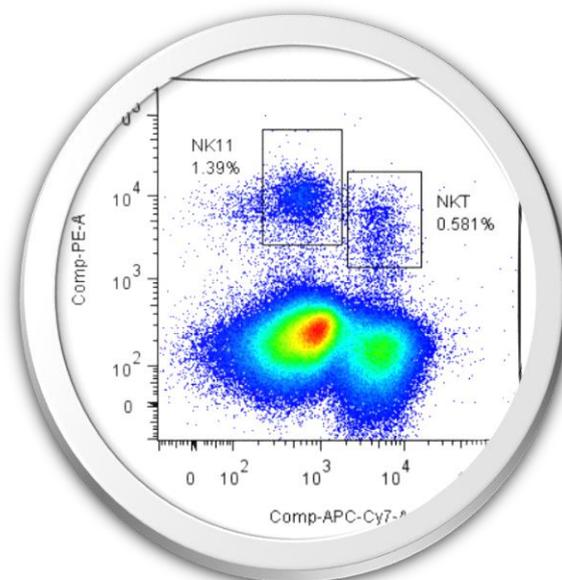


Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung von 5-Fluorouracil und Gemcitabin im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms

Ramona Brecht



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich
Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz
und
der Chirurgischen Klinik
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Betreuer: Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin

Untersuchung der immunmodulatorischen Wirkung von 5-Fluorouracil und Gemcitabin im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich
Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ramona Brecht
Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz
Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin

Tag der Disputation: 19.09.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.

Inhaltsverzeichnis	VI
II. Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung.....	18
1.1 Das Pankreaskarzinom	18
1.1.1 Das Pankreas	18
1.1.2 Epidemiologie	18
1.1.3 Risikofaktoren und das familiäre Pankreaskarzinom	19
1.1.4 Pathophysiologie, Histologie und Karzinogenese	20
1.1.5 Klassifikation und Stadieneinteilung	21
1.1.6 Klinische Symptomatik	23
1.1.7 Diagnostik	25
1.1.8 Therapie.....	27
1.1.9 Prognose	33
1.2 Das Immunsystem	34
1.2.1 Einteilung des Immunsystems.....	35
1.2.2 Zellen des Immunsystems	36
1.2.3 Zytokine	46
1.2.4 Tumorimmunologie	47
1.2.5 Mechanismen wie Tumorzellen der Immunabwehr entgehen.....	47
1.2.6 Immune Interaktion mit der Tumormikroumgebung.....	49
1.3 Metronomische Chemotherapie	51
1.3.1 Konventionelle Chemotherapie	51
1.3.2 Gemcitabin und 5-Fluorouracil.....	53
1.3.3 Vorteile der metronomischen Chemotherapie	54
1.3.4 Effekte der metronomischen Chemotherapie auf die Immunzellen	56
1.3.5 Metronomische Chemotherapie steigert die Immunogenität des Tumors	59
1.3.6 Metronomische Chemotherapie hemmt die Angiogenese.....	62
1.3.7 Immunmodulatorische Effekte der sehr niedrig dosierten metronomischen Chemotherapie (Ultra low dose)	62
1.3.8 Positive Aspekte in der Durchführung der metronomischen Chemotherapie	63
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	64
2 Material und Methoden	67

2.1 Material und Mäuse	67
2.1.1 Mäuse	67
2.1.2 Pankreaskarzinomzellen	67
2.1.3 Anästhetika	67
2.1.4 Nichtsteroidale Antiphlogistika	67
2.1.5 Chemotherapeutika	67
2.1.6 Laborgeräte	68
2.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie	69
2.1.8 Blocking Substanz, Compensations Beads, BD Cytometer Setup und Tracking Beads	70
2.1.9 Antikörper für die magnetische Separation	70
2.1.10 Kommerzielle Standardtests (Kits)	71
2.1.11 Chemikalien und Reagenzien	71
2.1.12 Verbrauchsmaterialien	72
2.1.13 Lösungen, Puffer, Medien	72
2.1.14 Konzentrationen von Gemcitabin und 5 FU in vitro und in vivo	73
2.1.15 Software	73
2.2 Methoden	74
2.2.1 Versuchstiere	74
2.2.2 Züchtung und Vorbereitung der Pankreaskarzinomzellen (Panc02)	74
2.2.3 Das Mausmodell	75
2.2.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen	79
2.2.5 Durchflusszytometrie	80
2.2.6 Magnetische Zellsortierung (MACS)	84
2.2.7 Luminex Methode	87
2.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	88
2.2.9 MTT-Test	89
2.2.10 Statistik	89
3 Ergebnisse	90
3.1 Untersuchung des Einflusses der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf das Tumorwachstum und die Metastasierung	90
3.2 Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest der Milzzellen gesunder Mäuse nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vitro (MTT)	93

3.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen und den Tumoren von tumortragenden Mäusen, nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin (in vivo).....	95
3.3.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen mittels FlowJo-Software	96
3.3.2 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4 ⁺ -T-Zell Subpopulationen und NK-Zellen mittels FlowJo-Software.....	98
3.3.3 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Makrophagen und MDSC mittels FlowJo-Software	99
3.3.4 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der DZ-Zellen mittels FlowJo-Software	100
3.3.5 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.....	102
3.3.6 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin	111
3.3.7 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.....	119
3.3.8 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin	128
3.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin (in vitro).....	136
3.4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.....	137
3.4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.....	147
3.5 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin (in vitro).....	157
3.5.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.....	158
3.5.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin	168

3.6 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen (in vitro)	178
3.6.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der lebenden und toten CD45 ⁻ -Zellen und der CD45 ⁺ -Zellen im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T- und NK-Zellen	179
3.6.2 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T- und NK-Zellen	180
3.7 Bestimmung der Zytokine des Blutserums der tumortragenden Mäuse und der Mediumüberstände von den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vivo und in vitro (Luminex)	187
3.7.1 Ergebnisse der Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU, in vivo (Luminex)	188
3.7.2 Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin, in vivo (Luminex)	189
3.7.3 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vitro (Luminex)	192
3.8 Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vitro (ELISA)	199
4 Diskussion.....	203
4.1 Ungünstige Prognose bei Bauchspeicheldrüsenkrebs	203
4.2 Einfluss der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf das Tumorwachstum und die Metastasierung.....	206
4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen.....	211
4.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen	215
4.5 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die MDSC und Makrophagen	220

4.6 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die DZ.....	227
4.7 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die Zytokine	230
4.7.1 IL-1 β , IL-17	230
4.7.2 IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β	232
4.7.3 IFN- γ , VEGF	232
4.8 Zukunftsperspektiven der metronomischen Chemotherapie.....	236
5 Zusammenfassung	237
6 Summary	239
III. Literaturverzeichnis	241
IV. Tabellenverzeichnis	258
V. Abbildungsverzeichnis	259
VI. Danksagungen	265

II. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+, -	plus, minus
<, >	kleiner, größer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
5 FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
ACT	Aktivator
ad us. vet.	ad usum veterinarium
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APC	Antigen-presenting cells (Antigenpräsentierende Zellen)
APC	Antigenpräsentierenden Zelle
APC-Cy 7	Allophycocyanine-cyanine-7
ARG1	Arginase 1
ATP	Adenosintriphosphat
AZA	5-Aza-Deoxycytidin
B7-1, B7-2	Familie der B7 Proteine
Bax	proapoptotisches Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serum Albumin
B-Zellen	B-Lymphozyten (CD19)
bzw.	beziehungsweise
C57BL/6	Mausstamm
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19 (Tumormarker)
CCL2	CC-Chemokine ligand
CCR4 Rezeptor	C-C Chemokine receptor type 4
CD	Clusters of Differentiation

CD107 ⁺	Marker für Degranulation
CD4-Zellen	CD4 ⁺ -T-Lymphozyten
CD69 ⁺	Aktivierungsmarker der T-Zellen
CD8-Zellen	CD8 ⁺ -T-Lymphozyten
CD80 ⁺	Reifungsmarker der DZ
CD86 ⁺	Reifungsmarker der DZ
cDC	conventional DC (konventionelle DC)
cDZ/cDC	myeloide DZ
CEA	Carcinoembryonic antigen
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
Co/Con	Kontrolle, keine Therapie/Behandlung mit Chemotherapie
CONKO-001	Charité Onkologie 001 (Studie)
COX-2	Cyclo-oxygenase-2
CP	Cyclophosphamid
CRP	C-reaktives Protein (Akute-Phase-Protein)
CRT	Calreticulin
CT	Computertomographie
CTL	Zytotoxische T-Zellen (CD8 ⁺ -T-Zellen)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CTX	Cyclophosphamid
dCTP	Deoxynukleosidtriphosphate
dFdC	Gemcitabin
dFdCDP	Diphosphat-Nukleosid
dFdCTP	Triphosphat-Nukleosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOX	Doxorubicin
DZ/DC	Dendritische Zellen, dendritic cells
EGF	Epidermal growth factor, Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERCP	Endoskopisch Retrograde Cholangio-Pankreatikographie
ESPAC-1	European Study Group for Pancreatic Cancer 1 (Studie)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
Fas-L	Fas-ligand
FBS	BD CompBeads Negativ Control
FCS/FKS	Fetales Kälberserum
FdUMP	5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat
FGF-2	Fibroblast growth factor typ
FOLFIRINOX	Folinic acid fluorouracil irinotecan oxaliplatin (Behandlungsprotokoll)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
FUTP	5-Fluorouridintriphosphat
g	Gramm
g	Gravitation/Schwerebeschleunigung (Zentrifuge)
G-CSF	Colony stimulating factors (Koloniestimulierende Faktoren)
Gem	Gemcitabin
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
G-MDSC	granulozytäre MDSC
gran.	granulozytär
h	hour (Stunde)
HMGB1	High Mobility Group Protein Box 1
HSP	Hitzeschockproteine
i.p.	intraperitoneal
IAPP	Islet amyloid polypeptide, Antiinsulinäre Hormone
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like-growth factor 1
IL	Interleukin
incl.	inklusive
iNOS	Nitric oxide synthase
iNOS	inducible nitric oxide synthase

IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
KSF	Koloniestimulierende Faktoren
l	Liter
LAK-Zelle	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LAPC	Locally Advanced Pancreatic Cancer (Lokal fortgeschrittenes Pankreaskarzinom)
LD	Low dose, niedrige Dosierung, metronomische Chemotherapie
LRR	Leucin-rich-repeat
m	männlich
M	Vorhandensein von Metastasen
M1/M2	Makrophagen-Phänotyp
m ²	Quadratmeter
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
M-CSF	Colony stimulating factors, Koloniestimulierende Faktoren, Wachstumsfaktoren (Makrophagen, bzw. Monozyten)
MDSC	Myeloid-Derived-Suppressor-Cells (Myeloide Suppressorzellen)
MFI	Mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC Klasse I	Major Histocompatibility Complex I
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MDSC	monozytäre MDSC
MMP	Matrix Metalloproteinasen
monozyt.	monozytär
MRCP	Magnetresonanztomographie Cholangio-Pankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MTD	Maximal tolerierte Dosis (konventionelle Chemotherapie)
MTT	Cell proliferation & cytotoxicity assay

MTX	Methotrexate
N	Beteiligung der Lymphknoten
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NK	Natürliche Killer Zellen
NKG2D	Natürliche Killer Gruppe 2D
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
NLRP3 Inflammasom	cytosolischer Proteinkomplex in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten
NO	Nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug (Nicht-steroidale Entzündungshemmer)
ONOO ⁻	Peroxinitrit-Anion
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PaCa	Pankreasadenokarzinom
Panc02	Linie der Pankreaskarzinomzellen
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1L	Programmed death-1 ligand
PDAC	Pankreasadenokarzinom
pDC	Plasmacytoid DC (plasmazytäre DZ)
PDGF	Platelet-derived growth factor (Wachstumsfaktor)
pDZ/pDC	plasmazytoide/lymphoide DZ
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-cyanine
Peptid-Transporter TAP	Transporter associated with antigen presentation
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein complex-cyanin 5.5
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PGE2	Prostaglandin E2
PSC	Pankreatische Sternzellen
PTX	Paclitaxel
R	Residualtumor (Resttumor nach OP)
R0	kein Residualtumor

R1	mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor
R2	sichtbarer Residualtumor
RhO GTPase	Ras homologue gehört zur Superfamilie der kleinen GTPasen
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RX	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
s.c.	subkutan
SCF	Stem-cell factor
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SPC	Sporadisches Pankreaskarzinom
SPF	Spezifiziert-Pathogen-frei
SSC	Side Scatter
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Größe des Primärtumors
TAA	Tumor-assoziierte-Antigene
Tab.	Tabelle
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
Tcon	konventionelle T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	Therapeutische Dosierung, konventionelle Chemotherapie
TEC	Tumor Endothelial Cells
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th-Zelle	T-Helferzelle
Tils	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Node Metastasis
Treg	regulatorische T-Zellen
T-Zellen	T-Lymphozyten
u.a.	unter anderem
U/ml	Einheiten pro Milliliter
UICC	Union internationale contre le cancer

ULD	Ultra low dose, sehr niedrige Dosierung, metronomische Chemotherapie
v.a.	vor allem
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol%	Volumenprozent
vs.	versus
w	weiblich
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
$\gamma\delta$ -Zellen	Gamma-delta-T-Zellen (Untergruppe der T-Lymphozyten)
δ	Delta

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Das Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse ist eine 15-20cm lange Drüse mit einem Gewicht von ca. 70-80g. Das Pankreas besteht aus einem exokrinen und endokrinen Teil. Der exokrine Teil ist für die Produktion der Verdauungsenzyme zuständig, während der endokrine Teil die Hormonproduktion übernimmt. Anatomisch unterscheidet man den Kopf (Caput pancreatis), der sich in die Konkavität der Duodenalschlinge schmiegt, den Körper (Corpus pancreatis), der die Wirbelsäule und die Aorta in Höhe des 1. und 2. Lendenwirbels überquert und den Schwanz (Cauda pancreatis) der bis zum Milzhilus reicht. Der Hauptausführungsgang, Ductus pancreaticus mündet gemeinsam mit dem Ductus choledochus auf der Papilla duodeni major in die Pars descendens des Duodenum. Einige Menschen haben einen weiteren Ausführungsgang, den Ductus pancreaticus accessorius. Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse von tubuloazinösem Bau, die aus den Endstücken (Acini), den Schaltstücken und den Ausführungsgängen besteht. Das endokrine Pankreas wird von der Gesamtheit der Langerhans-Inseln gebildet. Die antagonistisch wirkenden Hormone Insulin und Glukagon werden in Gruppen angeordneten speziellen epitheloiden Zellen produziert, dem sogenannten Inselorgan (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011).

Die Bauchspeicheldrüse produziert mehr als 20 verschiedene Verdauungsenzyme, täglich werden 1,5-2 Liter enzymhaltiges Sekret gebildet. Die wichtigsten Enzyme sind Amylase, Trypsin und Lipase. Durch nicht kontrolliertes Wachstum der Bauchspeicheldrüsenzellen kommt es zur Bildung eines Tumors, der sowohl gut- als auch bösartig sein kann. Bösartige Tumoren zeichnen sich durch ein schnelles und in die umgebenden Organe und Gewebestrukturen eindringendes Wachstum aus, wobei zystische Bauchspeicheldrüsentumoren eine Sonderform darstellen, da ein Großteil dieser primär gutartigen Tumoren in ein bösartiges Wachstum übergehen kann (J.Werner et al. 2010, Bauchspeicheldrüsenerkrankungen).

1.1.2 Epidemiologie

Bei Menschen rangiert der Tumor der Bauchspeicheldrüse als Krebstodesursache an vierter Stelle. Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland 16.000 Menschen am duktalem Pankreaskarzinom. Aufgrund der ungünstigen Prognose verstarben fast ebenso viele Personen an dieser Erkrankung. Damit liegt die Inzidenz sehr nahe bei der jährlichen Mortalitätsrate und ein Langzeitüberleben ist die Ausnahme.

Entsprechend ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate beim Pankreaskarzinom mit 8% bei den Männern und 7% bei den Frauen die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen in Deutschland. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren für Männer und bei 75 Jahren für Frauen. Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen. Die bösartigen Neubildungen der Bauchspeicheldrüse verursachen in den frühen Stadien oft keine oder nur unspezifische Symptome, sodass der Tumor erst spät erkannt wird und daher eine geringe kurative Resektionsrate resultiert. Ein weiterer Grund stellt die frühe und aggressive Metastasierung dar (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland; Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland (2013), URL: <http://www.gekid.de/> und http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html (Stand: 12.08.2016))

1.1.3 Risikofaktoren und das familiäre Pankreaskarzinom

Ein Hauptrisikofaktor stellt das Alter dar. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr, wobei Frauen später als Männer erkranken. Die altersspezifische Inzidenz steigt jedoch bereits ab dem 45. Lebensjahr an und erreicht ab dem 75. Lebensjahr Werte von 80 bis >100/100 000. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist das Rauchen, was zu einer Verdoppelung der Erkrankungswahrscheinlichkeit führt. Kommen weitere Faktoren wie z.B. ein hoher Alkoholkonsum hinzu, scheint sich das Risiko weiter zu erhöhen (Beger, 2013; Albert B. Lowenfels & Maisonneuve, 2006). Individuelle genetische Faktoren scheinen den Grad der Assoziation des Tabakkonsums und der Entwicklung eines Pankreasadenokarzinoms zu beeinflussen. Beim Rauchen werden viele karzinogene Substanzen freigesetzt, die ausgelöst durch etliche Genprodukte entarten können (Jang, Cotterchio, Borgida, Gallinger, & Cleary, 2012). Genmodifikationen wie beispielsweise CYP 1B1-4390-GG oder uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferasese senken das Pankreaskarzinomrisiko, wobei andere Veränderungen der Gene wie zum Beispiel GSTM1 das Risiko erhöhen. Über die Mechanismen wie sich die Gene genau auf das Risiko auswirken, ist nur wenig bekannt, sicher ist jedoch, dass die Genprodukte Einfluss auf die Zellproliferation, die Entzündungsantwort oder Fibrose nehmen können und damit eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen (Pandol, Apte, Wilson, Gukovskaya, & Edderkaoui, 2012).

