu sein scheint (*Tauro et al. 2012*). Dies könnte seine Ursache in den sich von Labor zu Labor doch deutlich unterscheidenden Isolations-Protokollen und der von Zellart zu Zellart unterschiedlichen Mengen an produzierten Exosomen haben.

In dieser Arbeit wurde an der Isolation via Ultrazentrifugation festgehalten. Sie stellt ein im Vergleich zu der auf "beads"-basierenden Methode leicht durchzuführendes Verfahren dar, das auch durch geringe Materialkosten attraktiv wird (250 ml OptiPrep™ Density Gradient Medium von SigmaAldrich, Stand Juni 2014: 363,00 €).

Die Analyse der Proteinmenge, die sich durch die Ultrazentrifugation als Pellet sammelt, sollte mittels Bradford Methode gemessen werden. Dies war jedoch nicht erfolgreich, das nachgewiesene Material reichte nicht zur Bestimmung aus. Ursächlich hierfür könnte sein, dass eine zu hohe Verdünnung (Resuspension in 70µl PBS) gewählt wurde, so dass die Konzentration an Protein für diese Nachweisverfahren nicht mehr ausreichend war. Dass dennoch Material vorhanden war, vermuteten wir aus dem resultierenden Effekt auf die Polarisierung der Zellen, der durch die Behandlung mit dem Ultrazentrifugat entstand, der - auch wiederholt - in der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden konnte. In früheren Arbeiten, bei denen eine Isolation analog zu dem in dieser Arbeit angewandten Verfahren durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Ausbeute von 2,515 µg/µl Protein aus 140 ml Panc1-Überständen erzielt werden konnte (*Disseration von Mhd Bassel Mallas, 2013*).

Dass der beobachtete Effekt zwangsweise durch Exosomen hervorgerufen wird, lässt sich an dieser Stelle aber nicht beweisen. Im PKH67-Versuch konnte jedoch zumindest gezeigt werden, dass es zur Übertragung von Membranpartikeln ausgehend von Pankreaskarzinomzellen auf Makrophagen kommt. Offen bleibt an dieser Stelle auch, warum es nach 48-stündiger Kultivierung zu einer Umverteilung des Farbstoffes kommt, in der Literatur finden sich hierzu keine Verweise. Wir sehen die Umverteilung a.e. als Form von Recyclingprozessen an, bei denen der Farbstoff in endosomale Strukturen in der Nähe des Zellkernes abtransportiert wurde. In den darauf aufbauenden

---

Co-Kultur Versuchen konnte dann auch gezeigt werden, dass dieser Transfer einen Effekt auf die Polarisation der Makrophagen hat.

In weiterführenden Experimenten sollte eine sensitivere Methode zum Nachweis von Protein und/oder Exosomen zum Einsatz kommen, um deren Existenz schließlich zu beweisen. Dabei könnten die Exosomen z.B. direkt elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (*Grant et al. 2011*). Dies war im Zuge dieser Arbeit geplant, wurde aus zeitlichen und logistischen Gründen jedoch nicht mehr verwirklicht.

### 5.2.3 Polarisation durch Karzinomzellen

Die Polarisation von Makrophagen ist ein dynamischer Zustand auf einem Kontinuum (*Sica et al. 2012*). In der Literatur finden sich Daten darüber, dass die Änderung der Zytokine im Kulturmilieu von bereits polarisierten Makrophagen eine Änderung der bestehenden Polarisation zur Folge haben kann (*Stout et al. 2005*). So kann auch die Polarisation durch Hinzugabe anderer Zytokine wieder geändert werden (*Antonios et al. 2013*). Hieran anlehnend wurde in der vorliegenden Arbeit ein Versuch konzipiert, in dem untersucht wurde, inwiefern sich die Expression von M1- bzw. M2-typischen mRNA-Produkten polarisierter Makrophagen durch die Einwirkung einer Co-Kultur mit Pankreaskarzinomzellen ändert.

In diesen Experimenten wurde eine Kontrollgruppe genutzt, die aus Makrophagen bestand, die mit Pankreaskarzinomzellen co-kultiviert wurden, jedoch zuvor selbst nicht polarisiert wurden. Es handelte sich dabei um noch unpolarisierte, sog. M0-Zellen. Auf die Veränderung deren Polarisation durch eine Co-Kultur beziehen sich somit die Werte der restlichen Zellen, die ihrerseits vorher in Richtung M1 bzw. M2 polarisiert wurden und anschließend mit Pankreaskarzinomzellen co-kultiviert wurden.

Eine andere sinnvolle Wahl einer Kontrollgruppe wären Makrophagen, die ihrerseits nicht polarisiert wurden und anschließend nicht co-kultiviert, jedoch über den gleichen Zeitraum wie die restlichen Zellen in Kultur gehalten wurden. Die so erhobenen Daten würden Aufschluss darüber geben, wie sich die Expression der Rezeptoren über den gewählten Zeitraum ohne äußere Einflüsse ändert. Wie in der Arbeit von *Antonios et. al*

gezeigt und sich auch in dem Zeitversuch dieser Arbeit angedeutet hat, ist die Genexpression in polarisierten Makrophagen ein Vorgang, der sich abhängig von der Kulturdauer ändern kann. Es finden sich somit unterschiedliche, schwankende Konzentrationen der Marker im Zeitverlauf. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse unbedingt zu berücksichtigen.

#### **5.2.4 Polarisation durch transfizierte Karzinomzellen**

Frühere Arbeiten konnten einen Überblick darüber bieten, welche micro-RNAs im PDAC exprimiert werden. Unter diesen finden sich auch miR-155 und miR-203 (*Szafranska et al. 2007*). Da sich zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Daten über die genauen Funktionen der beiden micro-RNAs in Bezug auf TAMs finden ließen, entschieden wir uns dafür, diese nun genauer zu untersuchen.

Inzwischen verdichten sich die Hinweise darauf, dass miR-155 eine Polarisation in Richtung M1 bewirken könnte: So führt eine Überexpression von miR-155 in Zellen der Mikroglia, welche eine Subgruppe der Makrophagen darstellen, zu einer Stimulation der Immunabwehr und zu einer Hemmung der Replikation von Enzephalitisviren (*Pareek et al. 2014*). Weitergehend konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von miR-155 in Kupfer-Zellen, ebenfalls eine in der Leber beheimatete Subgruppe von Makrophagen, zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen in der Co-Kultur führt und dass der "knockdown" von miR-155 in einem Lebertransplantat zu einer abgeschwächten Immunantwort und somit zu einer verbesserten Annahme durch den Empfänger führt (*Li et al. 2014*). Dies alles würde man auch durch die immununsupportive Wirkung - bzw. deren Fehlen - von M1-Makrophagen erwarten.

Für miR-203 finden sich deutlich weniger Daten in der Literatur. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass miR-203 sich durch eine Hemmung von MyD88 in Makrophagen auszeichnet. MyD88 stellt seinerseits einen zentralen Mediator in der Ausbildung einer Immunreaktion dar. Weitergehend kommt es in mit miR-203 transfizierten murinen Makrophagen (RAW264.7) zu einer abgeschwächten Expression von NF-K $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6, welche ihrerseits sonst ebenfalls eine proinflammatorische Wirkungen entfalten würden (*Wei et al. 2013*).

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es durch die Co-Kultur von Makrophagen (Empfänger) mit micro-RNAs transfizierten Pankreaskarzinom-Zellen (Spender) zu einer Änderung der Makrophagen-Polarisation kommt, was zuvor noch nicht für die beiden micro-RNAs 155 und 203 nachgewiesen werden konnte. Dabei kam es jedoch nicht zur Expression von M1- und M2-typischen mRNA-Profilen, wie es nach Polarisation mit den "klassischen" Zytokinen in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte. Stattdessen kam es zur Ausbildung einer Art Hybridpopulation, die sowohl M1- als auch M2-mRNAs exprimiert. In der Literatur lassen sich ähnliche Verweise finden, bei denen es zur Entstehung von Hybrid-Makrophagen gekommen ist (*Mosser et al. 2008*). Die genaue Funktion dieses "neuen" Subtyps ist derzeit noch ungeklärt. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um zu klären, ob sich diese Zellen eher wie M1 oder wie M2 Makrophagen verhalten und inwiefern sie sich auch in der "natürlichen" Tumorumgebung finden lassen - und welche Wechselwirkungen dabei zwischen ihnen und dem Tumorstroma bestehen.