Darüber hinaus gibt es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Adipositas (BMI >30) und einem erhöhten Risiko an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken (Berrington de Gonzalez, Sweetland, & Spencer, 2003; Patel et al., 2005). Fettleibigkeit in jungen Jahren kann mit einem früheren Erkrankungsalter und erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden sein, wohingegen Adipositas im Alter mit einer geringeren Überlebenschance der Patienten mit Tumoren der Bauchspeicheldrüse einhergeht (D. Li et al., 2009). Als gesichert disponierender Faktor gilt Diabetes mellitus Typ 2. Schätzungsweise entwickelt 1% der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten im Alter von ≥ 50

Jahren in den folgenden 3 Jahren ein Pankreaskarzinom. Dies entspricht einem etwa 8-fach erhöhten Risiko (Chari et al., 2005). Wichtig ist zu berücksichtigen, dass Diabetes ursächlich durch ein Pankreaskarzinom bedingt sein kann (Larsson et al., 2005).

In zahlreichen Studien wurde kein Zusammenhang zwischen moderatem Alkoholkonsum und Erhöhung des Pankreaskarzinomrisikos festgestellt, allerdings kann ein hoher Alkoholkonsum mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko assoziiert sein. Diskutiert werden ebenso ein Zusammenhang des erhöhten Konsums mit der Pathogenese anderer Krebserkrankungen und chronischen Pankreas- und Lebererkrankungen (Jiao et al., 2009; Talamini et al., 2010). Verantwortlich für das erhöhte Risiko sind die verschiedenen metabolischen Effekte von Alkohol und seinen Abbauprodukten. Sie können Stoffwechselwege verändern, die am Entzündungsprozess oder der Krebsentstehung beteiligt sind (Go, Gukovskaya, & Pandol, 2005). Patienten mit langjähriger chronischer Pankreatitis weisen ein erhöhtes Risiko auf ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Pinho, Chantrill, & Rooman, 2014). Das Risiko einer Karzinogenese ist bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und Erkrankungsdauer >5 Jahre um das 14-fache erhöht, bei Patienten mit hereditärer Pankreatitis sogar um das 70-fache (A. B. Lowenfels et al., 1993). Betrachtet man jedoch die Tatsache des engen Zusammenhangs der chronischen Pankreatitis und der Entwicklung eines Tumors der Bauchspeicheldrüse über einen Zeitraum von 20 Jahren entwickeln nur 5% der an chronischer Pankreatitis leidenden Patienten ein Pankreaskarzinom (Raimondi, Lowenfels, Morselli-Labate, Maisonneuve, & Pezzilli, 2010). Verwandte ersten Grades eines Patienten mit Pankreaskarzinom haben ein 2-fach höheres Risiko ebenfalls an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken. Liegt das Erkrankungsalter des Patienten unter 60 Jahren ist das Risiko sogar um das 3-fache erhöht. Man spricht in diesem Fall vom Sporadischen Pankreaskarzinom in der Familie (SPC) (McWilliams, Rabe, Olsword, De Andrade, & Petersen, 2005). Vom familiären Pankreaskarzinom (FPC) spricht man, wenn innerhalb einer Familie mindestens zwei erstgradig Verwandte daran erkrankt sind. Eine prospektive Studie aus Deutschland konnte zeigen, dass 1-3% aller Pankreaskarzinompatienten die Kriterien des FPC erfüllen und kommt damit ähnlich häufig wie andere erbliche Tumorerkrankungen vor (Tersmette et al., 2001).

1.1.4 Pathophysiologie, Histologie und Karzinogenese

Über 95% der Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome und entstehen durch maligne Entartung des exokrinen Anteils des Pankreas. Sie entstehen aus den prämaligen Vorstufen des Pankreasgangepithels. Darüber hinaus gibt es zystische Tumoren, die ebenfalls aus den Gangzellen hervorgehen, azinäre Tumoren, die ihren Ursprung in den Sekret produzierenden Parenchymzellen haben und endokrine Tumoren, die sich aus den endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln ableiten,

jedoch selten vorkommen (Seufferlein et al., 2013). Etwa 70% aller exokrinen Pankreaskarzinome liegen im Pankreaskopf, 20% im Körper und 10% im Schwanzbereich sowie überlappend in zwei oder mehr Unterbezirken der Bauchspeicheldrüse (Beger, 2013). Man unterscheidet bei den Vorstufen des Pankreaskarzinoms die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) von den zystischen Vorläuferläsionen, zu denen die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) zählen (Cooper, O'Toole, & Kench, 2013; Singh & Maitra, 2007). Die Forschung der letzten 20 Jahre zeigt, dass das Pankreaskarzinom als genetisch mitbedingte Erkrankung zu werten ist. Es treten somatische und vererbte Keimbahnmutationen auf. Die häufigste aktivierende Punktmutation betrifft das KRAS-Onkogen, welche in über 90% der Pankreaskarzinome vorliegt. Die KRAS-Mutation führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung der RAS-RAF-Signalkaskade, die zu Proliferation, Migration und Verringerung der Apoptose führt. Die Mutationshäufigkeit und die Art der Mutation ändert sich je nach Vorstufe des Tumors (Almoguera et al., 1988; Beger, 2013; Rodriguez-Viciana et al., 2005). Das p16INK4A/CDKN2A Gen ist eines der am häufigsten inaktivierten Tumorsuppressorgene beim duktalem Pankreaskarzinom (Schutte et al., 1997). In 50-75% der Fälle ist eine Mutation im p53-Gen auf Chromosom 17p vorhanden und bewirkt über p21 einen Wachstumsstopp, wobei ein Verlust der Funktion von p21 bei ca. 30-60% der Pankreaskarzinome beobachtet wird. DPC4 (Smad4) ist ein weiteres Tumorsuppressorgen und bei 55% der Pankreaskarzinome inaktiviert. Eine Inaktivierung des SMAD4-Gens ist dabei relativ spezifisch für das Pankreaskarzinom. Daher kann der Verlust von SMAD-4 als diagnostischer Marker für den Nachweis des duktalem Pankreaskarzinoms dienen (Schutte et al., 1996).

1.1.5 Klassifikation und Stadieneinteilung

Das Ausbreitungsstadium des Tumors entscheidet maßgeblich über die Behandlungsmethode. Um vor Therapiebeginn die geeignete und beste Therapie zu bestimmen, ist es notwendig den Tumor genauer zu charakterisieren. Durch die unten beschriebene Diagnostik ist es möglich das Tumorstadium zu ermitteln. Die Einteilung erfolgt nach bestimmten Kategorien der „TNM-Klassifikation UICC 2010“:

- Größe des Primärtumors (T)
- Beteiligung der Lymphknoten (N)
- Vorhandensein von Metastasen (M)

TNM-Klassifikation UICC 2010:

T-Klassifikation		N-Klassifikation		M-Klassifikation	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar	NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar	MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
Tis	Carcinoma in situ	N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen	M1	Fernmetastasen vorhanden
T1	Tumor begrenzt auf Pankreas, 2cm oder weniger in größter Ausdehnung				
T2	Tumor begrenzt auf Pankreas, mehr als 2cm in größter Ausdehnung				
T3	Tumor breitet sich jenseits des Pankreas aus, ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenteria superior				
T4	Tumor infiltrierte Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior				

Tab. 1.1.5.1 TNM-Klassifikation UICC 2010 (Wittekind & Bertolini, 2010)

Diese TNM-Kriterien verwendet man zur Einteilung der Tumorerkrankung in verschiedene Stadien, um die passende Therapie festzulegen. Das Stadium I stellt die geringste Tumorausbreitung dar, Stadium IV steht für einen weit fortgeschrittenen Tumor mit Fernmetastasen.

Stadium	T-Klassifikation	N-Klassifikation	M-Klassifikation	Mittlere Überlebenszeit (Monate)
I	Tis	N0	M0	
IA	T1	N0	M0	24,1
IB	T2	N0	M0	20,6
IIA	T3	N0	M0	15,4
IIB	T1,T2 oder T3	N1	M0	12,7
III	T4	N0 oder N1	M0	10,6
IV	T1,T2,T3 oder T4	N0 oder N1	M1	4,5

Tab. 1.1.5.2 Stadieneinteilung (Hidalgo, 2010; Wittekind & Bertolini, 2010)

Nach einer Operation ist es von entscheidender Bedeutung ob der Tumor vollständig entfernt wurde. Der Operationserfolg wird wie folgt beschrieben:

R= Residualtumor (Resttumor nach OP), RX= Residualtumor kann nicht bestimmt werden, R0= kein Residualtumor, R1= mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor, R2= sichtbarer Residualtumor

1.1.6 Klinische Symptomatik

Je nach Lokalisation und Ausbreitung des Adenokarzinoms liegt ein unterschiedliches klinisches Beschwerdebild vor. Die initialen, potenziell kurativen Stadien sind meist symptomlos und erst im fortgeschritten, metastasierten Stadium zeigen sich erhebliche klinische Beschwerden. Der klassische Symptomkomplex des Pankreaskarzinoms beinhaltet Oberbauchschmerzen, welche in den Rücken ausstrahlen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust von etwa 1-2 kg pro Monat und am Ende den sich langsam entwickelnden Ikterus bei den zu 80% im Pankreaskopf entstehenden Karzinomen (Büchler, Uhl, & Malfertheiner, 2004). Pankreaskarzinome des Corpus oder Cauda-Abschnitts verursachen selten eine Okklusion des Ductus hepatocholedochus, können aber durch eine ausgedehnte hepatische Metastasierung ebenfalls einen sekundären Ikterus hervorrufen. Das klinische Beschwerdebild ist geprägt durch Pruritus, acholische Stühle sowie braungefärbten Urin (Beger, 2013). Pankreas- oder Gallengangskarzinome sind mit 20% die häufigste Ursache für einen neu auftretenden Ikterus bei Patienten in der zweiten Lebenshälfte (>60 Jahre) (Seufferlein et al., 2013).

Pathophysiologisch ist die Perineuralscheideninvasion und das infiltrierende Wachstum des Pankreaskarzinoms in den retroperitoneal gelegenen Plexus solaris sowie in den Splanchnikusbereich verantwortlich für die Schmerzsymptomatik (Beger, 2013; Mannell, van Heerden, Weiland, & Ilstrup, 1986).

Neben den führenden Symptomen können charakteristische Beschwerden einer vorliegenden exokrinen oder endokrinen Pankreasinsuffizienz bestehen (Beger, 2013). Das Auftreten des Pankreaskarzinoms ist häufig mit der Manifestation eines Diabetes mellitus und Maldigestion vergesellschaftet. Antiinsulinäre Hormone (IAPP) werden von exokrinen Pankreastumoren gebildet und lösen den Diabetes aus. Daher ist es wichtig ältere Patienten mit Gewichtsverlust und neu aufgetretenem Diabetes mellitus auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms zu untersuchen (Büchler et al., 2004; D. Li, Xie, Wolff, & Abbruzzese, 2004). Auch Pankreatitis kann ein erstes Anzeichen für einen Tumor der Bauchspeicheldrüse sein, v.a. wenn es keinen offensichtlichen Grund für die Entwicklung der Erkrankung gibt, wie beispielsweise Gallensteine oder exzessiver Alkoholkonsum (Cascinu, Falconi, Valentini, & Jelic, 2010). Ursächlich für die Pankreatitis ist meist eine lokale Gallengangsobstruktion durch den raumfordernden Prozess (Hidalgo, 2010). Bei 10-20% der Patienten kann es zur Ausbildung von Aszites kommen, meist im Rahmen der peritonealen Metastasierung, einer Hypalbuminämie bei Lebersythesstörungen aufgrund der hepatischen Metastasierung oder bei Tumorkachexie. Zusätzlich besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung paraneoplastisch bedingten Thrombosen mit der Komplikation einer Lungenarterienembolie. Die Thrombophlebitis migrans sowie kutane Manifestationen sind markante, aber seltene klinische Erscheinungsbilder (Beger, 2013).

Klinische Kriterien zur Differentialdiagnose von Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis:

Kriterium	Pankreaskarzinom	Chronische Pankreatitis
Oberbauchschmerz	kontinuierlich	Intermittierend
Gewichtsverlust	rasch progredient	langsam progredient
Pankreasinsuffizienz	selten	Häufig
Ikterus	häufig bei Pankreaskopfkarzinom	Selten
Anämie	häufig	Selten
Verlauf	rasch progredient	Oligosymptomatisch

Tab. 1.1.6.1 Klinische Kriterien zur Differentialdiagnose von Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis (Pschyrembel & Bach, 2010)

Eine sorgsame Beobachtung der beschriebenen Beschwerden und eine Kontrolle durch den Arzt stellen die einzige Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung des Bauchspeicheldrüsenkrebses dar. Je früher der Tumor entdeckt wird, umso höher sind die Heilungschancen. Der überwiegende Teil der Untersuchungen ist nicht oder wenig belastend für den Patienten, jedoch ist die Aussagekraft im Frühstadium leider sehr begrenzt.

1.1.7 Diagnostik

Sorgfältige Anamnese und komplette körperliche Untersuchung sind Grundlage rationeller Diagnostik. Empfohlen wird eine Stufendiagnostik:

Diagnostik bei neu auftretenden Symptomen		Ausbreitungsdiagnostik	
Sonographie Oberbauch	Methode der ersten Wahl	Sonographie Abdomen	Methode der ersten Wahl
Computertomographie Oberbauch mit Kontrastmittel	Ergänzung/Alternative	Computertomographie Oberbauch mit Kontrastmittel	vor geplanter OP
Magnetresonanztomographie Oberbauch	Ergänzung/Alternative	Endosonographie der Pankreasregion	vor geplanter OP
Endosonographie	Ergänzung/Alternative	Röntgen Thorax	vor geplanter OP
CA 19-9 und CEA im peripheren Blut	Ergänzung	CA 19-9 und CEA im peripheren Blut	vor kausaler Therapie
Biopsie mit Histologie oder Zytologie	entbehrlich vor kurativer Operation, obligat vor palliativer Therapie	Biopsie mit Histologie oder Zytologie	bei unklaren Raumforderungen v. a. mit Metastasierung
		Magnetresonanztomographie Oberbauch	Fakultativ
		Positronenemissionstomographie	Fakultativ
		Laparoskopie	fakultativ

Tab. 1.1.7.1 Diagnostik (Fietkau, Heinemann, Oettle, Knoefel, & Tannapfel, 2010), DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie 2010 (Stand: 12.08.2016)

Diagnostische Verfahren der ersten Wahl sind die Oberbauchsonographie, die Endosonographie, die Multidetektor-CT-Untersuchung sowie die MRT in Kombination mit der MRCP (Magnetresonanztomographie Cholangio-Pankreatikographie) (Seufferlein et al., 2013). Die Diagnostik des Pankreaskarzinoms beginnt mit der Sonographie des Abdomens. Der transabdominale Ultraschall kann erste Hinweise auf das Vorliegen eines Tumorbefundes im Pankreas und eine mögliche Ausbreitung in andere Organe oder bereits vorhandene Metastasen besonders in der Leber liefern. 80% aller Patienten zeigen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose ein metastasiertes Stadium

(Lymphknoten, Leber). Die Sonographie ermöglicht ferner den Nachweis eines tumorbedingten Verschlussikterus und kann somit eine rasche endoskopische Maßnahme zur Behebung der Engstelle und des Gallenstaus veranlassen (Stent oder Endoprothese) (Büchler et al., 2004).

Eine Röntgen-Thorax Untersuchung gehört obligat zum Tumorstaging. Die abdominale Multidetektor-Computertomographie ist dann obligat, wenn in der Abdomensonographie keine Metastasierung nachgewiesen wurde. Die Computertomographie (CT) stellt das Standardverfahren zur Beurteilung der Größe des Primärtumors und der lokalen Tumorausbreitung dar. Die bildliche Dokumentation sonographischer Verfahren ist aus chirurgischer Sicht oft nicht ausreichend und die sonographischen und endosonographischen Verfahren untersucherabhängig (Dewitt, Devereaux, Lehman, Sherman, & Imperiale, 2006). Die CT ermöglicht vor allem die Beantwortung der Frage nach einer retropankreatischen Gefäßinfiltration. Eine Infiltration der pankreasnahen großen Arterien bedeutet in der Regel eine Kontraindikation für die operative Therapie. Die Infiltration der retropankreatischen großen Venen ist primär keine Kontraindikation für radikale chirurgische Maßnahmen. Dasselbe gilt für peripankreatische Lymphknotenmetastasen. Bei spezifischem Verdacht auf Gefäßinfiltration kann fakultativ eine Angiographie vorgenommen werden. Auch die Untersuchung des Blutes trägt zur Diagnosestellung bei. Die Ergebnisse sind meist unspezifisch mit einer minimalen Veränderung der Leberwerte, Hyperglykämie und Anämie (Hidalgo, 2010). Im Serumlabor findet sich bei drei Vierteln der Patienten eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase und des Bilirubins bei gleichzeitig nachgewiesener Anämie (Büchler et al., 2004).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wird in Ausnahmefällen durchgeführt z.B. bei Kontrastmittelunverträglichkeit oder eingeschränkter Nierenfunktion, manchmal ergänzend zur CT und ist bezüglich der Beurteilbarkeit des Tumorstadiums oder der Operabilität mit der CT vergleichbar. Über spezielle Untersuchungstechniken besteht die Möglichkeit sowohl den Gang der Bauchspeicheldrüse als auch den Gallengang abzubilden (MRCP). Eine Literaturübersicht zum MRT ergab eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektion einer biliären Obstruktion, jedoch eine geringe Sensitivität bei der Differenzierung zwischen benignen und malignen Ursache der Obstruktion (Romagnuolo et al., 2003).

Die endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) ermöglicht die Darstellung von tumorbedingten Einengungen und mit Hilfe von speziellen Instrumenten lässt sich Zell- und Gewebematerial aus dem Tumor gewinnen. Zusätzlich bietet die ERCP die Option im gleichen Untersuchungsgang die Engstellen im Gallengang durch die Einlage von Plastik- oder Metallgitterröhrchen (Stents) zu behandeln, sodass ein Abfluss der Galle in den Dünndarm ermöglicht wird. Die ERCP ist alleine zur Diagnose eines duktales Pankreaskarzinoms nicht geeignet, da sie lediglich Gangveränderungen nachweist und nicht die Raumforderung selbst darstellt (Adamek et al., 2000). Eine Feinnadelbiopsie kann unter Ultraschallkontrolle entweder durch die Bauchwand

oder die Magenwand bei einer Endoskopie zur Gewinnung von Zellmaterial des Tumors entnommen werden. Zur präoperativen Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung und zur Beurteilung der Resektabilität sind die Multidetektor-CT und die Endosonographie zu bevorzugen (Bipat et al., 2005). Zur Therapieevaluation in der palliativen Situation wird das Tumorsprechen im Verlauf einer palliativen Chemotherapie ebenso zuerst mittels Oberbauchsonographie ermittelt. Falls die Untersuchung keine Aussage zum Verlauf erlaubt, wird eine CT durchgeführt.

Die Staging-Laparoskopie ist fakultativ einzusetzen und vor allem dann von Bedeutung, wenn ein exzessiv erhöhter CA 19-9 Wert oder Aszites vorliegt und der Verdacht einer peritonealen Aussaat sich erhärtet ohne dass dies in der Bildgebung nachweisbar ist. In bis zu einem Drittel werden Befunde erhoben, die eine kurative Resektion ausschließen (Schachter et al., 2000; Vollmer et al., 2002). In der Diagnostik und Differenzialdiagnostik des Pankreasadenokarzinoms nimmt die Labordiagnostik neben der Bildgebung eine Schlüsselstellung ein. Der am meisten verbreitete Tumormarker für das Pankreasadenokarzinom ist das carcino-embryonale Antigen 19-9 (CA 19-9). CA 19-9 hat eine Sensitivität von 81% bei einer Spezifität von 90% und ist auch bei anderen Gastrointestinalen-Tumoren erhöht. Die Hauptfunktion von CA 19-9 ist der Nachweis eines Rezidiv nach Pankreasresektion sowie das Therapieansprechen unter Chemotherapie neben der Bildgebung zu überwachen. Der Tumormarker ist ungeeignet Frühformen des Pankreaskarzinoms zu detektieren. Nur 55% der Patienten mit einer Raumforderung von < 3cm weisen erhöhte CA 19-9 Spiegel auf (bezogen auf einen Grenzwert von 37 U/ml). Auch benigne Erkrankungen, insbesondere die chronische und akute Pankreatitis, aber auch Zirrhose, Cholangitis und Cholestase führen zu erhöhten Werten (Beger, 2013).

1.1.8 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten sind abhängig vom Tumorstadium. Im Rahmen der Entwicklung von Behandlungsalgorithmen wurden die Patienten je nach Ausmaß und Ausdehnung des Pankreaskarzinoms in verschiedene Gruppen eingeteilt (D. Li et al., 2004):

Lokal begrenzte Stadien (chirurgische Resektion potenziell möglich)

In diesem Stadium gibt es keinen Hinweis auf die Infiltration des Gefäßsystems oder Fernmetastasen (D. Li et al., 2004). Bei 15-20% der Patienten kann eine Resektion des Pankreaskarzinoms vorgenommen werden (D. Li et al., 2004). Kriterien für die Indikation zur Operation sind die Resektabilität auf der Basis der präoperativen Diagnostik und die Komorbidität des Patienten (Seufferlein et al., 2013). Nach der R0&R1 Resektion ist eine adjuvante Chemotherapie indiziert. Sie

verlängert das krankheitsfreie Überleben und die Gesamtüberlebenszeit (Neoptolemos et al., 2010; John P. Neoptolemos et al., 2004).

Lokal fortgeschrittene Stadien (Locally Advanced Pancreatic Cancer (LAPC))

LAPC bezeichnet einen Tumor, der bereits in die Gefäßstrukturen vorgedrungen ist aber noch keine Metastasierung in die Leber, das Peritoneum oder die Brust stattgefunden hat (D. Li et al., 2004). Bei etwa 15-20% der Patienten wird ein fortgeschrittener, nicht metastasierter Tumor diagnostiziert. Sie haben ein medianes Überleben von 9-11 Monaten (Beger, 2013). Das wichtigste Behandlungsziel in dieser Patientengruppe stellt die Herstellung der Resektabilität des Tumors dar. Zunächst werden den LAPC Patienten eine Systemtherapie mit Gemcitabin zugeführt (Induktionstherapie). Eine lokoregionäre Intensivierung der Behandlung durch eine Radiochemotherapie wird nur durchgeführt, wenn sich im Verlauf der Induktionstherapie keine Fernmetastasen entwickeln. Nach jedem Therapieschritt wird die Resektabilität des Tumors beurteilt (Fietkau et al., 2010; Oettle et al., 2007). Die palliative Behandlung dieser Erkrankung darf sich nicht alleine auf die Chemotherapie fokussieren, sondern muss Ernährungstherapie, Schmerztherapie und Psychoonkologie frühzeitig mit einbeziehen (Beger, 2013).

Fernmetastasen (chirurgische Intervention unmöglich)

Bei etwa 60-70% der Patienten wird das metastasierte Stadium diagnostiziert. Das mediane Überleben in der Mehrzahl der kontrollierten klinischen Studien beträgt 6-8 Monate (Beger, 2013). Die Therapie in fortgeschrittenen, metastasierten Stadien ist palliativ. Das Stadium ist gekennzeichnet durch Schmerzen, Kraftlosigkeit, Anorexie und Kachexie (D. Li et al., 2004). Palliative Chemotherapie führt zur Verbesserung der Lebensqualität und einer Verlängerung der Überlebenszeit und sollte nach Feststellung der Inoperabilität oder beim Nachweis von Metastasen begonnen werden. Zusätzlich werden weitere palliative Therapien durchgeführt, die v.a. die körperlichen und psychischen Beschwerden lindern (Glimelius et al., 1996).

1.1.8.1 Chirurgische Therapie

Die radikale chirurgische Resektion ist die einzige kurative Option. Durch alleinige Chemo- und/oder Strahlentherapie lässt sich bei diesem Tumor keine Heilung erzielen (Doi et al., 2008). Allerdings liegt das Langzeitüberleben nach Resektion immer noch unter 20% (Wagner et al., 2004). Im Falle des Nachweises von Fernmetastasen (Organmetastasen, Peritonealkarzinose, als Fernmetastasen geltende Lymphknotenmetastasen) verbessert die Resektion des Primärtumors die Prognose der Patienten nicht (Seufferlein et al., 2013). Um die Chance auf das Langzeitüberleben zu verbessern ist das Ziel des chirurgischen Eingriffs die Resektion im gesunden (R0). Generell gilt, je weiter der Tumor vom Resektionsrand entfernt ist, desto besser die Prognose. Von einer R0-Situation kann nur gesprochen werden, wenn am Resektionsrand mikroskopisch definitiv keine Karzinomzellen nachweisbar sind. R1 bedeutet, dass am Resektionsrand Karzinomzellen gefunden werden. Auch lokal fortgeschrittene Karzinome können ggf. mit den entsprechenden Nachbarorganen en bloc reseziert werden. Die Prognose bei erweiterter R0 Resektion ist identisch zu der nach Standardresektion (Sasson et al., 2002). Das postoperative Überleben ist bei einer Infiltration venöser Gefäße deutlich günstiger als bei einer Infiltration arterieller Gefäße. Das mediane Überleben liegt bei 12-13 Monate vs. 6-9 Monate (Boggi et al., 2009; C. Wang et al., 2008).

Je nach Größe und Ausdehnung des Tumors kann es notwendig sein ein Teil des Magens zu entfernen. Bei Karzinomen des Pankreaskopfes wird in der Regel die partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Pylorusinhalt vorgenommen, bei starker Ausdehnung des Tumors nach links in seltenen Fällen eine totale Pankreatektomie durchgeführt. Als Resektionsmethode findet die sogenannte „pyloruserhaltende Whipple“ oder die „klassische Whipple“ Technik bei der eine Teilentfernung des Magens vorgenommen wird, Anwendung. Beide Verfahren sind bezüglich Langzeitergebnissen, Letalität und postoperativen Komplikationen gleichwertig (Diener et al., 2007; Lin, Shan, Lin, & Hung, 2005). Die Pankreaslinksresektion wird als operatives Verfahren der Wahl der Karzinome im Pankreaskorpus oder -schwanz betrachtet. Sie umfasst die Entfernung des Bauchspeicheldrüsenkörpers und des -schwanzes zusammen mit den umgebenden Lymphknoten und der Milz. Pankreaskorpuskarzinome können ggf. auch eine totale Duodenopankreatektomie erforderlich machen. Das Alter der Patienten stellt prinzipiell keine Kontraindikation für einen viszeralchirurgischen Eingriff dar, jedoch sollte eine präoperative, sorgfältige, interdisziplinäre Beurteilung unter Berücksichtigung der Behandlungsalternativen v.a. bei Risikopatienten erfolgen (Seufferlein et al., 2013).

1.1.8.2 Chemotherapie

Nach der Resektion des Tumors wird eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt, in primär nicht kurativ zu operierenden, metastasierten bzw. lokal fortgeschrittenen Fällen bleibt die palliative Chemotherapie die einzige Option (Stocken et al., 2005; Sultana et al., 2007; Ueno et al., 2009). Auch die neoadjuvante Chemotherapie, die eine präoperative Behandlung einer (potenziell) resektablen Tumorerkrankung darstellt, gewinnt immer mehr an Bedeutung (Lim et al., 2012). Zwei große randomisierte Studien belegen die Effektivität einer über 6 Monate durchgeführten adjuvanten Chemotherapie. Die Behandlung sollte innerhalb 6 Wochen nach der Operation eingeleitet werden. Diese Empfehlung gilt gleichermaßen für R0- und R1-resezierte Patienten. Risikofaktoren wie Grading oder T-Kategorie spielen für die Entscheidung zur adjuvanten Chemotherapie keine Rolle, ebenso wie die generelle Altersbeschränkung (Seufferlein et al., 2013). In der ESPAC-1 Studie wurden zwei Patientengruppen verglichen: Ein Teil erhielt 5-Fluorouracil (5 FU/Folinsäure), der andere Teil bekam keine Chemotherapie. Neoptolemos JP et al. konnte eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 15,5 auf 20,1 Monate zeigen. Auch das geschätzte 5-Jahres-Überleben (21% vs. 8%) fiel zugunsten der Chemotherapie aus (J. P. Neoptolemos et al., 2004). In der CONKO-001-Studie wurde eine adjuvante Gemcitabin-Behandlung gegen einen Beobachtungsarm geprüft. Das mediane krankheitsfreie Überleben betrug 13,4 Monate in der Gemcitabin-Gruppe und 6,9 Monate in der Beobachtungsgruppe. Das Gesamtüberleben konnte signifikant von 20,2 auf 22,8 Monate verlängert werden. Aufgrund der genannten Ergebnisse wird die adjuvante Chemotherapie des Pankreaskarzinoms als etablierter Therapiestandard betrachtet (Oettle et al., 2013; Oettle et al., 2007).

Kontraindikationen für eine adjuvante Chemotherapie sind unter anderem ein sehr schlechter Allgemeinzustand, unkontrollierte Infektionen, Leberzirrhose Child B und C, schwere koronare Herzkrankheit oder Herzinsuffizienz, prä- und terminale Niereninsuffizienz und eingeschränkte Knochenmarksfunktion (Seufferlein et al., 2013). Gemcitabin und FU/Folinsäure werden als Standardchemotherapeutika in der adjuvanten Therapie eingesetzt. Die ESPAC 3 Studie hat eine gleichwertige Wirksamkeit beider Medikamente gezeigt. Beide Substanzen verbessern signifikant das Gesamtüberleben, allerdings war die Toxizität des Gemcitabinregims im Vergleich zum 5-FU-Bolus-Protokoll geringer (Neoptolemos et al., 2010). Da zwei gleichwertige Chemotherapieprotokolle zur Verfügung stehen, sollte bei Unverträglichkeit auf das andere gewechselt werden. Tumorbiologisch erscheint die neoadjuvante systemische Chemotherapie auf Grund der sehr frühen Metastasierung sinnvoll. Mit dieser präoperativen Behandlung kann eine frühe Behandlung der Mikrometastasen erfolgen und eine potentielle R0-Resektionsrate bei potentiell resektablen Patienten erreicht werden (Haeno et al., 2012; Heinrich et al., 2008). Beim metastasierten bzw. lokal fortgeschrittenen

Pankreaskarzinom hat sich die palliative Chemotherapie gegenüber der rein supportiven Therapie hinsichtlich des Überlebens und der Lebensqualität als überlegen erwiesen (Yip, Karapetis, Strickland, Steer, & Goldstein, 2006). Seit der Studie von Burris et al. hat sich Gemcitabin als Standard etabliert (Burris et al., 1997). In Studien erhielten 16-57% der Patienten nach Versagen der Erstlinientherapie eine Zweitlinienbehandlung (Boeck & Heinemann, 2008). Die im Rahmen einer Zweitlinientherapie erwarteten Überlebenszeiten liegen im Bereich von 3-9 Monaten (Custodio, Puente, Sastre, & Diaz-Rubio, 2009). Alternativ zur Gemcitabin Monotherapie kann eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Erlotinib beim metastasierten Pankreaskarzinom eingesetzt werden. Das 1-Jahres-Überleben lag in einer Phase III Studie bei 24% mit Kombinationstherapie vs. 19% der Gruppe, die nur mit Gemcitabin behandelt wurde (Moore et al., 2007). Die Kombination von 5 FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin nach dem sogenannten FOLFIRINOX-Protokoll kann bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und günstigem Risikoprofil eingesetzt werden. Eine große randomisierte Studie konnte einen deutlichen Vorteil des FOLFIRINOX Regimes im Vergleich zu Gemcitabin zeigen. Dennoch steht dem klinisch relevanten Nutzen eine deutlich höhere Toxizität gegenüber. Im Vergleich mit der Gemcitabin Therapie traten beispielsweise öfter Neutropenie und Diarrhoe auf (Conroy et al., 2011).

Eine interessante neue Therapieoption für das metastasierte Pankreaskarzinom stellt die Kombination aus nab-Paclitaxel und Gemcitabin dar. Das Tumoransprechen betrug 23% in der Kombinationsgruppe im Vergleich zu 7% der Gemcitabingruppe, wobei die Kombinationsgruppe eine größere Nebenwirkungsrate zeigte (Von Hoff et al., 2013). Langzeitrezidive und Fernmetastasierung spielen bei den Tumorrezidiven eine Rolle (Hishinuma et al., 2006). Daher sind multimodale Therapiestrategien prinzipiell sinnvoll, um das Langzeitüberleben zu verbessern. Voraussetzung für eine adjuvante bzw. additive Therapie ist die kurative intendierte Pankreasresektion (R0/R1) (Seufferlein et al., 2013). Eine mögliche Erklärung für die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegen Chemotherapie ist das Stromareichtum und die Hypovaskularität des Tumors. Beide Komponenten tragen zu einem eingeschränkten Transport zytotoxischer Substanzen bei (Neesse et al., 2011). Die neuen Therapieansätze wie beispielsweise nab-Paclitaxel, Hyaluronidase, Sonic Hedgehog sind gegen das Tumorstroma gerichtet und versuchen auf diese Weise, Resistenzmechanismen zu überwinden (Beger, 2013). Vor Durchführung einer palliativen Chemotherapie muss die Diagnose zytologisch oder histologisch gesichert sein um Differenzialdiagnosen und damit eine mögliche Fehlbehandlung auszuschließen (David et al., 1998).

1.1.8.3 Strahlentherapie

Prinzipiell kann eine Strahlentherapie zur Tumorverkleinerung und zur Verbesserung der Resektabilität eingesetzt werden, jedoch sollte eine palliative Strahlentherapie nur bei lokal symptomatischen Metastasen oder lokalen Metastasen mit drohender Symptomatik mit dem Ziel der Symptomlinderung und zur Vermeidung von Komplikationen erfolgen (Seufferlein et al., 2013). Die Radiochemotherapie führt zu einer ausgeprägteren lokalen Remission als die alleinige Chemotherapie (Brunner, 2013). Die systemische Wirkung der simultan applizierten Chemotherapie können zwar auch Fernmetastasen zur Remission bringen, dies jedoch deutlich seltener und weniger effektiv als eine alleinige Systemtherapie. Deshalb scheiden Patienten mit Fernmetastasen aus (Beger, 2013). Grundsätzlich kann eine adjuvante, postoperative Radiochemotherapie als Option nach einer R1 Resektion, eine neoadjuvante Radiochemotherapie bei fortgeschritten inoperablem Pankreaskarzinom ohne Fernmetastasen und eine palliativen Bestrahlung der Metastasen durchgeführt werden (Klautke & Brunner, 2008). Vor jeder Behandlung sollte eine sorgfältige Nutzen-Schaden-Abwägung erfolgen. Die aktuelle Leitlinie S3 exokrines Pankreaskarzinom von 2013 empfiehlt eine Strahlentherapie/Strahlenchemotherapie nicht außerhalb von randomisierten, kontrollierten Studien durchzuführen (Seufferlein et al., 2013). Es sind weitere Studien nötig, die die heutigen methodischen Anforderungen erfüllen, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Problempunkte in der bisherigen Forschung waren beispielsweise das Studiendesign, die Studiendurchführung oder eine mangelnde Fallzahl. Dies könnte ein Grund für die immer noch widersprüchlichen Forschungsergebnisse im Bereich der Strahlentherapie sein. Während viele Studien einen Erfolg der Therapie verzeichnen, gibt es dennoch einige Studien, wie beispielsweise die ESPAC1-Studie von Neoptolemos et al., der sogar eine Verschlechterung des Überlebens durch Radiotherapie festgestellt hat (J. P. Neoptolemos et al., 2004; Regine et al., 2011; Van Laethem et al., 2010). Sehr selten wird die Strahlentherapie mit dem alleinigen Ziel der Schmerztherapie eingesetzt (Seufferlein et al., 2013).