Zu beachten ist jedoch (siehe oben), dass die Expression der Marker ein dynamischer Prozess auf einem Kontinuum von Polarisationstypen ist und sich die Level im Zeitverlauf deutlich unterscheiden können. Ob der gewählte Zeitraum der Co-Kultivierung hier sinnvoll gewählt ist, lässt sich aus den erhobenen Daten nicht definitiv schließen. So könnte durch die Co-Kultur eine Polarisation angestoßen worden sein und innerhalb der relativ kurzen Kultivierungsdauer jedoch nicht vervollständigt worden sein, was demnach zur gleichzeitigen Expression von M1- als auch M2-typischen Markern geführt hat. Innerhalb der AG Buchholz sind deshalb Folgeexperimente geplant, in denen u.a. die Expression der Marker zu definierten Zeitpunkten der Co-Kultur bestimmt werden soll, um die Eigenschaften der Hybrid-Polarisation, sowie die Stabilität der beobachteten Phänotypen weitergehend zu charakterisieren.

## 6 Zusammenfassung

Die Erstdiagnose eines Pankreaskarzinoms geht zumeist mit einer infausten Prognose einher. Ursächlich hierfür ist das Fehlen von Frühsymptomen, was zu einem unbemerkten Wachstum mit früher Metastasierung führt. Jedoch fehlen selbst bei früher Diagnosestellung noch effektive Therapieverfahren, die gezielt zur Bekämpfung des Karzinoms eingesetzt werden können. Hier könnte die Entdeckung von Exosomen und micro-RNAs in naher Zukunft eine wichtige Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Interaktion von Pankreaskarzinomzellen mit tumor-assoziierten Makrophagen gelegt. Es ist bekannt, dass es diverse Wechselwirkungen zwischen diesen Zellarten gibt, die sich auf die Invasivität, Metastasierung und somit auch auf die Prognose des Pankreaskarzinoms auswirken. Es wird vermutet, dass diese Wechselwirkung u.a. auf der Übertragung von Molekülen via Mikrovesikeln basiert, unter diesen auch die sog. Exosomen. Besonders interessierte uns dabei, ob es auch zur Übertragung von micro-RNAs von Karzinomzellen auf Makrophagen kommt und ob dies Auswirkungen auf deren Polarisation und somit Funktionalität hat.

Zunächst wurde ein Protokoll entwickelt, mit welchem sich die schwierige Kultivierung und Polarisation von primären Monozyten und Makrophagen reproduzieren ließ. Mit den so gewonnenen Makrophagen wurde gezeigt, dass Subtypen von Makrophagen gewonnen werden können, die sich durch die Expression definierter Marker auf mRNA-Ebene charakterisieren lassen. Durch Hinzugabe von konzentrierten Überständen von Pankreaskarzinomzellen auf Monozyten wurde eine Polarisation in Richtung des M2-Subtyps ausgelöst. Mittels Färbung von Membranbestandteilen in Panc-1-Zellen und Co-Kultur mit Makrophagen konnte nachgewiesen werden, dass es zu einem Transfer von membranhaltigem Material von Pankreaskarzinomzellen auf Makrophagen kommt. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Polarisation in M1 und M2 kein fester Zustand ist, sondern durch äußere Einflüsse wieder geändert werden kann. So hielt eine Co-Kultur von Makrophagen mit Pankreaskarzinomzellen eine vorbestehende M2-Polarisation aufrecht und eine M1-Polarisation wurde wieder rückgängig gemacht. Zuletzt kam es zur Ausbildung einer Hybridpopulation mit Charakteristika beider Makrophagen-Subtypen, wenn Pankreaskarzinomzellen mit zwei verschiedenen micro-RNAs transfiziert wurden und anschließend mit Makrophagen co-kultiviert wurden.

## 7 Abstract

The diagnosis of pancreatic cancer has generally a poor prognosis, due to the lack of specific symptoms in the early stages of the disease, which leads to an unobserved growth and early metastasis. Even if the disease is discovered at an early stage, there is no specific therapy to treat the cancer effectively. The discovery of exosomes and micro-RNAs could contribute to improving the applied therapies in the future.

This thesis focuses on the interaction of macrophages with pancreatic cancer cells. It is known that there are multiple reciprocal interactions between these cells, which have an impact on invasiveness, metastasis and prognosis. It is supposed that these interactions are, among others, based on the transition of molecules, which are incorporated in small vesicles, e.g. exosomes. The main topic of this thesis was the analysis of the possible transfer of micro-RNAs in exosomes from one cell type to another and its potential influence on the polarisation and functionality of macrophages.