1.1.8.4 Supportive, palliative Therapie

Die palliative Therapie verläuft symptomorientiert und beinhaltet die Behandlung der körperlichen und psychischen Beschwerden. Viele Patienten leiden unter tumorbedingten Komplikationen sowie belastenden Symptomen und den Folgen der Behandlung, wie beispielsweise Schmerzen, Gewichtsverlust, Erschöpfung, pankreopriver Diabetes mellitus, Appetitlosigkeit, Übelkeit, Durchfall, Abflussstörungen der Galle und Aszites. Alle Patienten mit einem Tumor der Bauchspeicheldrüse erhalten zu den bereits erläuterten spezifischen Therapien weitere unterstützende Maßnahmen zur

Linderung der Beschwerden und Verbesserung der Lebensqualität. Dies betrifft insbesondere die Patienten im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium der Erkrankung. Kleine operative oder endoskopische Eingriffe können Patienten mit Einengung des Gallengangs, des Magenausgangs und des Zwölffingerdarms längerfristig gut helfen bei denen eine Resektion des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose nicht mehr möglich war. Stents oder Endoprothesen wirken einer Verengung entgegen. Metallstents sind Therapie der ersten Wahl bei der tumorbedingten Cholestase, Plastikstents sollen bei einer Überlebenszeit < 3 Monate eingesetzt werden. Metallstents haben eine geringere Reokklusionsrate als die Plastikstents, aber hinsichtlich des technischen oder primär therapeutischen Erfolgs gibt es keine Unterschiede (Moss, Morris, & Mac Mathuna, 2006).

Zu den unterstützenden Therapien gehört des Weiteren die Schmerztherapie, die Thrombosenprophylaxe, die Ernährungsberatung, die Sicherstellung der Ernährung, die v.a. auch die Enzym-, Diabetes- und Vitamintherapie beinhaltet, ebenso wie die Pflege und Organisation der häuslichen Betreuung (A. Vincent, Herman, Schulick, Hruban, & Goggins, 2011). Ein allgemeingültiges Nachsorgeprogramm gibt es nicht. Jedoch ist es sinnvoll eine Verlaufskontrolle mittels Computertomographie in Verbindung mit der Bestimmung der Tumormarker (CA 19-9, CEA) durchzuführen, um ein mögliches Rezidiv, das häufig innerhalb des ersten Jahres auftritt, frühzeitig zu entdecken. Untersuchungen nach der kurativen Therapie sind wichtig um Komplikationen oder Spätfolgen zu erkennen, wie beispielsweise die Symptome exokriner und endokriner Pankreasinsuffizienz (Beger, 2013).

1.1.9 Prognose

Die Heilungschancen für Patienten mit der Diagnose Pankreaskarzinom sind gering. Etwa 90% der Patienten sterben im ersten Jahr nach der Diagnose. Die 5-Jahres-Heilungsrate des Pankreaskarzinoms liegt derzeit international bei 1-10%. Zum Zeitpunkt der Diagnose haben bereits 80% Metastasen und 60% aller resektablen Pankreaskarzinome zeigen im endgültigen histologischen Präparat Lymphknotenmetastasen. Der wichtigste Prognosefaktor ist der Allgemeinzustand des Patienten (Performance-Status). Patienten die gut auf eine systemische Therapie ansprechen und in einem guten Allgemeinzustand sind, haben eine überdurchschnittliche Überlebenszeit. Weitere zum Teil kontrovers diskutierte Faktoren sind Gewichtsverlust, Schmerzen, Tumormarker (z.B. CA19-9) sowie Akut-Phaseparameter (z.B. CRP) (Focus Onkologie, V. Heinemann, 2009). Ein elementares Ziel stellt die Forschung im Grundlagenbereich dar, um bessere Diagnoseverfahren für die klinische Praxis zu entwickeln und damit eine frühzeitige Diagnose zu ermöglichen (J.Werner et al., 2010). Darüber hinaus ist es essentiell durch weitere intensive Forschung die Behandlungsergebnisse v.a. im Bereich der kombinierten Therapiemodalitäten (Chirurgie + Radiotherapie + Chemotherapie) zu verbessern

(Büchler et al., 2004). Die vergangenen Jahre zeigen, dass durch die Einführung neuer Chemotherapien v.a. die Behandlung der Patienten mit gutem Allgemeinzustand deutlich verbessert werden konnte.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem spielt eine komplexe Rolle bei der Vermeidung, der Entstehung und der Progression des Pankreaskarzinoms. Die Aktivität des Immunsystems gegenüber Krebszellen ist ein wichtiger Faktor für die Prognose bei Krebspatienten (Solomayer et al., 2003). Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist eine Fehlfunktion des Immunsystems das sich in Form einer hochgradigen Immunsuppression zeigt. Zusätzlich findet man im Tumor und der Tumorumgebung Immunzellen, die das Wachstum des Tumors fördern (Inman, Francis, & Murray, 2014). Es ist wichtig die Interaktion zwischen Tumor und dem Immunsystem besser zu verstehen um neue, effizientere Behandlungsmethoden zu entwickeln oder bestehende zu optimieren.

Die Pathogenese des Pankreaskarzinoms zeigt, dass schon kleine genetische Alterationen ausreichen damit aus gesunden Körperzellen maligne sich ausbreitende Karzinomzellen entstehen. Chemische Noxen, chronische Entzündungen oder Strahlenschäden sind einige Beispiele die zu diesen zellulären Veränderungen führen. Diese Prozesse finden vielfach und ständig in jedem Menschen statt und trotzdem entstehen nicht regelmäßig maligne Neoplasien. Verhindert wird dies in aller Regel von einem System aus verschiedenen spezialisierten Zellen und deren komplexem Zusammenspiel, dem Immunsystem. Die Aufgabe des Immunsystems besteht nicht nur in der Verteidigung des Körpers vor Angriffen exogener Noxen oder Mikroorganismen, sondern auch vor endogener Bedrohung in Form von Virenbefall oder maligner Entartung pathologisch veränderter Zellen. Eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems liegt darin zwischen „fremd“ und „selbst“ differenzieren zu können um gesunde Körperzellen nicht anzugreifen. Das Immunsystem bedient sich hierbei zweier sich ergänzender Teile, zum einen dem angeborenen und zum anderen dem adaptiven, erworbenen Immunsystem.

Um ein Individuum effektiv vor Krankheiten zu schützen muss das Immunsystem vier Hauptaufgaben bewältigen:

1.) *Die Immunologische Erkennung*

Dafür sind sowohl die Leukozyten des angeborenen Immunsystems, die eine sofortige Reaktion zeigen, als auch die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems zuständig.

2.) *Die Infektion eindämmen und abwehren*

Hierfür sind die Immuneffektorfunktionen, wie das Komplementsystem der Blutproteine, die Antikörper und das zerstörerische Potential der Lymphozyten und anderen Leukozyten verantwortlich.

3.) *Die Immunregulation*

Die Fähigkeit des Immunsystems sich selbst zu regulieren ist ein wichtiges Merkmal der Immunantworten um die Immunreaktion unter Kontrolle zu halten und damit den Körper vor Schäden zu schützen. Ein Versagen führt zu Allergien und Autoimmunkrankheiten.

4.) *Das immunologische Gedächtnis*

Dieses einzigartige Merkmal des adaptiven Immunsystems hilft dem Einzelnen vor einem erneuten Auftreten der Krankheit, wenn derselbe Krankheitserreger auftritt. Das Immunsystem reagiert bei erneutem Kontakt mit demselben Erreger sofort und stärker als beim ersten Kontakt (K. M. Murphy, Travers, Walport, & Ehrenstein, 2009).

1.2.1 Einteilung des Immunsystems

Im ersten Schritt der körpereigenen Tumorbekämpfung wird die so genannte „*unspezifische, angeborene Immunantwort*“ ausgelöst. Können die Tumorzellen im Rahmen der unspezifischen Immunantwort nicht eliminiert werden, startet die zweite Stufe der Immunantwort – die so genannte „*spezifische, adaptive Immunabwehr*“.

Das *angeborene, unspezifische Immunsystem* erkennt mit Hilfe verschiedener Zelltypen Pathogene, Tumoren und beschädigtes Gewebe. Zu den Zellen gehören die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DZ), Mastzellen und Natürliche Killer Zellen (NK). NK-Zellen sind auch an der Erkennung von Zellen beteiligt, die von intrazellulären Pathogenen befallen sind und virale Antigene oder veränderte Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren. Aktivierte Zellen des angeborenen Immunsystems produzieren Zytokine (Interferone (IFN), Interleukine(IL), koloniestimulierende Faktoren (KSF)) und Chemokine. Diese Moleküle führen zu Zellmigration, lokaler und systemischer Entzündung und aktivieren schließlich das adaptive Immunsystem. Die Zellen des angeborenen Immunsystems haben aber nur Pathogene unter Kontrolle, die bestimmte

Molekülmuster aufweisen. Um das große Spektrum von Pathogenen effektiv zu bekämpfen, ist das adaptive, spezifische Immunsystem von entscheidender Bedeutung (M. B. Wachsmann, L. M. Pop, & E. S. Vitetta, 2012).

Das adaptive, spezifische Immunsystem besteht aus zwei verschiedenen Zelltypen, den B- und T-Lymphozyten. Während die Spezifität der angeborenen Immunantwort auf Toll-like-Rezeptoren (TLR) und einigen weiteren Molekülen, die von NK-Zellen erkannt werden, beschränkt ist, haben die Zellen der adaptiven Immunantwort eine enorme Mannigfaltigkeit und können viele Millionen Antigen determinaten oder Epitope erkennen. Wird eine spezifische Immunantwort etwa durch die Erzeugung von Antikörpern ausgelöst, spricht man von einer adaptiven, erworbenen Immunantwort, da ein Mensch sie während seines Lebens als Anpassung an eine Infektion mit einem spezifischen Krankheitserreger entwickelt. Der große Unterschied zur angeborenen Immunantwort liegt in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, die eine lebenslange Immunität gegen eine erneute Infektion mit demselben Erreger bedeutet (K. M. Murphy et al., 2009).

1.2.2 Zellen des Immunsystems

Sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort basiert auf Aktivitäten der weißen Blutzellen oder Leukozyten. Diese Zellen gehen alle aus dem Knochenmark hervor und viele von ihnen entwickeln sich und reifen auch dort heran. Danach wandern sie in die peripheren Gewebe, einige bleiben innerhalb der Gewebe, andere zirkulieren im Blut oder dem lymphatischen Gefäßsystem. Aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich die direkten Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, der Blutplättchen und der beiden Hauptgruppen der weißen Blutzellen, der lymphatischen und myeloiden Zelllinie. Die gemeinsame myeloide Vorläuferzelle ist die Vorstufe der Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems, sowie der Megakaryozyten und roten Blutkörperchen. Die lymphatische Zelllinie umfasst die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems und die natürlichen Killerzellen der angeborenen Immunität (K. M. Murphy et al., 2009). Um das „Immunsystem als schlagkräftigste Waffe des Körpers“ mit seinem ausgeklügelten Abwehrsystem und der Rolle bei Krebserkrankungen besser verstehen zu können, ist es wichtig die Zellen des Immunsystems und deren Funktion näher zu betrachten:

1.2.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

1.2.2.1.1 Myeloide Zellen

1.2.2.1.1.1 Makrophagen

Makrophagen kommen in fast allen Geweben vor. Sie sind die gereifte Form der Monozyten, die im Blut zirkulieren und ständig in die Gewebe einwandern, wo sie sich ausdifferenzieren. Als Phagozyten bilden sie eine wichtige erste Abwehrlinie der angeborenen Immunität und tragen zur Entstehung von Entzündungen bei, die eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Immunantwort darstellt. Während der adaptiven Immunantwort interagieren sie mit Hilfe von Chemokinen und Zytokinen mit T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen) und agieren als antigenpräsentierende Zellen. Neben ihrer besonderen Funktion im Immunsystem fungieren sie als Fresszellen, indem sie tote Zellen und Zelltrümmer beseitigen (K. M. Murphy et al., 2009). Die Vorstufen des Pankreaskarzinoms (PanINs) und das Pankreaskarzinom weisen eine erhöhte Makrophageninfiltration im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe auf (Zheng, Xue, Jaffee, & Habtezion, 2013). Makrophagen können T-Zellen rekrutieren und aktivieren, aber ebenso das Tumorwachstum unterstützen, die Angiogenese fördern und zur Immunsuppression beitragen. CD8⁺-T-Lymphozyten und T-Helferzellen 1 (Th1-Zellen) können mit Hilfe von IFN- γ Makrophagen aktivieren. Trifft eine Th1-Effektorzelle auf einen infizierten Makrophagen, wird sie angeregt den makrophagenaktivierenden Faktor IFN- γ zu sezernieren und den CD40-Liganden zu exprimieren. Diese beiden neu synthetisierten Th1-Proteine aktivieren dann zusammen den Makrophagen. T-Helferzellen 2 (Th2-Zellen) aktivieren Makrophagen nur schlecht, da sie statt IFN- γ IL-10 bilden, ein Zytokin das Makrophagen inaktivieren kann (K. M. Murphy et al., 2009). Makrophagen sind als Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) ein wesentlicher Bestandteil des Tumorstromas des Pankreasadenokarzinoms (PDAC) und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Helm, Held-Feindt, Grage-Griebenow, Schäfer, & Sebens, 2012). TAM können sich in Folge von speziellen Tumorsignalen wie beispielsweise macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), Chemokinen und vascular endothelial growth factor (VEGF) aus Monozyten entwickeln. TAM werden funktionell in zwei Subtypen M1&M2 eingeteilt: Der M1 Subtyp produziert große Mengen IL-12, IL-23, toxische Zwischenprodukte und proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise tumor necrosis factor α (TNF α). Der M2 Subtyp lässt sich über die Produktion von transforming growth factor- β (TGF β), IL-10 charakterisieren, unterstützt die adaptive Th2-vermittelte Immunantwort, die Angiogenese und den Gewebeumbau. Proinflammatorische M1-Makrophagen gelten als tumorsuppressiv, während antiinflammatorische M2-Makrophagen als tumorfördernd angesehen werden. Der M2 Subtyp wird durch seine immunsuppressive Aktivität mit einer schlechten Prognose assoziiert (Helm et al., 2012; Kurahara et al., 2011; Mantovani, Ming, Balotta, Abdeljalil, & Bottazzi, 1986; Sica et al., 2008).

1.2.2.1.1.2 Myeloide Suppressorzellen (MDSC)

Myeloide Suppressorzellen (engl. **Myeloid-Derived-Suppressor-Cells**) sind eine heterogene Gruppe unreifer, myeloischer Zellen und myeloischer Vorläuferzellen, bestehend aus unreifen Makrophagen, Granulozyten und DZ. Sie reichern sich im Rahmen von Krebserkrankungen, Entzündungen und Infektionen an und zeigen eine beachtliche Fähigkeit zur Unterdrückung der T-Zell Antwort. MDSC stellen einen einzigartigen Bestandteil des Immunsystems dar. Sie regulieren die Immunantworten in gesunden und kranken Personen. In gesunden Individuen differenzieren sich die unreifen, myeloiden Zellen in reife Makrophagen, Granulozyten und DZ. Unter pathologischen Bedingungen, beispielsweise Krebs, unterbleibt ein Teil der Differenzierung zu reifen Zellen und es entwickelt sich eine Population immunsuppressiver MDSC. MDSC sind einer der hauptsächlichen, immunsuppressiven Faktoren bei Krebserkrankungen. Faktoren, die während akuten, chronischen Infektionen, Sepsis, Trauma oder von der Mikroumgebung des Tumors produziert werden, fördern die Ansammlung der unreifen, myeloiden Zellen, verhindern die Differenzierung zu reifen Zellen und leiten die Aktivierung der MDSC ein. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem IFN- γ , Liganden der Toll-like-Rezeptoren, IL-4, IL-13, und TGF- β . Die Aktivierung der unreifen, myeloiden Zellen zu der MDSC Population unter pathologischen Bedingungen, führt zur Hochregulierung der Expression ihrer immunsuppressiven Faktoren. Zu diesen Faktoren zählen arginase 1 (ARG1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) ebenso wie eine erhöhte Produktion von nitric oxide (NO) und reactive oxygen species (ROS) (Gabilovich & Nagaraj, 2009). Außerdem fördern die MDSC die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) und sezernieren TGF- β . Darüber hinaus produzieren aktivierte T-Zellen IFN- γ . Eine Blockade von IFN- γ kann eine MDSC vermittelte T-Zell Suppression bewirken. Zudem regulieren IL-4 und IL-13 die Aktivität von ARG1 nach oben, was wiederum die immunsuppressive Funktion der MDSC fördert. Weitere immunsuppressive Mechanismen der MDSC sind die Hochregulierung der cyclo-oxygenase-2 (COX-2), Prostaglandin E2 (PGE2) und die negative Regulierung der NK-Zell Antwort durch die Hemmung der Effektorfunktionen (Gabilovich & Nagaraj, 2009; Huang et al., 2006; H. Li, Han, Guo, Zhang, & Cao, 2009; Rodriguez et al., 2005; Serafini, Borrello, & Bronte, 2006).

Im Vergleich mit gesundem Pankreasgewebe liegt im duktalem Pankreaskarzinom und den Vorstufen des Tumors (PanIN) eine erhöhte Anzahl immunsuppressiver MDSC vor (Clark et al., 2007). Ein Anstieg der MDSC Population ist oft mit einer erhöhten Zirkulationsrate von granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) oder VEGF verbunden (Bronte et al., 1999; Melani, Chiodoni, Forni, & Colombo, 2003). In Mäusen werden die MDSC mit Hilfe der Co-Expression des myeloid-Zelllinien-Differenzierungsantigen GR1⁺ und CD11b⁺ charakterisiert. Durch die hohe Expression von GR1⁺ und der niedrigen Expression von F4/80 kann man sie gut von den TAM differenzieren. Beim

Menschen sind die Zellen entweder als CD14⁻CD11b⁺ definiert oder über die Expression von CD33 und der fehlenden Expression des Markers der reifen, myeloiden oder lymphoiden Zellen zu identifizieren (Almand et al., 2001). Mit Hilfe von Epitop spezifischen Antikörpern können zwei Untergruppen der MDSC unterschieden werden: Die granulozytären MDSC (CD11b⁺, Ly6G⁺, Ly6C⁻) und die monozytären MDSC (CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C⁺). Bei Krebserkrankungen sind beide entwickelt, jedoch ist die Population der granulozytären MDSC meist größer als die der monozytären MDSC (Gabrilovich & Nagaraj, 2009). Beide Untergruppen haben jeweils unterschiedliche Funktionen, sogar die Unterdrückung der T-Zellen ist andersartig. Der Unterschied liegt hierbei in der differentiellen Anzahl der Expression von ROS und NO. Interessanterweise unterdrücken beide Untergruppen der MDSC, trotz ihrer verschiedenartigen Mechanismen, die Antigen-spezifische T-Zell Proliferation in gleichem Ausmaß (Youn, Nagaraj, Collazo, & Gabrilovich, 2008).

1.2.2.1.1.3 Dendritische Zellen

Die Dendritische Zellen (DZ) sind wirkungsvolle Antigenpräsentierende Zellen, die eine entscheidende Rolle in der Initiierung, der Programmierung und der Regulation der tumor-spezifischen Immunantwort spielen. Ihre Funktion ist die Antigenerkennung und Antigenpräsentation fremder und intrazellulär aufgenommener Strukturen. Sie besitzen lange Zellausläufer, ähnlich den Dendriten des Nervensystems, von denen sich die Bezeichnung herleitet und stellen die Verknüpfung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem dar (K. M. Murphy et al., 2009; M. B. Wachsmann et al., 2012). Im humanen System der DZ lassen sich mindestens drei Subpopulationen unterscheiden: Die interstitiellen DZ der Haut und den lymphatischen Organen und zwei Untergruppen von DZ im peripheren Blut, die myeloiden CD11c⁺ DZ (cDZ) und die plasmazytoiden/lymphoiden CD11⁻ DZ (pDZ). Neben dem Unterschied in der Expression von CD11c weisen die Subpopulationen auch Unterschiede in der Regulation durch Zytokine auf (Merad, Sathe, Helft, Miller, & Mortha, 2013). Konventionelle DZ nehmen in den peripheren Geweben Antigene auf, werden durch Kontakt mit Krankheitserregern aktiviert und wandern zu den peripheren lymphatischen Organen, in denen sie als die wirkungsvollsten Stimulatoren der T-Zell Antworten fungieren. Plasmazytoide DZ nehmen ebenso Antigene auf und präsentieren sie, ihre Hauptaufgabe liegt jedoch in der Produktion von IFN- α und IFN- β (K. M. Murphy et al., 2009).

Dendritische Zellen sind als einzige Zellen in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren und damit eine primäre Immunantwort zu induzieren. Alle anderen Antigenpräsentierenden Zellen sind lediglich imstande, Antigene aufzunehmen, zu vervielfältigen und zu präsentieren. Durch Ausschüttung entsprechender Zytokine und Expression bestimmter Zelloberflächen-Rezeptoren beeinflussen sie T-Zellen und verstärken so die spezifische zelluläre Immunabwehr (Koido et al., 2011). DZ haben die

einzigartige Fähigkeit extrazellulär aufgenommene Peptide gleichzeitig auch an Major Histocompatibility Complex I Moleküle (MHC Klasse I-Moleküle) zu binden und zu präsentieren. Dies wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Normalerweise werden von den Körperzellen intrazelluläre Peptide nur auf MHC-I-Molekülen und von Antigenpräsentierenden Zellen extrazelluläre Peptide nur auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Durch die Kreuzpräsentation werden die potentiellen Antigene gleichzeitig für die CD4⁺-T-Lymphozyten (CD4-Zellen) und die CD8⁺-T-Lymphozyten (CD8-Zellen) erkennbar gemacht (Belz, Carbone, & Heath, 2002; Steinman, 1991).

1.2.2.1.2 Lymphatische Zellen (CD3⁺)

1.2.2.1.2.1 Natürliche Killer Zellen

Natürliche Killer Zellen (NK) sind Lymphozyten mit deutlich erkennbarer zytoplasmatischer Granula. Der wesentliche Unterschied zwischen ihnen und den B- oder T-Lymphozyten ist die unspezifische Aktivierung, eine Tumorzelle ohne vorausgegangene Stimulation anzugreifen und zu lysieren (Pampena Mí & Levy, 2015; Trinchieri, 1989). Trotz ihrer Verwandtschaft zu den T-Zellen tragen NK-Zellen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren und benötigen keine Ausreifung. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität gegen Viren und anderen intrazellulären Erregern, bei der Bekämpfung von Tumorzellen, sowie bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC). Bei der ADCC löst die Bindung von Antikörpern an die Immunglobulin Rezeptoren der NK-Zellen die Freisetzung von zytoplasmatischer Granula aus. Eine zweite Gruppe von Rezeptoren hemmt die Aktivierung und verhindert, dass NK-Zellen normale Körperzellen töten. Diese inhibitorischen Rezeptoren sind für verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle spezifisch (K. M. Murphy et al., 2009). Der Tod der Zielzelle beruht auf dem Gleichgewicht aus hemmenden und aktivierenden Signalen. NK-Zellen produzieren IFN- α , TNF- α , GM-CSF und IL-3 (Perussia, 1991; Sutlu & Alici, 2009). Der Tötungsmechanismus ist derselbe wie bei den zytotoxischen T-Zellen: Zytotoxische Granula werden an der Oberfläche der gebundenen Zielzelle freigesetzt, die enthaltenen Effektorproteine durchdringen die Zellmembran und lösen den programmierten Zelltod aus. NK-Zellen werden als Reaktion auf Interferone oder Zytokine der Makrophagen aktiviert (K. M. Murphy et al., 2009). Die Aktivierung der zytotoxischen NK-Zell-Antwort und deren Zytokinproduktion kann eine Ansammlung immunsuppressiver Zellen verhindern. Dies geschieht beispielsweise durch die Elimination von unreifen DZ, monozytären MDSC oder durch IFN- γ vermittelte M1-Polarisation der TAM (Stojanovic, Correia, & Cerwenka, 2013). Die Anzahl der CD8⁺-zytotoxischen-T- und NK-Zellen ist im Pankreaskarzinom und der Vorstufe des Tumors (PanIN) meist herabgesetzt, daher ist die Aktivität der NK-Zellen beeinträchtigt und verschlechtert sich weiter im fortgeschrittenen Krankheitsstadium.

Im Gegensatz zu anderen Entzündungszellen ist eine erhöhte Anzahl CD8⁺-T- und NK-Zellen mit einer guten Prognose assoziiert (Aparicio-Pages, Verspaget, Pena, & Lamers, 1991; Clark et al., 2007; Degrate et al., 2009; Fukunaga et al., 2004; Zheng et al., 2013).

1.2.2.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

1.2.2.2.1 Lymphatische Zellen (CD3⁺)

Die Lymphozyten sind die wichtigsten Effektorzellen in der Anti-Tumor-Antwort und befinden sich überwiegend im Stroma. Das umgebende Tumorstroma besteht u.a. aus einer großen CD4⁺-T-Lymphozyten Population, Makrophagen und einer kleinen Population von B-Lymphozyten und Plasmazellen. Patienten mit einem Pankreaskarzinom weisen im Vergleich mit gesunden oder an Pankreatitis erkrankten, eine geringere Anzahl zirkulierender Lymphozyten auf. Es gibt jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender und den Tumor infiltrierenden Lymphozyten. Sie gehören zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und lassen sich auf Grund ihres Reifungsortes in T-Lymphozyten (Reifung im Thymus) und B-Lymphozyten (Reifung im Knochenmark, „bone marrow“) einteilen (Emmrich, Sparmann, Hopt, Lohr, & Liebe, 1999; Fogar et al., 2006; M. B. Wachsmann et al., 2012).

1.2.2.2.1.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (B-Zellen) bilden eine der beiden Hauptformen der Lymphozyten. Der Antigenrezeptor auf den B-Lymphozyten, den man im Allgemeinen als B-Zell-Rezeptor bezeichnet, ist ein Zelloberflächenimmunglobulin. Nach der Aktivierung durch ein Antigen differenzieren sich B-Zellen zu Plasmazellen, die Antikörpermoleküle freisetzen, welche dieselbe Antigenpezifität besitzen wie der Rezeptor. Während T-Zellen an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind, sind die B-Zellen die Träger der humoralen Immunantwort. Die Sekretion der Antikörper stellt damit die wesentliche Aufgabe der erworbenen Immunität dar. Das Antikörpermolekül hat zwei Aufgaben: Einerseits die Bindung einer Vielzahl von Antigenen und andererseits die Wechselwirkung mit einer begrenzten Anzahl von Effektormolekülen und Zellen. Die Erkennungs- und Effektorfunktionen sind innerhalb eines Antikörpermoleküls strukturell voneinander getrennt. Ein Teil erkennt und bindet spezifisch das Pathogen oder Antigen, während der andere für verschiedene Eliminierungsmechanismen verantwortlich ist. Die Funktionen der Antikörper in der Immunabwehr bestehen u.a. aus der Neutralisierung toxischer Antigene, extrazellulärer Viren und Bakterien und der Aktivierung des Komplementsystems. B-Gedächtniszellen differenzieren sich aus reifen B-Zellen

nachdem sie das erste Mal Kontakt mit einem Antigen hatten. T- und B-Gedächtniszellen besitzen die Eigenschaft, das immunologische Gedächtnis auch auf ungeprägte („naive“) Empfänger übertragen zu können. Die Aufrechterhaltung des immunologischen Gedächtnisses, das durchaus ein bedeutendes Merkmal der adaptiven Immunantwort darstellt, beruht wahrscheinlich auf bestimmten Zytokinen und der homöostatischen Wechselwirkungen mit Selbst MHC: Selbst-Peptid-Komplexen. Die meisten unreifen B-Zellen sind kurzlebig, benötigen Zytokine und positive Signale über den B-Zell-Rezeptor, um heranzureifen und zu überleben (K. M. Murphy et al., 2009).

1.2.2.2.1.2 T-Lymphozyten

In Zusammenarbeit mit den B-Lymphozyten sind die T-Lymphozyten (T-Zellen) für die erworbene, adaptive Immunabwehr des Körpers verantwortlich. Nachdem eine T-Zelle durch ihren ersten Kontakt mit einem Antigen aktiviert wurde, bildet sie durch Proliferation und Differenzierung einen von mehreren Typen der T-Effektor Lymphozyten. Die T-Zell-Funktionen lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: *Abtöten, Aktivierung und Regulation*.

Im Thymus werden die T-Zellen für ihre unterschiedlichen Funktionen vorbereitet. Reife T-Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche den CD3-Komplex und zusätzlich entweder den CD4- oder CD8-Korezeptor. T-Zellen erkennen Antigene über einen spezifischen Rezeptor, den sogenannten T-Zell-Rezeptor (TCR). Dafür muss das Antigen allerdings von einer Antigenpräsentierenden Zelle (APC) angeboten werden. In diesem Punkt unterscheiden sich die T-Zellen von den B-Zellen. CD4⁺-T-Lymphozyten werden als *Helferzellen* angesehen, ihr CD4-Rezeptor erkennt zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor als Korezeptor die von Körperzellen exprimierte MHC-Klasse-II-Komplexe. CD8⁺-T-Lymphozyten gelten als *zytotoxische T-Zellen*, ihr Rezeptor erkennt Antigene, die über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden (K. M. Murphy et al., 2009).

CD8⁺-T-Lymphozyten/Zytotoxische T-Zellen (CD8-Zellen)

CD8⁺-T-Lymphozyten (CD8-Zellen) oder auch zytotoxische T-Zellen (CTL) genannt, sind überwiegend Killerzellen. Sie setzen Perforin, Granzyme und IFN- γ frei. Perforin unterstützt die Übertragung der Granzyme in die Zielzelle, wobei Granzyme, die in der Zelle aktiviert werden, dort eine Apoptose auslösen. CD8⁺-T-Zellen tragen zudem das membrangebundene Effektor Molekül Fas-Ligand (CD178). Bindet es an Fas (CD95) auf der Zielzelle, wird in dieser ein Apoptoseprogramm aktiviert (K. M. Murphy et al., 2009).

CD4⁺-T-Lymphozyten (CD4-Zellen)

CD4-Zellen können sich zu vier unterschiedlichen Effektorzellen ausdifferenzieren: T-Helferzelle 1 (Th1), T-Helferzelle 2 (Th2), T-Helferzelle 17 (Th17) und regulatorische T-Zellen (Treg). Die Differenzierung ist von der Art der Aktivierung abhängig.

T-Helferzellen (Th-Zellen) sind eine Gruppe der T-Lymphozyten im Blut, die eine Helferfunktion haben. Sie werden anhand der von ihnen ausgeschütteten Zytokine in zwei wichtige Subpopulationen eingeteilt, die jeweils verschiedene Funktionen haben. Die Th1-Zelle ist an der *zellulären* Immunantwort beteiligt, während die Th2-Zelle an der *humoralen* Immunantwort beteiligt ist. Ein weiterer T-Helferzelltyp (Th17) wurde im Jahr 2005 entdeckt. Dieser Typ bildet u.a. IL-17 und spielt daher eine Rolle bei der Regulierung von Entzündungsvorgängen (Harrington et al., 2005).

Th1-Zellen sind auf die Aktivierung von Makrophagen spezialisiert. Sie sezernieren IFN- γ um die infizierte Zelle ebenso wie weitere Effektormoleküle zu aktivieren. Sie können den membranständigen CD40- und/oder den Fas-Liganden exprimieren. Der CD40-Ligand löst die Aktivierung der Zielzelle aus, während der Fas-Ligand den Tod von Zellen auslöst, die Fas exprimieren. Die Expression des jeweiligen Moleküls bestimmt die Funktion der Th1-Zelle (K. M. Murphy et al., 2009).

Th2-Zellen sind darauf spezialisiert, Immunantworten gegen Parasiten zu stimulieren und fördern allergische Reaktionen. Des Weiteren unterstützen sie die Aktivierung der B-Zellen und sezernieren B-Zell-Wachstumsfaktoren IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13. Als membranständiges Effektormolekül exprimieren Th2-Zellen v.a. den CD40-Liganden, der auf der B-Zelle an CD40 bindet und diese zur Proliferation und zum Isotypwechsel anregt (K. M. Murphy et al., 2009).

Th17-Zellen produzieren Proteine der IL-17-Familie und IL-6, außerdem fördern sie akute Entzündungen, indem sie neutrophile Zellen zu Infektionsherden lenken (K. M. Murphy et al., 2009). Ob Th17 das Tumorwachstum fördert oder hemmt ist noch nicht ausreichend erforscht (M. B. Wachsmann et al., 2012).

Regulatorische CD4-T-Zellen sind CD4-T-Effektorzellen, die T-Zell-Reaktionen hemmen und als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet werden. $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ -Zellen produzieren inhibitorische Zytokine wie beispielsweise IL-10 und TGF- β (K. M. Murphy et al., 2009). Patienten, die an Pankreaskarzinom erkrankt sind, weisen eine erhöhte Anzahl zirkulierender Treg-Zellen auf. Ebenso ist die Anzahl der Treg-Zellen, die sich im Tumorgewebe befinden, signifikant erhöht und korreliert dabei positiv mit dem Stadium und dem Fortschreiten der Erkrankung (Hiraoka, Onozato, Kosuge, & Hirohashi, 2006; Ikemoto et al., 2006). Treg-Zellen lösen eine Toleranz Tumor-assoziierten-Antigenen gegenüber aus und unterdrücken die Anti-Tumor-Aktivität der T-Zellen (M. B. Wachsmann et al., 2012; Yamagiwa, Gray, Hashimoto, & Horwitz, 2001). In vivo Studien zeigen, dass eine Abnahme oder Depletion der Treg-Zellen das Tumorwachstum verhindert bzw. hemmt und die Tumor-spezifische-Immunantwort unterstützt. Eine erhöhte Treg-Zell Anzahl im Pankreaskarzinom basiert auf TGF- β , das vom Tumor sezerniert wird (Moo-Young et al., 2009; Viehl et al., 2006; M. B. Wachsmann et al., 2012). In einigen Fällen finden sich neben den Treg-Zellen auch $CD4^+$ -T-Zellen mit Th2 Funktion. Eine erhöhte Anzahl von Th1&Th2-Zellen der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Tils) ist mit einer kürzeren erkrankungsfreien Zeit und einer geringeren Gesamtüberlebenszeit verbunden (Bellone et al., 1999; De Monte et al., 2011; Tassi et al., 2008).

B- und T-Zellen, die durch ein Antigen aktiviert wurden, differenzieren sich im Verlauf einer Immunreaktion zu **Gedächtniszellen**. Diese Lymphozyten sind für eine langanhaltende Immunität verantwortlich. Sie entwickeln sich bei einem zweiten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen leicht zu Effektor-T-Zellen. CD4- und CD8-T-Zellen können sich zu zwei Untergruppen aus Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen differenzieren, die sich durch die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 unterscheiden. Diese Unterscheidung gibt es bei Mensch und Maus. Die **Effektor-Gedächtnis-T-Zelle** wird als solche bezeichnet, da diese Zellen rasch zu Effektor-T-Zellen heranreifen und nach einer erneuten Stimulation schnell große Mengen an IFN- γ , IL-4, IL-5 sezernieren können. Davon unterscheiden sich die **Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen**, die CCR7 exprimieren. Sie reagieren sehr empfindlich auf ein Quervernetzen des T-Zell-Rezeptors und exprimieren dann den CD40-Liganden. Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen brauchen länger um sich zu Effektor-T-Zellen zu entwickeln und sezernieren daher nicht so viele Zytokine gleich nach einer erneuten Stimulation. Naive T-Zellen (nicht aktivierte T-Zellen) und T-Gedächtnis-Zellen benötigen unterschiedliche Faktoren zum Überleben.