Accordingly, we developed and improved a protocol to culture primary monocytes and macrophages. With these cultured cells, we demonstrated that different subtypes of macrophages can be produced, which can be differentiated by analyzing the expression of specific markers on m-RNA-level. Furthermore, we showed that the polarisation of macrophages can be changed towards the M2-phenotype by adding concentrated supernatants to the cells, which were extracted from pancreatic cancer cells. Staining the cell membranes of Panc-1 cells revealed that a transfer of membrane-containing particles secreted from Panc-1 cells to macrophages is possible. We also showed that the polarisation of macrophages is not a constant state and that it can be changed *in vitro*. We found evidence that a pre-existing M2-polarisation can be kept by a co-culture with pancreatic cancer cells and pre-existing M1-polarisation can be reversed with this treatment. Finally, we transfected pancreatic cancer cells with two different types of micro-RNAs and demonstrated that a co-culture with these transfected cells and macrophages can modify the polarisation of the macrophages towards a kind of hybrid, which expresses both M1- and M2-specific markers. These cells cannot be classified in the "classic" polarisation system of macrophages and by now it is not known if they act more like M1 or more like M2 macrophages. Therefore, further studies are needed to reveal their functions

## 8 Literaturverzeichnis

1. Antonios JK, Yao Z, Li C, Rao AJ, Goodman SB. Macrophage polarization in response to wear particles in vitro. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(6):471-482.
2. Aucher A, Rudnicka D, Davis DM. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation. *J Immunol.* 2013;191(12):6250-6260.
3. Aung T, Chapuy B, Vogel D, et al. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(37):15336-15341.
4. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(3-4):623-642.
5. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature.* 2008;455(7209):64-71.
6. Bala S, Marcos M, Kodys K, et al. Up-regulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis factor {alpha} (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem.* 2011;286(2):1436-1444.
7. Bao B, Azmi AS, Ali S, et al. The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(2):272-296.
8. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-233.

9. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, et al. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*. 2011;331(6024):1612-1616.
10. Bhatnagar S, Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25779-25789.
11. Bian K, Fan J, Zhang X, et al. MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin. *FEBS Lett*. 2012;586(6):804-809.
12. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11(10):889-896.
13. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(14):4674-4679.
14. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, et al. Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res*. 2012;72(19):4920-4930.
15. Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. 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(6):2403-2413.
16. Cai X, Yin Y, Li N, et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J Mol Cell Biol*. Vol 4. United States 2012:341-343.

17. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell*. 2012;22(5):571-584.
18. Campbell AS, Albo D, Kimsey TF, White SL, Wang TN. Macrophage inflammatory protein-3alpha promotes pancreatic cancer cell invasion. *J Surg Res*. 2005;123(1):96-101.
19. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res*. 2011;1(1):98-110.
20. Cho JA, Lee YS, Kim SH, Ko JK, Kim CW. MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models. *Cancer Lett*. 2009;275(2):256-265.
21. Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, Ciccia F, De Leo G, Alessandro R. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):5338-5366.
22. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):704-714.
23. Dai JL, Turnacioglu KK, Schutte M, Sugar AY, Kern SE. Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res*. 1998;58(20):4592-4597.
24. de Carvalho CM, Bonnefont-Rebeix C, Picandet S, et al. Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;101(3-4):171-178.
25. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 19:3365-3374.

26. S ELA, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(5):347-357.
27. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(9):2078-2093.
28. Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell.* 2010;17(2):135-147.
29. Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, et al. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(8):454-467.
30. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics.* 1997;46(2):120-128.
31. Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(31):E2110-2116.
32. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(4):415-421.
33. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One.* 2012;7(3):e30679.
34. Geminard C, de Gassart A, Vidal M. Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell.* 2002;26(2):205-215.

35. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009;11(9):1143-1149.
36. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, et al. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res.* 2010;70(11):4528-4538.
37. Giovannetti E, van der Velde A, Funel N, et al. High-throughput microRNA (miRNAs) arrays unravel the prognostic role of MiR-211 in pancreatic cancer. *PLoS One.* 2012;7(11):e49145.
38. Gogolak P, Rethi B, Hajas G, Rajnavolgyi E. Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. *J Mol Recognit.* 2003;16(5):299-317.
39. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
40. Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res.* 2011;71(15):5346-5356.
41. Grant R, Ansa-Addo E, Stratton D, et al. A filtration-based protocol to isolate human plasma membrane-derived vesicles and exosomes from blood plasma. *J Immunol Methods.* 2011;371(1-2):143-151.
42. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer.* 2010;126(1):73-80.
43. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* 2004;118(3):285-296.

44. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007;27(1):91-105.
45. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1036-1045.
46. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21(3):309-322.
47. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
48. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol*. 2013;200(4):367-371.
49. Hasegawa H, Thomas HJ, Schooley K, Born TL. Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein. *Cytokine*. 2011;53(1):74-83.
50. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-3799.
51. Henry JC, Bassi C, Giovinazzo F, Bloomston M. MicroRNA from pancreatic duct aspirate differentiates cystic lesions of the pancreas. *Ann Surg Oncol*. 2013;20 Suppl 3:S661-666.
52. Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L. Adjuvant and neoadjuvant treatment in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(14):1565-1572.

53. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2010;362(17):1605-1617.
54. Hood JL, Pan H, Lanza GM, Wickline SA. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab Invest.* 2009;89(11):1317-1328.
55. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(5):579-586.
56. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(8):2969-2972.
57. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol.* 2010;189(2):223-232.
58. Huffaker TB, Hu R, Runtsch MC, et al. Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. *Cell Rep.* 2012;2(6):1697-1709.
59. Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, et al. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1806-1813.
60. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol.* 2010;3(5):478-481.
61. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(12):3120-3128.
62. Jin J, Deng J, Wang F, et al. The expression and function of microRNA-203 in lung cancer. *Tumour Biol.* 2013;34(1):349-357.

63. Jinushi M, Chiba S, Yoshiyama H, et al. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(30):12425-12430.
64. Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(6):682-699.
65. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):239-252.
66. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):749-759.
67. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. 2006;107(2):102-108.
68. Khan S, Aspe JR, Asumen MG, et al. Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer*. 2009;100(7):1073-1086.
69. Kimura YN, Watari K, Fotovati A, et al. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2007;98(12):2009-2018.
70. Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, et al. Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 1999;81(4):650-657.
71. Koga Y, Yasunaga M, Moriya Y, et al. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol*. 2011;2(4):215-222.

72. Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1525-1541.
73. Kumar S, Keerthana R, Pazhanimuthu A, Perumal P. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian J Biochem Biophys*. 2013;50(3):210-214.
74. Kurahara H, Takao S, Maemura K, et al. M2-polarized tumor-associated macrophage infiltration of regional lymph nodes is associated with nodal lymphangiogenesis and occult nodal involvement in pN0 pancreatic cancer. *Pancreas*. 2013;42(1):155-159.
75. Lasser C, Eldh M, Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012(59):e3037.
76. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2012;21(R1):R125-134.
77. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol*. 2000;192(2):150-158.
78. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004;363(9414):1049-1057.
79. Li H, Yang BB. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(7):870-879.
80. Li J, Gong J, Li P, Li M, Liu Y, Liang S. Knockdown of microRNA-155 in Kupffer cells results in immunosuppressive effects and prolongs survival of mouse liver allografts. *Transplantation*. 2014;97(6):626-635.

81. Lim JW, Mathias RA, Kapp EA, et al. Restoration of full-length APC protein in SW480 colon cancer cells induces exosome-mediated secretion of DKK-4. *Electrophoresis*. 2012;33(12):1873-1880.
82. Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(23):11238-11246.
83. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol*. 2008;29(7):343-351.
84. Liu Y, Zhao L, Li D, et al. Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development. *Protein Cell*. 2013;4(12):932-941.
85. Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*. 2007;1(3):156-158.
86. Lund PK, Westvik AB, Joo GB, Ovstebo R, Haug KB, Kierulf P. Flow cytometric evaluation of apoptosis, necrosis and recovery when culturing monocytes. *J Immunol Methods*. 2001;252(1-2):45-55.
87. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:157-188.
88. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-715.
89. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):231-237.
90. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-686.

91. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303-7311.
92. Martinez-Nunez RT, Louafi F, Sanchez-Elsner T. The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha 1 (IL13Ralpha1). *J Biol Chem.* 2011;286(3):1786-1794.
93. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010;73(10):1907-1920.
94. Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8(3):141-150.
95. Mayer A, Lee S, Lendlein A, Jung F, Hiebl B. Efficacy of CD14(+) blood monocytes/macrophages isolation: positive versus negative MACS protocol. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;48(1):57-63.
96. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-10518.
97. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013;73(3):1128-1141.
98. Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, et al. MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2012;2(12):1100-1108.

99. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282.
100. Moffatt CE, Lamont RJ. Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 2011;79(7):2632-2637.
101. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
102. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969.
103. Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, et al. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest.* 2012;122(11):4190-4202.
104. Neoptolemos JP. Adjuvant treatment of pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2011;47 Suppl 3:S378-380.
105. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):274-284.
106. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):341-352.
107. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:295-312.
108. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1604-1609.

109. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*. 2009;324(5933):1457-1461.
110. Olson P, Chu GC, Perry SR, Nolan-Stevaux O, Hanahan D. Imaging guided trials of the angiogenesis inhibitor sunitinib in mouse models predict efficacy in pancreatic neuroendocrine but not ductal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(49):E1275-1284.
111. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med*. 2011;17(7):867-874.
112. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19-30; sup pp 11-13.
113. Pareek S, Roy S, Kumari B, Jain P, Banerjee A, Vрати S. miR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1):97.
114. Park JE, Tan HS, Datta A, et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(6):1085-1099.
115. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):271-282.
116. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O, Schifferli JA, Fishelson Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;27(3):375-387.

117. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate*. 2009;69(2):159-167.
118. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(1):71-78.
119. Putz U, Howitt J, Doan A, et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal*. 2012;5(243):ra70.
120. Qian B, Deng Y, Im JH, et al. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One*. 2009;4(8):e6562.
121. Quah B, O'Neill HC. Review: the application of dendritic cell-derived exosomes in tumour immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2000;15(2):185-194.
122. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-296.
123. Rana S, Malinowska K, Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia*. 2013;15(3):281-295.
124. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*. 2012;33(3):119-126.
125. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(10):1595-1604.

126. Schmid MC, Avraamides CJ, Foubert P, et al. Combined blockade of integrin- $\alpha_4\beta_1$  plus cytokines SDF-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  potently inhibits tumor inflammation and growth. *Cancer Res.* 2011;71(22):6965-6975.
127. Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, et al. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery.* 2006;139(6):839-846.
128. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-189.
129. Schwanke U, Nabereit A, Moog R. Isolation of monocytes from whole blood-derived buffy coats by continuous counter-flow elutriation. *J Clin Apher.* 2006;21(3):153-157.
130. Semenza GL. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis. *Oncogene.* 2013;32(35):4057-4063.
131. Seton-Rogers S. Microenvironment: Making connections. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):222-223.
132. Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Curr Opin Oncol.* 2000;12(6):557-563.
133. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood.* 2010;116(13):2385-2394.
134. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-795.

135. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):717-727.
136. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(4):575-581.
137. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6(3):267-283.
138. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*. 2000;4(6):567-579.
139. Squadrito ML, Etzrodt M, De Palma M, Pittet MJ. MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends Immunol*. 2013;34(7):350-359.
140. Squadrito ML, Pucci F, Magri L, et al. miR-511-3p modulates genetic programs of tumor-associated macrophages. *Cell Rep*. 2012;1(2):141-154.
141. Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(3):163-172.
142. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*. 2012;119(3):646-648.
143. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*. 2005;175(1):342-349.
144. Sun B, Pu B, Chu D, Chu X, Li W, Wei D. MicroRNA-650 expression in glioma is associated with prognosis of patients. *J Neurooncol*. 2013;115(3):375-380.

145. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 1994;55(3):410-422.
146. Szafranska AE, Davison TS, John J, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene.* 2007;26(30):4442-4452.
147. Takeshita N, Mori M, Kano M, et al. miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1. *Int J Oncol.* 2012;41(5):1653-1661.
148. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010;70(14):5649-5669.
149. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods.* 2012;56(2):293-304.
150. They C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
151. Tili E, Croce CM, Michaille JJ. miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *Int Rev Immunol.* 2009;28(5):264-284.
152. Tugues S, Honjo S, Konig C, et al. Genetic deficiency in plasma protein HRG enhances tumor growth and metastasis by exacerbating immune escape and vessel abnormalization. *Cancer Res.* 2012;72(8):1953-1963.
153. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.

154. van den Boorn JG, Dassler J, Coch C, Schlee M, Hartmann G. Exosomes as nucleic acid nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(3):331-335.
155. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2011;378(9791):607-620.
156. Wahl LM, Wahl SM, Smythies LE, Smith PD. Isolation of human monocyte populations. *Curr Protoc Immunol.* 2006;Chapter 7:Unit 7.6A.
157. Wang P, Hou J, Lin L, et al. Inducible microRNA-155 feedback promotes type I IFN signaling in antiviral innate immunity by targeting suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol.* 2010;185(10):6226-6233.
158. Warsame R, Grothey A. Treatment options for advanced pancreatic cancer: a review. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12(10):1327-1336.
159. Wei J, Huang X, Zhang Z, et al. MyD88 as a target of microRNA-203 in regulation of lipopolysaccharide or Bacille Calmette-Guerin induced inflammatory response of macrophage RAW264.7 cells. *Mol Immunol.* 2013;55(3-4):303-309.
160. Winter JM, Brennan MF, Tang LH, et al. Survival after resection of pancreatic adenocarcinoma: results from a single institution over three decades. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(1):169-175.
161. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(3):413-422.
162. Yachida S, Jones S, Bozic I, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 2010;467(7319):1114-1117.
163. Yachida S, White CM, Naito Y, et al. Clinical significance of the genetic

- landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res.* 2012;18(22):6339-6347.
164. Yang M, Chen J, Su F, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer.* 2011;10:117.
165. Ying JE, Zhu LM, Liu BX. Developments in metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the standard? *World J Gastroenterol.* 2012;18(8):736-745.
166. Yoshikawa K, Mitsunaga S, Kinoshita T, et al. Impact of tumor-associated macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. *Cancer Sci.* 2012;103(11):2012-2020.
167. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 2006;66(9):4795-4801.
168. Zdanov A, Wlodawer A. A new look at cytokine signaling. *Cell.* 2008;132(2):179-181.
169. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302(1):1-12.
170. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.

Fachbücher

171. Duale Reihe Innere Medizin, 2009, ISBN: 9783131181626
172. Herold Innere Medizin, 2012, ISBN: 9783981466010
173. K. Murphy: Janeway's Immunobiology, 7. Edition, 2008, ISBN 0-8153-4123-7
174. Cellular and Molecular Immunology, 6. Edition 2007, ISBN: 978-1416031222

Epidemiologische Daten aus der Internetrecherche

175. Gabriele Husmann, Dr. Peter Kaatsch, Prof. Dr. Alexander Katalinic Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V. 7. Ausgabe, 2010 ISBN: 978-3-89606-207-9
176. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012, ISBN 978-3-89606-214-7
177. Robert-Koch-Institut: Zentrum für Krebsregisterdaten, Stand 17.02.2012

Dissertationen

178. Kamila Anna Adamczyk: "Untersuchungen zur Freisetzung verschiedener Isoformen von EGFR und CDCP1 in Sekretomen und Exosomen von Pankreaskarzinom- Zelllinien" Knappschaftskrankenhaus (Medizinische Universitätsklinik), Ruhr- Universität Bochum
179. Mhd Bassel Malas: "Nachweis und Analyse von extrazellulären Nukleinsäuren (kleine RNAs) aus Pankreas-Tumorzellen in vitro: Exosomale miRNA als Abbild der Tumorzelle und als Quelle für neuartige Biomarker". Knappschaftskrankenhaus ( Medizinische Universitätsklinik), Ruhr-Universität Bochum

# 9 Anhang

## 9.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abb 1. Anatomische Lage des Pankreas	2
Abb.2. Mechanismus der Metastasierung	5
Abb.3. Karzinogenese des Pankreaskarzinoms.	7
Abb.4. Myelopoese: Stammbaum der Makrophagenentwicklung	8
Abb 5. Tumorwachstum je nach Polarisation	13
Abb.6. Wirkungen von TAMs auf Körperzellen im Überblick	14
Abb.7. miRNA-vermittelte Proteinbiosynthese-Inhibition.	18
Abb.8. Wirkung von micro-RNAs auf die Makrophagenpolarisation	19
Abb.9 Entstehung von Mikrovesikeln	22
Abb.10 Isolation von PBMC aus Buffy Coats	32
Abb.11. Magnetische Separation von CD14+ Zellen	36
Abb.12: CD14+ Zellen an Tag 0	37
Abb.13: CD14+ Zellen an Tag 5	37
Abb.14: Überstandsgewinnung / Exosomengewinnung (100 kDa-Centricon)	39
Abb.15: Überstandsgewinnung / Exosomengewinnung (Ultrazentrifugation)	40
Abb.16: Versuchsaufbau der Stimulation	41
Abb.17: Durchführung der PKH67-Färbung	43
Abb.18: Cokultur mit gefärbten Panc1-Zellen und Makrophagen	44
Abb.19: Exosomentransfer in Cokultur	44
Abb.20: Versuchsdurchführung der Co-Kultur	45
Abb.21: Versuchsaufbau CokulturPanc1 / polarisierte Makrophagen	46
Abb.22: Auswirkung der Cokultur auf Polarisation	46
Abb.23. Thermal Cycler Protocol	52
Abb.24. Polarisation der Makrophagen	54
Abb.25: Auszug aus Ergebnisse Zeitversuch nach 8 stündiger Stimulation	57-58
Abb.26: M1- und M2-Markern nach 8 stündiger Stimulation	59
Abb.27. Stimulation von CD14+ Zellen nach 5 Tagen Inkubation	61
Abb.28. Polarisation mittels 100kDa-Retentat	62
Abb.29. M1 und M2 Markern nach Stimulation mit Ultrazentrifugat	64-65