Naive T-Zellen bewegen sich ständig zwischen dem Blut und den lymphatischen Organen. Um in der Peripherie zu überleben, benötigen naive T-Zellen eine periodische Stimulation mit den Zytokinen IL-7 und IL-15 sowie mit körpereigenen Antigenen, die von MHC-Molekülen präsentiert werden. Nach

dem Priming mit ihrem spezifischen Antigen teilt sich eine naive T-Zelle und differenziert sich. Die meisten Nachkommen differenzieren sich zu relativ kurzlebigen Effektorzellen, einige wachsen jedoch zu langlebigen T-Gedächtnis-Zellen heran. Diese müssen durch Zytokine stabilisiert werden, benötigen allerdings allein für das Überleben keinen Kontakt mit Selbst-Peptit:Selbst-MHC-Komplexen. Der Kontakt mit körpereigenen Antigenen ist anscheinend für T-Gedächtnis-Zellen notwendig, damit sie sich weiterhin teilen können und ihre Anzahl in der Gedächtnispopulation konstant bleibt (K. M. Murphy et al., 2009).

NK-T-Zellen sind eine Gruppe von T-Zellen, die den Zelloberflächenmarker NK 1.1 exprimieren, der normalerweise mit NK-Zellen assoziiert ist. Außerdem besitzen sie einen $\alpha:\beta$ -T-Zell-Rezeptor, der jedoch praktisch invariant ist. NK-T-Zellen werden im Rahmen der frühen Immunantwort aktiviert (K. M. Murphy et al., 2009).

1.2.3 Zytokine

Unter Zytokinen versteht man eine heterogene Gruppe von kleinen oder mittelgroßen Proteinen oder Glykoproteinen, die als „Hormone“ des hämatopoetischen Systems fungieren. Sie werden auch als Botenstoffe des Immunsystems bezeichnet. Zytokine können auf die produzierende Zelle selbst (autokrin), auf einen anderen Zelltyp in der Umgebung (parakrin) oder über weite Entfernung (endokrin) wirken. Ein Zytokin kann von mehr als einem Zelltyp produziert werden und mehr als nur eine Funktion haben. Voraussetzung für die Zytokinwirkung ist die Expression eines passenden Rezeptors. Man unterscheidet fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone, Interleukine, kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine. Ein kleiner Überblick über die Zytokine, die Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind:

Zytokin	Produzierende Zellen	Wirkung
IL-1β	Makrophagen, Epithelzellen	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-2	T-Zellen	Proliferation der T-Zellen
IL-6	T-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Produktion von Proteinen der akuten Phase, Fieber
IL-10	Monozyten, Th2-Lymphozyten	Wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktionen, antiinflammatorisch, hemmt die Bildung von Zytokinen der Th1-Antwort und wirkt verlängernd auf das Überleben, Vermehrung und die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten.
IL-17	Th17-, CD8 ⁺ -, T-Zellen, NK-Zellen, γ : δ -T-Zellen	Induziert Zytokinproduktion bei Epithelien, Endothelien und Fibroblasten, entzündungsfördernd
TGF-β1	Chondrozyten, Monozyten, T-Zellen	Hemmt das Zellwachstum, entzündungshemmend, induziert Ig A-Freisetzung
IFN-γ	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung der Makrophagen, erhöhte Expression von MHC Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems, Ig Klassenwechsel, hemmt Th2-Zellen
VEGF	Tumorzellen, Tumorstromazellen	Für das Wachstum von Blutgefäßen notwendig (Angiogenese/ Neovaskularisation) v.a. bei Sauerstoffmangel der Zellen, Stimulation der Migration von Monozyten und Makrophagen

Tab. 1.2.3.1 Zytokine (K. M. Murphy et al., 2009)

1.2.4 Tumorimmunologie

Die Immunantwort gegen Tumorzellen erfolgt vom angeborenen und adaptiven Immunsystem. Eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort besteht aus der Erkennung der Tumor-assoziierten-Antigene (TAA) durch das Immunsystem und der Erzeugung der T- oder B-Zell Antwort, die die Tumorzellen unter Schonung des gesunden Gewebes tötet. CTL können Tumorzellen direkt töten. Paradoxerweise produzieren CTL und Th-Zellen jeweils Zytokine, die das Tumorwachstum verhindern oder fördern können. Sie helfen B-Zellen sich zu Gedächtniszellen zu differenzieren ebenso wie den Plasmazellen, Antikörper gegen den Tumor zu bilden. Diese Antikörper können die Tumorzellen opsonieren oder töten, das Wachstum stimulieren oder hemmen oder CTL am Töten der Tumorzellen hindern. Ebenso wie in anderen Tumormodellen scheint das Immunsystem der Patienten mit Pankreaskarzinom verschiedene Rollen zu übernehmen. Im Fall der „Anti-Tumor-Antwort“ verhindert das Immunsystem die Tumorentwicklung, indem abnormale Pankreaszellen erkannt und beseitigt werden. Im Fall der „Pro-Tumor-Antwort“ wird das Tumorwachstum direkt über Komponenten der Immunantwort stimuliert oder indirekt über eine Abschwächung der Anti-Tumor-Immunantwort (M. B. Wachsmann et al., 2012). Darüber hinaus tragen die Pankreaskarzinomzellen durch die Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine (TGF- β , IL-10, IL-6) und der Expression von Oberflächenmolekülen (VEGF, Fas-ligand (Fas-L), programmed death-1 ligand (PD-1L), indolamine-2 und dioxygenase (IDO)) selbst einen Teil zu der Immunsuppression bei. Außerdem besteht die Umgebung des Pankreaskarzinoms neben den Tumorzellen aus immunsuppressiven Zellen, wie beispielsweise tumor-assoziierte Fibroblasten, immunsuppressive tumor-assoziierte Makrophagen und T-regulatorischen Zellen. Demzufolge hemmen immunsuppressive Zellen die Anti-Tumor-Immunantwort mit Hilfe vieler Mechanismen (Koido et al., 2010). Die Akkumulation der immunsuppressiven Zellen im Pankreaskarzinom hängt eng mit der Größe des Tumors zusammen und korreliert positiv mit dem Krebsstadium (Koido et al., 2011).

1.2.5 Mechanismen wie Tumorzellen der Immunabwehr entgehen

Das Entkommen der Tumorzellen umfasst eine komplexe, dynamische Interaktion zwischen den Tumorzellen, den Zellen des Immunsystems und dem Stroma. Obwohl die Immunantwort während der Krebsentstehung durchaus das Potential hat, Tumorzellen zu eliminieren, kann das Immunsystem trotz Aktivierung, an der Beseitigung der Tumorzellen scheitern. Gründe hierfür sind beispielsweise das nicht Erkennen der Tumorantigene als „fremd“ oder gefährlich und eine zu langsame oder zu schwache Immunantwort v.a. in den Anfangsstadien des Tumors. Weitere Gründe sind die Zytokinüberproduktion der Tumorzellen, die die Immunantwort behindern indem sie Immunzellen

töten, in ihrer Wirkung hemmen oder das Tumorwachstum stimulieren. Des Weiteren können Antikörper, aktivierte T-Zellen und Zytokine Kollateralschäden wie etwa Gewebeschäden und eine Fehlsteuerung der Immunantwort verursachen (M. B. Wachsmann et al., 2012). Ein immunsuppressiv wirkendes Zytokin ist beispielsweise TGF- β , das die Reaktion inflammatorischer T-Zellen und die zellvermittelte Immunität unterdrückt, die zur Kontrolle des Tumorwachstums notwendig ist. Interessanterweise kann TGF- β auch die Entwicklung von Treg induzieren (K. M. Murphy et al., 2009). Zudem konnte auf Pankreaskarzinomzellen die Expression von Fas-Ligand und damit eine einhergehende Apoptose von Immunzellen im Tumor festgestellt werden (Ohta et al., 2004). Außerdem entwickeln sie anti-apoptotische Moleküle oder regulieren die Expression des Todesrezeptor CD95 herunter, um eine Apoptoseinduktion durch CTL zu vermeiden. Tumorzellen haben Mechanismen entwickelt um bereits in den Aufbau einer effektiven Immunantwort einzugreifen und damit dem Angriff zu entgehen. Hierzu zählen zum Beispiel der Verlust von Adhäsionsmolekülen, der Verlust oder die verminderte Expression der MHC-Peptid-Komplexe oder Defekte der Antigen-Prozessierung um einer Erkennung durch die CTL zu entgehen (Gilboa, 1999; Johnsen, Templeton, Sy, & Harding, 1999; Walker, Saas, & Dietrich, 1997).

Die Anpassungen der Krebszellen sind eine Folge von Mutationen durch die Krebszellen selbst und Selektion durch das Immunsystem. Die am besten angepassten Zellen überleben und vermehren sich weiter (Algarra, Garcia-Lora, Cabrera, Ruiz-Cabello, & Garrido, 2004; Khong & Restifo, 2002). Da der Begriff der Immunüberwachung, der nur die Schutzfunktion des Immunsystems betrachtet, der Tatsache des Selektionsprozesses nicht immunogener Tumorzellen nicht mehr gerecht wird, spricht man seit dem 21. Jahrhundert von Immunoediting. Das Immunoediting wird in drei Phasen eingeteilt: Elimination, Gleichgewicht (Equilibrium), und Entkommen (Escape). In der Phase der Elimination werden die Krebszellen durch das Immunsystem zerstört. Daran schließt sich eine Gleichgewichtsphase an, die dann eintritt, wenn die Beseitigung der Tumorzellen nicht vollständig erfolgt. Die Tumorzellen verändern sich aufgrund des vom Immunsystem ausgehenden Selektionsdrucks und mutieren um ihr Überleben zu sichern. In der letzten Phase, dem Escape, entkommt der Tumor der Immunüberwachung und kann nun ungehindert wachsen und wird klinisch sichtbar (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002).

Immunoediting

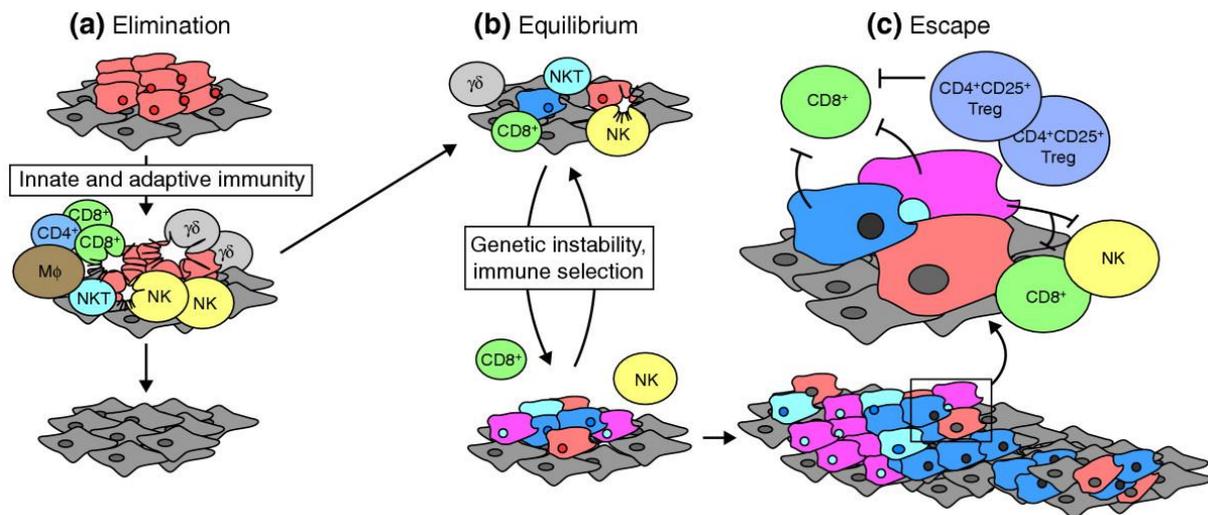


Abb. 1.2.5.1 Immunoediting (Strausberg, 2005). Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

1.2.6 Immune Interaktion mit der Tumormikroumgebung

Das Tumorstroma im Pankreaskarzinom besteht aus extrazellulärer Matrix, aktivierten Fibroblasten, Myofibroblasten, inflammatorischen Zellen, pankreatischen Sternzellen sowie Blut- und Lymphgefäßen. Das prominente, kollagenreiche Tumorstroma, durch das sich das duktales Pankreaskarzinom morphologisch charakterisiert, wird auch als Desmoplasie bezeichnet. Unter Desmoplasie versteht man im Speziellen die exzessive Proliferation fibrotischen Gewebes mit einer geänderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, die letztlich dem Wachstum von Tumorzellen angepasst ist. Die Tumorzellen steuern über die Aktivierung eines spezialisierten mesenchymalen Zelltyps, den sogenannten pankreatischen Sternzellen, die Stromareaktion (Erkan, Adler, et al., 2012; Erkan, Hausmann, et al., 2012; Erkan, Reiser-Erkan, et al., 2012). Verschiedene Arbeiten zeigen, dass bereits im Anfangsstadium der Tumorentstehung Leukozyten das Stroma infiltrieren, dort eine lokale Immunsuppression bewirken und somit die Stromareaktion weiter stimulieren (Beatty et al., 2011). Das Pankreaskarzinom ist durch die extensive Desmoplasie schlecht perfundiert und damit primär hypoxisch (Beger, 2013). Das dichte Tumorstroma leitet sich von dem übermäßigen Wachstum der extrazellulären Matrix ab und kann somit den Tumor in Form einer „Barriere“ vor Chemotherapeutika und dem Immunsystem „schützen“ und das Tumorwachstum dadurch verbessern (Bissell & Radisky, 2001). Die Produktion des fibroblast growth factor typ 2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF), ebenso wie der EGF Rezeptor (EGFR), transforming growth factor alpha and beta typ 1 (TGF- α , TGF- β 1), insulin-like-growth factor (IGF-1), platelet derived growth factor (PDGF) und VEGF von Tumorzellen, den Immunzellen und anderen Zellen des Tumorstromas tragen

zur Entwicklung des Tumorstromas ebenso wie dem Wachstum und dem Überleben des Tumors bei (Korc, 2007; Lohr et al., 2001; Schniewind et al., 2007). Pankreatische Sternzellen (PSC) produzieren am meisten VEGF in der Mikroumgebung des Tumors und sorgen damit für eine gute Blutversorgung des Tumors. Weitere Faktoren, die die Angiogenese fördern sind FGF-2, TGF-β und PDGF (Erkan et al., 2007; Sipos et al., 2002).

Immunsuppressive Mechanismen in der Tumormikroumgebung

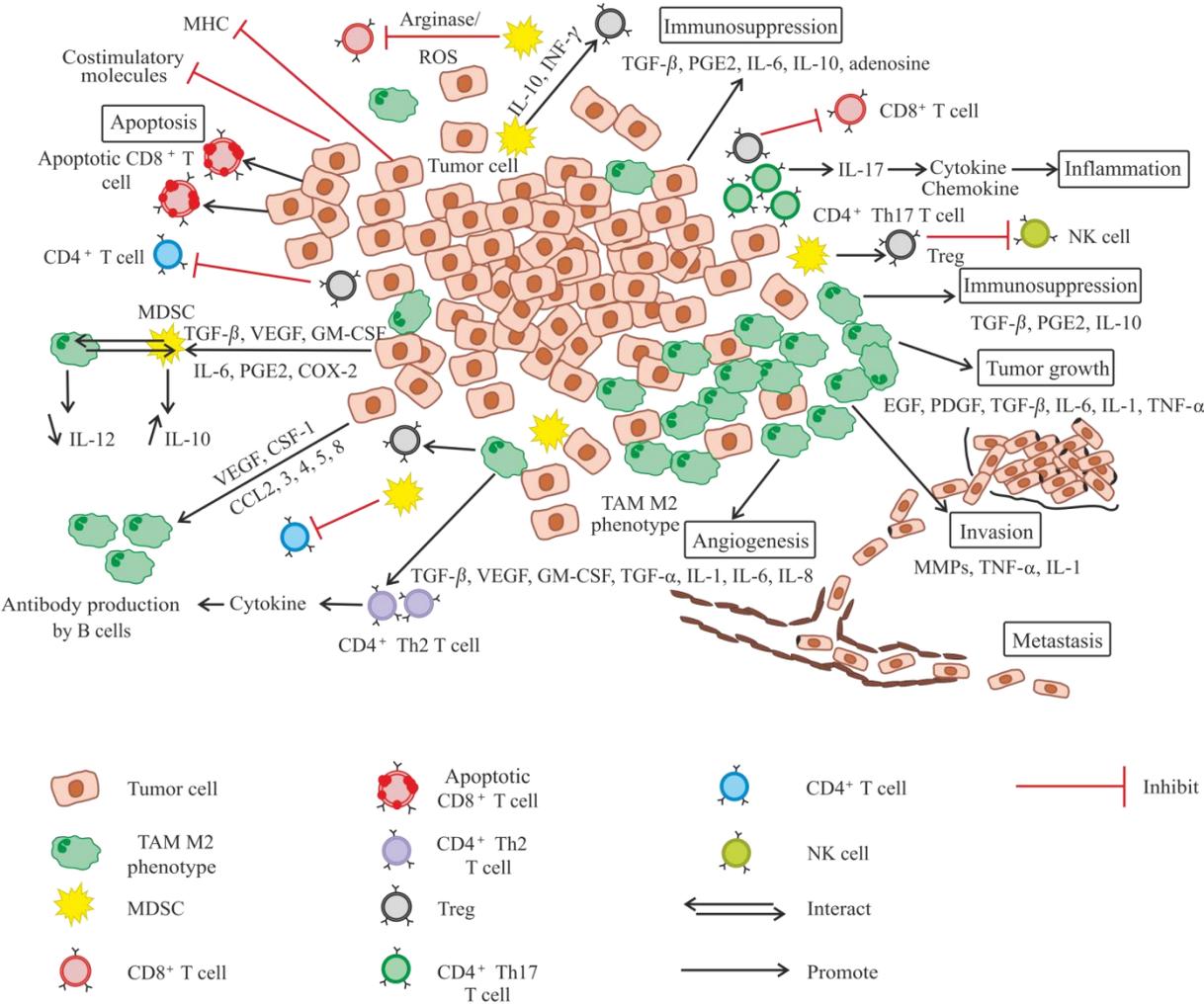


Abb. 1.2.6.1 Immunsuppressive Mechanismen in der Tumormikroumgebung
 URL: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2010/701657/fig1/> (Stand: 12.08.2016). Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

1.3 Metronomische Chemotherapie

Die Chemotherapie mit Gemcitabin und 5 FU wird als etablierter Therapiestandard in der Behandlung der Patienten mit Pankreaskarzinom betrachtet. Trotz der positiven Wirkung der Behandlung mit 5 FU/Gemcitabin auf die Überlebenszeit der Patienten, spielt die Zytotoxizität und die Resistenz der Tumorzellen gegen die Chemotherapie eine große Rolle (Hahnfeldt, Folkman, & Hlatky, 2003; Neoptolemos et al., 2010). Wie in Kapitel 1.2 ausführlich beschrieben wurde, spielt das Immunsystem eine entscheidende Rolle im Kampf gegen den Krebs. Aus diesen Gründen ist es sehr wichtig eine Therapie zu finden, die folgende Aspekte berücksichtigt:

- 1.) Zytotoxizität der Chemotherapie
- 2.) Resistenzen der Tumorzellen gegen Chemotherapie
- 3.) Erreichen einer dauerhaften, effizienten Immunantwort, Verhinderung von Immunsuppression
- 4.) Mechanismen der Tumoren durchbrechen (Angiogenese und Immunogenität des Tumors)

Wie neuste, wissenschaftliche Erkenntnisse und Studien zeigen, erweist sich die metronomische Chemotherapie als vielversprechender, erfolgreicher Therapieansatz, der all diese Aspekte berücksichtigt. Die metronomische Chemotherapie ist definiert als eine Therapie mit zytotoxischen Substanzen, die so appliziert werden, dass zu fast jedem Zeitpunkt geringste Konzentrationen der verwendeten Substanzen im Körper vorhanden sind. Die Behandlung/Therapie erfolgt regelmäßig in niedrigen/sehr niedrigen Konzentrationen und ohne längere Behandlungspausen. Basis für dieses Konzept ist die Tatsache, dass proliferierende Endothelzellen um einige Zehnerpotenzen sensibler sind als die Tumorzelle selbst. Dieser große Empfindlichkeitsunterschied erlaubt es, die Dosis der verwendeten zytotoxischen Substanzen deutlich zu senken. Das ursprüngliche Ziel der Forschung, mit Hilfe der metronomischen Chemotherapie die Angiogenese zu hemmen, wurde jedoch um weitere, neue Erkenntnisse bereichert (Sarmiento & Gasparini, 2008; Torimura et al., 2013).

1.3.1 Konventionelle Chemotherapie

Chemotherapie umfasst die Behandlung bösartiger Tumoren mit chemischen Substanzen, den sogenannten Chemotherapeutika oder Zytostatika, die in den Vermehrungszyklus der Krebszellen eingreifen. Chemotherapie wirkt systemisch und kann dadurch, im Unterschied zur Operation und Bestrahlung, potenziell verstreute Tumorzellen erreichen und zerstören. Chemotherapie kann oral oder per Injektion (intravenös/subkutan) verabreicht werden. Oft wird nicht nur ein einzelnes Mittel eingesetzt, sondern eine Kombination mehrerer Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkprinzipien.

Die verschiedenen Wirkstoffklassen greifen die Krebszellen in jeweils unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus an. Bei der Behandlung werden mehrere Substanzen miteinander kombiniert, um damit so viele Tumorzellen wie möglich in den unterschiedlichen Phasen zu erreichen. Dadurch soll der Behandlungserfolg bei gleichzeitig möglichst wenigen Nebenwirkungen optimiert werden. 5 FU und Gemcitabin gehören zu der Zytostatikagruppe der Antimetabolite. Antimetabolite ähneln körpereigenen Stoffen und werden deshalb in Stoffwechselprozesse eingebunden. Die normale Zellteilung wird dadurch unterbrochen. Eine Chemotherapie wird in Intervallen, sogenannten Zyklen durchgeführt, wobei Behandlungsphasen mit Behandlungspausen abwechselnd erfolgen. In einem Zyklus werden die Zytostatika an einem oder mehreren Tagen nacheinander verabreicht. Es schließt sich eine Behandlungspause von mehreren Tagen, Wochen oder Monaten an. In der Behandlungspause soll der Körper die Möglichkeit bekommen, angegriffenes, normales Gewebe zu regenerieren, das sich meist schneller von einer Chemotherapie erholt als Tumorgewebe. Durchgeführt werden im Schnitt vier bis sechs Zyklen. Dadurch werden auch solche Tumorzellen erfasst, die sich während vorangegangener Zyklen gerade in einer Ruhephase befanden und deshalb durch die Medikamente nicht beeinflusst werden konnten.

Die zellschädigende Wirkung der Chemotherapie betrifft nicht nur die Krebszellen, sondern auch alle anderen Zellen, die sich natürlicherweise schnell teilen, wie beispielsweise Zellen der Schleimhaut, der Haarwurzeln oder des Knochenmarks. Die Folge sind Störungen im Verdauungstrakt, Entzündungen der Mundschleimhaut, Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Durchfall und Bauchschmerzen, Veränderungen der Blutwerte mit Blutarmut (Anämie), Blutgerinnungsstörungen und einem erhöhten Infektionsrisiko (Rückgang der weißen Blutkörperchen), Haarausfall, anhaltende Erschöpfungszustände (Fatigue), Störungen des Konzentrationsvermögens und Beeinträchtigung des Gedächtnisses, Störungen des Menstruationszyklus bei Frauen, Schädigung der Keimdrüsen und Störung der Fortpflanzungsfähigkeit bei Frauen und Männern sowie eine Steigerung des Risikos für weitere Krebserkrankungen. Die Nebenwirkungen können innerhalb weniger Stunden oder Tage nach dem Behandlungsbeginn auftreten, aber auch erst nach Monaten oder sogar Jahren. Viele Nebenwirkungen können heute durch geeignete begleitende Maßnahmen (Supportive Therapie) verhindert oder zumindest gelindert werden. Zu welchen Nebenwirkungen es in welchem Umfang kommt, hängt davon ab, in welcher gesundheitlichen Verfassung die Patienten sind, **welche Zytostatika in welcher Dosierung** eingesetzt werden und wie lange die Behandlung dauert (Cooper et al., 1991; Pfreundschuh et al., 2006).

1.3.2 Gemcitabin und 5-Fluorouracil

Pharmakologisch lässt sich **5-Fluorouracil** als Antineoplastische Substanz, Antimetabolit und Pyrimidinanaloga charakterisieren. 5-Fluorouracil ist ein selbst nicht antineoplastisch wirksames synthetisches fluoriertes Pyrimidinderivat. Die Hemmung der Zellteilung erfolgt nach Metabolisierung durch die aktiven Metabolite 5-Fluorouridintriphosphat (FUTP) und 5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP). Zu den bekannten Wirkmechanismen zählt die Blockade der DNS-Synthese (Hemmung der Thymidilat-Synthetase durch FdUMP), Hemmung der RNS-Synthese (Bildung fehlerhaft strukturierter RNS durch Einbau von FUTP), DNS-Strangbrüche nach Einbau von 5-Fluorodesoxyuridintriphosphat in die DNS.

1ml Injektionslösung „5 FU medac 50mg/ml“ enthält 50mg 5-Fluorouracil, sonstige Bestandteile sind Natriumhydroxid und Wasser. 5 FU wird intravenös als Bolus oder (Dauer-)Infusion appliziert. 5-Fluorouracil verteilt sich im gesamten Körper und penetriert die Blut-Liquor-Schranke. Das Chemotherapeutikum wirkt bevorzugt auf proliferierende Zellen. Daher kommt es v.a. zu Knochenmarkdepression und Schäden der Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts. Die Dosierung, Art der Anwendung sowie die Dauer der Behandlung variiert je nach Therapieprotokoll. Beispielsweise wird im Rahmen des „Mayo-Protokolls“ an 5 aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar nach einer intravenösen Bolusinjektion von Folinsäure ($20\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche (KOF)) 5 FU in einer Dosierung von $425\text{mg}/\text{m}^2$ KOF intravenös als Bolus angewendet. Die Therapiezyklen werden nach 4 und 8 Wochen sowie anschließend alle 5 Wochen wiederholt (Rote Liste, Fachinformation URL: <http://www.fachinfo.de/> (Stand: 12.08.2016)).

Gemcitabin Kabi 38 mg/ml ist ein Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung. Nach Zubereitung mit 0,9%iger Natrium-Chlorid-Injektionslösung enthält die Lösung 38mg/ml Gemcitabin. Sonstige Bestandteile der Lösung sind Mannitol, Natriumacetat-Trihydrat, Salzsäure (zur pH-Einstellung) und Natriumhydroxid-Lösung (zur pH-Einstellung). Die empfohlene Dosis für Gemcitabin beträgt $1000\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche, über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös infundiert. Dies sollte während eines Zeitraums von sieben Wochen einmal wöchentlich wiederholt werden. Danach folgt eine Woche Pause. In den anschließenden Behandlungszyklen sollte die Infusion über einen Zeitraum von 3 Wochen einmal wöchentlich gegeben werden, gefolgt von einer Woche Pause. Eine Dosisreduktion, abhängig vom Toxizitätsgrad, kann entweder während eines laufenden Behandlungszyklus oder beim nächsten Behandlungszyklus erfolgen.

Zellmetabolismus und Wirkmechanismus von Gemcitabin:

Gemcitabin (dFdC), ein Pyrimidin-Antimetabolit, wird durch Nucleosidkinasen intrazellulär zu dem wirksamen Diphosphat-Nukleosid (dFdCDP) und Triphosphat-Nukleosid (dFdCTP) metabolisiert. Die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin beruht auf der Hemmung der DNS-Synthese durch zwei Wirkungen von dFdCDP und dFdCTP. Zum einen blockiert dFdCDP die Ribonukleotidreduktase, die die Reaktion katalysiert, welche Deoxynucleosidtriphosphate (dCTP) für die DNS-Synthese liefert. Die Hemmung dieses Enzyms durch dFdCDP bewirkt eine allgemeine Reduktion der Konzentration von Deoxynucleosiden und speziell von dCTP. Zum zweiten konkurriert dFdCTP mit dCTP um den Einbau in die DNS (Selbstpotenzierung). Außerdem kann in geringem Ausmaß ebenfalls Gemcitabin in die RNS eingebaut werden. Durch die Reduktion an intrazellulärem dCTP wird der Einbau von dFdCTP in die DNS verstärkt. Die DNS-Polymerase Epsilon ist nicht in der Lage, Gemcitabin zu entfernen und die gebildeten DNS-Stränge zu reparieren. Nachdem Gemcitabin in die DNS eingebaut wurde, erfolgt der Einbau eines weiteren Nucleotids in den DNS-Strang. Nach diesem Einbau resultiert eine vollständige Hemmung der weiteren DNS-Synthese (maskierter Kettenabbruch). Nach Einbau in die DNS scheint Gemcitabin den programmierten Zelltod zu induzieren (Rote Liste, Fachinformation URL: <http://www.fachinfo.de/> (Stand: 12.08.2016)).

1.3.3 Vorteile der metronomischen Chemotherapie

Metronomische Chemotherapien richten sich nicht nur gegen den Tumor selbst, sondern vor allem gegen die Wechselwirkung zwischen Tumor und dem umgebenden Gewebe, in dem durch entzündliche Reaktionen und Förderung der Angiogenese das Tumorstadium aufrechterhalten wird. So werden z.B. durch eine metronomische Chemotherapie Gegenspieler des Gefäßwachstumsfaktors VEGF hochreguliert und regulatorische T-Zellen, die bei Tumoren häufig stark vermehrt sind, vermindert. Das soll das gesamte Tumorsystem aus seinem Gleichgewicht bringen und nachhaltig schädigen. Während konventionelle Chemotherapie auf der maximal tolerierten Dosis mit noch erträglichen Nebenwirkungen basiert, wird die metronomische Chemotherapie über einen längeren Zeitraum mit niedrig oder sehr niedrig konzentrierter, minimal toxischer Dosis und ohne ausgedehnte Behandlungspausen durchgeführt. Dadurch werden unerwünschte **toxische Nebenwirkungen signifikant reduziert** und das Tumorstadium durch **antiangiogenetische Mechanismen** gehemmt (Andre, Padovani, & Verschuur, 2010; Hahnfeldt et al., 2003; Kamen, 2005; LennernÄS, Albertsson, Damber, & Norrby, 2004; Nowak, Lake, & Robinson, 2006).

Die Behandlung mit konventioneller Chemotherapie findet in Intervallen mit Behandlungspausen statt. Diese Vorgehensweise gibt dem Körper die Möglichkeit zur Hämatopoese und der Wiederherstellung der Leukozytenzahl, hält die Nebenwirkungen der Chemotherapie in einem erträglichen Rahmen und soll außerdem eine stark ausgeprägte Immunsuppression vermeiden. In den Behandlungspausen können sich Chemotherapie resistente Tumorzellklone entwickeln und vermehren. Obwohl zu Beginn der Therapie meist eine beeindruckende Regression oder sogar Remission verzeichnet wird, kommt es häufig zu einem Rezidiv oder einer Metastasierung des Tumors (Nars & Kaneno, 2013). Es werden viele verschiedene Mechanismen mit der Resistenzentwicklung in Verbindung gebracht. Manchmal sterben Zellen bei einer Chemotherapie nicht ab, da sie während der Therapie in einer Art „Schlafzustand“ oder „Dormanz“ (Tumorstammzellen) verharren und sich nicht geteilt haben, die Wirkstoffe nicht das gesamte Gewebe in ausreichend hoher Konzentration erreichen oder das Tumorgewebe ungewöhnlich schnell „entgiftet“ und somit das Medikament schnell aus den Zellen ausschleust. Tumorzellen können so stark verändert sein, dass sie sogar die Fähigkeit zu sterben verloren haben. Die natürliche Apoptose für überalterte oder geschädigte Zellen ist ausgefallen. Das Risiko für erneute genetische Veränderungen und der damit einhergehenden Entwicklung neuer Eigenschaften der Tumorzellen bleibt im Laufe der Krebserkrankung weiter bestehen: Je schneller ein Tumor wächst, umso mehr Teilungszyklen durchlaufen die einzelnen Tumorzellen und umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich noch weitere Fehler und Schäden ansammeln. Selbst wenn nur wenige Tumorzellen die Chemotherapie überleben, kann aus ihnen später neues Tumorgewebe entstehen (Baguley, 2002; Longley & Johnston, 2005). Die metronomische Chemotherapie kann dieser Entwicklung durch die kontinuierliche Verabreichung des Wirkstoffes entgegen wirken. Beispielsweise konnte die **Resistenz** der colorectalen Tumorzellen gegen 5-FU mit Hilfe niedrig dosiertem 5-Aza-Deoxycytidin (AZA) überwunden werden. Die Behandlung mit niedrig dosiertem AZA verhindert die Hypermethylierung der DNA, die als Ursache der Resistenz gilt, und ermöglicht so die gewünschte Sensitivität der Tumorzellen 5-FU gegenüber (Humeniuk, Mishra, Bertino, & Banerjee, 2009; Jabbour, Issa, Garcia-Manero, & Kantarjian, 2008).

Der Abbau der T-Lymphozyten ist einer der wichtigsten immunsuppressiven Effekte der konventionellen Chemotherapie. Dabei sind besonders die CD4⁺- und CD8⁺-Zellen von der zytotoxischen Wirkung der Chemotherapie betroffen, wobei die Anzahl der CD8⁺-Zellen schneller wiederhergestellt ist als die Population der CD4⁺-Zellen (Azuma et al., 1998; Mackall et al., 1997). Zusätzlich können Fehlfunktionen der NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen auftreten, die ebenfalls zur Verschlechterung der Anti-Tumor-Immunantwort beitragen (Zocchi & Poggi, 2004). Darüber hinaus reagieren DZ sehr empfindlich auf die therapeutische/hochdosierte Chemotherapie. Dabei wirkt sich

die Medikation störend auf die Antigen Präsentation aus, die Zellmobilisierung wird herabgesetzt und die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 wird herunter reguliert (Ferrari et al., 2003; Jiga, Bauer, Chuang, Opelz, & Terness, 2004; Nakashima et al., 2005). Die genannten Effekte auf die immunkompetenten Zellen, können dem Tumor ermöglichen der Immunüberwachung zu entkommen (Tumor Escape) (Nowak et al., 2006; Schlom, Arlen, & Gulley, 2007). Der Unterschied zwischen einer „simplen Unterdosierung“ der konventionellen Chemotherapie und der metronomischen Chemotherapie liegt in der regelmäßigen, anhaltenden Verabreichung der niedrig dosierten Chemotherapie. Hierbei wird der Serumspiegel der Antineoplastischen Aktivität aufrechterhalten um myelosuppressive Effekte sowie weitere Nebenwirkungen zu vermeiden (Bocci, Nicolaou, & Kerbel, 2002).

Des Weiteren kann bei der metronomischen Chemotherapie eine selektive **Eliminierung immunsuppressiver Zellen** und eine insgesamt bessere Anti-Tumor-Immunantwort festgestellt werden. Im Gegensatz dazu werden der konventionellen Chemotherapie, auf Grund der maximal tolerierten Dosis und der damit einher gehenden Zytotoxizität gegenüber hämatopoetischer Zellen, immunsuppressive Effekte zugeschrieben (Hao, Yi, Ruan, Zhao, & Nan, 2014).