---

Abb 30. Mikroskopische Darstellung der kultivierten Makrophagen	66
Abb.31: PKH67-gefärbte Panc-1-Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie	68
Abb.32: FACS-Analyse von Cokultur Panc1-PKH67 / Makrophagen.	69
Abb.33: CoKultur Panc1 / polarisierte Makrophagen	71-73
Abb.34: Polarisation von Makrophagen durch Einwirkung von miR-203	75
Abb.35: Polarisation von Makrophagen durch Einwirkung von miR-155	76

## **9.2 Tabellenverzeichnis**

Tab 1. Zytokine mit Makrophagenwirkung	10
Tab.2. Konzentrationen der verwendeten Zytokine	37
Tab.3: Stimulation der Makrophagen mit Zytokinen im Zeitversuch	37
Tab.4. Zytokine zur Stimulation im Polarisationversuch	40
Tab.5. Master-Mix zur Durchführung zur Synthese von cDNA	48
Tab.6. Herstellung des Master-Mix zur Durchführung der RT-PCR	51

### 9.3 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	complementary Desoxyribonukleinacid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alias
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
for	Forward
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
IL-	Interleukin
IMIM PC1	Humane Pankreaskarzinomlinie
k	Kilo
Ktrl (Ctrl)	Kontrolle
l	Liter
m	Mili-
M	Mol
m	Meter
mRNA	messenger Ribonucleinacid
miRNA	micro-Ribonucleinacid
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
n-	Nano
NF-κB	Nuclear factor kappa B
p53	Protein 53
Panc-1	Humane Pankreaskarzinomlinie

---

PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
pH	Potentia Hydrogenii
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR
rev	Reverse
RNA	Ribonucleinacid
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
rpm	Rounds per minute
s.	Siehe
sek. (sec.)	Sekunde
Tab.	Tabelle
TGF $\alpha$	Tumor growth factor alpha
TNF $\beta$	Tumor necrosis factor beta
V	Volt
z.B.	Zum Beispiel

---

## **9.4 Verzeichnis akademischer Lehrer**

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bien, Bösner, Brehm, Buchholz, Burbelko, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del-Rey, Dettmeyer, Dietrich, Dinges, Dominguez, Donner-Banzhoff, Eggert, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Fendrich, Feuser, Freitag, Frink, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Gundermann, Hahn, Hegele, Hertl, Hofer, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Hörle, Hoyer, Hundt, Jacob, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kanngießler, Käuser, Kill, Kirschbaum, Klose, Knorrenschild, Koczulla, Köhler, König, Koolmann, Kortus-Götze, Krämer, Kroh, Krüger, Kuhlmann, Kühne, Kühnert, Kunsch, Langer, Lemke, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Löser, Maier, Maisch, Maschuw, Maurer, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Rolfes, Rominger, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schneider, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Swaid, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Waldmann, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zentgraf, Zettl, Ziring

## **9.5 Danksagung**

An dieser Stelle will ich mich bei allen bedanken, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Zuallererst will ich mich bei meinem Vater Dietrich Sattler bedanken. Ohne ihn wäre weder diese Arbeit, noch mein Studium möglich gewesen. Vielen Dank!

Besonderer Dank geht natürlich auch an PD Dr. rer. nat. Malte Buchholtz für das Überlassen des Themas und die tatkräftige Unterstützung bei dessen Umsetzung. Auch der Arbeitsgruppe und dem gesamten Team im Labor gilt mein Dank für diverse Hilfestellungen und bei der Lösung von Problemen. Ganz besonders will ich dabei jedoch noch einmal Benjamin Kühnemuth, Leonie Mühlberg und Ramona Kreider, sowie Sandra Melchisedech erwähnen, die sich meiner Probleme besonders herzlich angenommen haben.

Vielen Dank auch an Dr. Alexander Hann, der die Grundsteine dieser Arbeit gelegt hat und mir lange Zeit tatkräftig zur Seite stand.

Zuletzt danke ich Dr. med. Alexander Sattler und Miriam Hüttner für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie Simon Fett für seine Unterstützung in EDV-Fragen.