1.3.4 Effekte der metronomischen Chemotherapie auf die Immunzellen

1.3.4.1 Metronomische Chemotherapie reduziert die Anzahl der Treg-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind essentiell in der Vermeidung von Autoimmunerkrankungen und der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Als immunsuppressive Zellpopulation spielen sie eine äußerst wichtige Rolle in physiologischen und pathologischen Vorgängen (Josefowicz, Lu, & Rudensky, 2012). Um dem Immunsystem zu entkommen, locken Tumorzellen Treg-Zellen in das Tumorgewebe und supprimieren so die Abwehr. Tumorzellen, Tumor-assoziierte Makrophagen und DZ produzieren beispielsweise die Zytokine CCL22 und CCL17, mit denen sie die Treg-Zellen über den CCR4 Rezeptor in die Tumormikroumgebung locken (Bayry et al., 2008; Wei, Kryczek, & Zou, 2006). Viele Tumorpatienten weisen eine erhöhte Anzahl der Treg-Zellen im Blut und dem Tumorgewebe auf. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der erhöhten Anzahl der Treg-Zellen und der schlechten Prognose der Patienten, die am Pankreaskarzinom erkrankt sind (Shevchenko et al., 2013). Daher stellt die Reduzierung bzw. die Elimination der Treg-Zellen v.a. in der Tumormikroumgebung ein wichtiges Ziel der erfolgreichen Tumorthherapie dar. Etliche Studien zeigen, dass die metronomische Chemotherapie die Anzahl der Treg-Zellen reduziert oder ihre Funktion stört. Die metronomische Verabreichung von Cyclophosphamid (CTX), Paclitaxel, Gemcitabin und Temozolomid setzt gezielt die

Anzahl der Treg-Zellen in Tumorpatienten und Tumor-tragenden Tieren herab (Burton, Mitchell, Thamm, Dow, & Biller, 2011; Cardillo et al., 2013; Chen & Emens, 2013). Während die Anzahl der Treg-Zellen verringert wird, werden gleichzeitig die Effektor-T-Zellen aktiviert und die Expression von IL-2 erhöht. Klinisch konnte die Wirksamkeit der metronomischen „low-dose“ Chemotherapie mit CTX bei Patienten mit metastasiertem Brust-, Ovar- und Prostatakrebs nachgewiesen werden. Diese Wirkung kann den immunregulatorischen Eigenschaften der metronomischen Chemotherapie zugeschrieben werden (Facciabene, Motz, & Coukos, 2012; Hao et al., 2014; Kodumudi et al., 2010). Patienten mit Tumoren im Endstadium, die bereits mehrfach therapiert wurden, zeigten nach regelmäßiger Verabreichung oraler metronomischer Chemotherapie mit CTX eine signifikant reduzierte Anzahl der Treg-Zellen. Die Anzahl und Funktion der anderen Lymphozyten Subpopulationen änderte sich dabei nicht, im Gegenteil, es wurden durch die Suppression der Treg-Zellen die Funktion der T- und NK-Zellen grundlegend verbessert (Hao et al., 2014; J. Zhao et al., 2010).

Mehrere Studien von tumortragenden Mäusen zeigten im Rahmen der metronomischen Behandlung mit Gemcitabin, Paclitaxel und Temozolomid eine verringerte Lebensfähigkeit der Treg-Zellen. Zusätzlich war die Produktion der immunsuppressiven Zytokine herabgesetzt (Hao et al., 2014). Eine weitere Studie belegt, dass „low dose“ Paclitaxel die Expression von regulatorischen Apoptose Proteinen beeinträchtigt, um somit die Bcl-2/Bax-Apoptose der Treg-Zellen auszulösen, die Treg-Zellen in ihrer Funktion zu hemmen und die Antigen spezifische CD8⁺-T-Zell Proliferation voranzutreiben (Hao et al., 2014; Noronha et al., 2013; A. Sevko, Michels, et al., 2013).

1.3.4.2 Metronomische Chemotherapie hemmt die MDSC in ihrer Funktion und reduziert die Anzahl der MDSC

Verantwortlich für die Tumor-induzierte Immunsuppression sind hauptsächlich zwei immunsuppressive Zelltypen: Treg und MDSC. MDSC besitzen als unreife, myeloide Zellen die Fähigkeit, die T-Zell Aktivierung in vielen Tumoren zu unterdrücken (Sheng Sow & Mattarollo, 2013; Talmadge & Gabrilovich, 2013). MDSC reichern sich im Blut, den Lymphknoten, dem Knochenmark und im Tumor an und hemmen die angeborene ebenso wie die adaptive, spezifische Immunantwort. Zusätzlich sind MDSC in der Lage, die CD8⁺-T-Zell Aktivierung zu verhindern. Hierfür produzieren sie Stickstoffmonoxid (NO) und radikale Sauerstoffverbindungen (Alizadeh et al., 2014; Annels et al., 2014; Sawant et al., 2013). Die metronomische Chemotherapie mit Paclitaxel reduziert beispielsweise signifikant die Akkumulation und immunsuppressiven Aktivitäten der Tumor-infiltrierenden MDSC. Dabei wurden keine bedeutenden Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen festgestellt.

Die beobachteten Effekte wurden mit der Hemmung der p38 MAPK Aktivität, TNF- α , der NO-Produktion und der S100A9 Expression der MDSC in Verbindung gebracht. „Low dose“ 5 FU zeigte in einem adäquaten Mausmodell eine Reduktion und gezielte Hemmung der MDSC in den Milzen der Tiere. B-Zellen, DZ, NK-Zellen und T-Zellen wiesen keine Veränderungen auf (J. Vincent et al., 2010). Die Eliminierung der MDSC mit 5 FU vollzog sich im Rahmen einer verstärkten Anti-Tumor-Antwort, die sich in Form einer Erhöhung der Produktion von IFN- γ durch Tumor-spezifische CD8⁺-T-Zellen manifestierte. Darüber hinaus konnte unter der Behandlung mit metronomisch verabreichtem Gemcitabin eine selektive Hemmung der Tumor-assoziierten MDSC nachgewiesen werden. Besonders niedrig war die Anzahl der MDSC bei Mäusen, die an Brustkrebs erkrankt waren. Interessanterweise zeigt 5 FU im Vergleich mit Gemcitabin einen stärkeren Effekt in der Hemmung der MDSC und dem gezielten, induzierten, apoptotischen Zelltod in vitro und in vivo (Hao et al., 2014).

1.3.4.3 Metronomische Chemotherapie steigert die Funktion der Dendritischen Zellen

DZ sind die wirksamsten Antigen-präsentierenden Zellen der ersten Immunantwort. Vielen vorklinischen und klinischen Studien zu Folge induziert die DZ-basierte Immuntherapie eine starke Anti-Tumor-Immunantwort (Cerullo et al., 2011; Zitvogel, Apetoh, Ghiringhelli, & Kroemer, 2008). Die „low dose“ Chemotherapie mit CTX, Doxorubicin, Etoposide, Methotrexate, Paclitaxel und Vinblastine stimuliert die Reifung der DZ und verbessert ihre Phagozytosefähigkeit (Hao et al., 2014; Sistigu et al., 2011). In diesem Zusammenhang wurde eine Hochregulation der Expression der Komponenten für die Antigen Präsentation und der Expression der co-stimulierenden Moleküle sowie eine erhöhte IL-12p70 Expression festgestellt (Ramon Kaneno et al., 2011). Darüber hinaus haben Untersuchungen von Shurin M.R. et al. gezeigt, dass die metronomische Chemotherapie insgesamt die Funktion der DZ verbessert. Gründe hierfür sind ebenso die Hochregulierung der Expression von Molekülen zur Antigen Präsentation, von MHC-Klasse-II und der co-stimulierenden Moleküle (CD40, B7-1, B7-2) (Hao et al., 2014; M. R. Shurin, 2013). Zudem induziert metronomische Chemotherapie keine Apoptose der DZ, sondern aktiviert die Rho GTPase der DZ, die eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zell-Zell-Interaktion, der Zellmotilität und Endozytose spielt. Zusammenfassend lässt sich die metronomische Chemotherapie als Chemomodulation der DZ oder direkten Stimulator der DZ mit großem, therapeutischen Potential beschreiben (Hao et al., 2014).

1.3.5 Metronomische Chemotherapie steigert die Immunogenität des Tumors

Chemotherapie tötet Tumorzellen über den „nicht immunogenen“ Weg der Apoptose. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass die metronomische Chemotherapie nicht nur zur Ausbildung immunogener oder immunmodulatorischer Proteine auf der Oberfläche der apoptotischen Tumorzellen führt, sondern die apoptotischen Tumorzellen veranlasst, immunreaktive Substanzen freizusetzen, die wiederum die Anti-Tumor-Immunantwort anregen (Kang et al., 2013; Menard, Martin, Apetoh, Bouyer, & Ghiringhelli, 2008; Walter, Biller, Lana, Bachand, & Dow, 2006). Beispielsweise fördert die metronomische Chemotherapie die Expression der MHC-Klasse-I Moleküle und des Liganden für die Natürliche Killer Gruppe 2D (NKG2D), stimuliert die Bildung von Calreticulin (CRT) und dem Hitzeschockprotein, begünstigt die Freisetzung von endogenen Gefahrensignalen, des Nuclear High Mobility Group Protein Box 1 (HMGB1) und ATP (Hao et al., 2014; Michaud et al., 2011; Zitvogel et al., 2008; Zitvogel et al., 2010).

1.3.5.1 Metronomische Chemotherapie erhöht die Expression der Tumor-assoziierten Antigene und der Antigen präsentierenden Moleküle

Damit das Immunsystem den Tumor erfolgreich bekämpfen kann, muss dieser anhand seiner Antigene vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden. Meistens sind die Tumoren jedoch kaum oder gar nicht immunogen und damit schwer als „fremd“ zu identifizieren. Neuste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die metronomische Chemotherapie zur Expression neuartiger Antigene oder Veränderung bereits bestehender Antigene führt. Decitabine, beispielsweise, reguliert die Antigene der Hodentumoren, ebenso wie die Expression von MHC I auf apoptotischen Zellen nach oben und trägt damit zur Antigen spezifischen Erkennung und Tötung durch die CD8⁺-T-Zellen bei. 5 FU führt bei Tumorzellen von Brust- und Darmkrebs zur verstärkten Expression des Carcinoembryonalen Antigens (CEA). In vorklinischen und klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass 5 FU, Doxorubicin, Gemcitabin und Paclitaxel die Apoptose der Tumorzellen induziert. Die Antigene sind somit besser zugänglich, was die Immunogenität der Tumorzellen deutlich steigert. In Folge dessen kommt es zur Hochregulierung der CD8⁺-T-Zell Funktion (Hao et al., 2014; Ramon Kaneno et al., 2011; Rico, Perroud, Mainetti, Rozados, & Scharovsky, 2014).

1.3.5.2 Metronomische Chemotherapie induziert die Exposition von Calreticulin

Calreticulin (CRT) ist ein Protein, das Teil eines Proteinkomplexes im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) der Eukaryoten ist. Zu den Aufgaben zählen u.a. die Qualitätskontrolle der korrekten Glykoprotein-Faltung und die Sicherstellung der Kalzium-Homöostase. Außerdem hat das Protein zahlreiche Funktionen außerhalb des ER, im Zytoplasma, der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix und beeinflusst dabei die Zellproliferation, Apoptose, Phagozytose und die Immunreaktion (Ni Fhlathartaigh et al., 2013). CRT kann im pre-apoptotischen Stadium vom Lumen des ER (endo-CRT) zur Zelloberfläche wechseln (ecto-CRT). Ecto-CRT hat eine bedeutende Funktion bei der Erkennung der apoptotischen Tumorzellen durch die DZ. Bei der metronomischen Chemotherapie mit beispielsweise Doxorubicin, CTX, Temozolomid und Oxaliplatin wird die Apoptose der Tumorzellen ausgelöst, an der Zelloberfläche ecto-CRT exprimiert und HMGB1 freigesetzt. Diese Beobachtungen werden als stimulierendes Signal für das angeborene Immunsystem neben der Reifung und Expansion der konventionellen CD8 α^+ DZ betrachtet. Werden Tumorzellen mit „low dose“ Doxorubicin behandelt, erfolgt eine höchst effiziente, spezifische DZ- oder Anti-Tumor-T-Zell-Antwort (Hao et al., 2014; Salem, El-Naggar, & Cole, 2010).

1.3.5.3 Metronomische Chemotherapie stimuliert die Freisetzung von endogenen Gefahrensignalen

Aktuellen Studien zufolge löst die Behandlung mit metronomischer Chemotherapie die Freisetzung von endogenen Gefahrenstoffen aus. Zu den freigesetzten Stoffen gehören apoptotische Tumorzellen, Entzündungsfaktoren, ATP und High-Mobility-Group-Proteine. Diese Signale erzeugen eine kaskadenartige Anti-Tumor-Immunantwort, die sich durch die Sekretion von IL-1 β und der Aktivierung der Toll-like Rezeptoren 4 (TLR4) der infiltrierenden DZ auszeichnet. Die endogenen Gefahrensignale fördern die Reifung der DZ und verbessern ihre Fähigkeit Tumorantigene zu präsentieren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass „low dose“ Doxorubicin einen immunogenen Zelltod auslöst. Durch die Freisetzung von ATP aus den apoptotischen Tumorzellen, werden die DZ aktiviert und die Anti-Tumor-Antwort ermöglicht (Hao et al., 2014; Wennerberg et al., 2013).

1.3.5.4 Metronomische Chemotherapie fördert die Bildung der Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine sind Proteine, die an der Faltung, Reifung und Erhaltung der Sekundärstruktur anderer Proteine beteiligt sind. Sie werden in erhöhtem Maße unter Extrembedingungen gebildet (Javid, MacAry, & Lehner, 2007). Neuste Erkenntnisse zeigen, dass Tumoren eine Überexpression der

Hitzeschockproteine (HSP) aufweisen. Die intrazelluläre Überexpression des HSP kann die Apoptose hemmen und zytoprotektiv wirken, die membrangebundene Expression des HSP wirkt immunstimulierend. Dabei bildet das HSP gemeinsam mit den Tumor-Antigen-Peptiden einen Peptid-HSP-Komplex. In vivo Experimente mit tumortragenden Mäusen haben bewiesen, dass die Peptid-HSP-Komplexe mehr Potential aufweisen, um ein effektives Cross-Priming mit den Tumorantigenen zu ermöglichen. Dies fördert die Aufnahme der Tumorzellen und damit die Fähigkeit der DZ, Antigene zu präsentieren. Darüber hinaus konnte man auf der Oberfläche von Tumorzellen des Magens nach Behandlung mit „low dose“ Anthrazykline die Expression von HSP70 nachweisen (Hao et al., 2014; McConnell & McAlpine, 2013; McNulty et al., 2013; M. E. Murphy, 2013).

1.3.5.5 Metronomische Chemotherapie induziert die Expression des Liganden für NKG2D

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung und Elimination von Tumorzellen. Die NKG2D Liganden sind normalerweise nur auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden. Wissenschaftliche Untersuchungen belegen, dass die NKG2D Rezeptoren von großer Bedeutung in der Immunüberwachung und der Aktivierung des Immunsystems sind. Sobald die Liganden erkannt werden, regt NKG2D die Aktivierung der Lymphozyten an und unterstützt das Immunsystem bei der Eliminierung der Zellen, die diesen Liganden exprimieren. Die Zytokine IL-2, IL-12, IL-15 und IFN- α können die Rezeptoren für NKG2D hochregulieren, ein Prozess der zur Verstärkung der NKG2D-vermittelten Anti-Tumor-Antwort führt. Eine gesteigerte Sekretion der immunstimulierenden Zytokine konnte unter der Behandlung mit „low dose“ CTX festgestellt werden. Dementsprechend unterstützt und stärkt die Expression der NKG2D-Rezeptoren auf den NK-Zellen das Immunsystem wesentlich im Kampf gegen den Tumor. An Mäusen, die am Melanom erkrankt waren, konnte nachgewiesen werden, dass „low dose“ Decarbazin die Expression der NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen auslöst. Dies führt zur Aktivierung der zytotoxischen Funktion der NK-Zellen und der Sekretion von IFN- γ . Die Behandlung mit „low dose“ CTX, Doxorubicin und Cisplatin erzeugte dieselbe Wirkung. Sie führte neben der Aktivierung der NK-Zellen zur Anregung der NKT-Zellen und den T-Zellkomponenten des angeborenen Immunsystems. Infolgedessen wurde die Th1-Immunantwort verstärkt (El-Gazzar, Groh, & Spies, 2013; Hao et al., 2014; Hayakawa, 2012; Hervieu et al., 2013; Nausch & Cerwenka, 2008).

1.3.6 Metronomische Chemotherapie hemmt die Angiogenese

Tumoren benötigen um wachsen zu können eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dieser Bedarf kann insbesondere bei schnell wachsenden und zellreichen Tumoren nicht mehr durch Diffusion aus dem umgebenden Gewebe erfolgen. Daher induzieren Tumoren eine Blutgefäßneubildung (Angiogenese), durch die sie ihren Versorgungsbedarf decken. Für bösartige Tumoren ist sie ab einer kritischen Größe überlebenswichtig, denn ohne neue Gefäße wäre weder ihre Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff noch ein Abtransport der Stoffwechselprodukte gesichert. VEGF gilt als das wichtigste Molekül, das bei menschlichen Tumoren für die Angiogenese verantwortlich ist. Forscher haben bewiesen, dass niedrig dosierte Chemotherapeutika wie 5 FU, Capecitabin oder Cyclophosphamid einen Gegenspieler des Gefäßwachstumsfaktors VEGF hochregulieren. Thrombospondin-1 hemmt dabei die Angiogenese zur Tumorversorgung (Bocci, Francia, Man, Lawler, & Kerbel, 2003; Hamano et al., 2004; Shi et al., 2014). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass „ultra low“ Konzentrationen von Paclitaxel die Proliferation von humanen Endothelzellen selektiv hemmt. Die Endothelzellen von Mäusen wurden nur bei höheren Konzentrationen von Paclitaxel gehemmt und zeigten bei der „ultra low“ Konzentration keine Sensitivität (J. Wang, Lou, Lesniewski, & Henkin, 2003). Präklinische in vivo Studien bestätigen einen synergistischen Anti-Tumor-Effekt in der Kombination aus antiangiogenen Medikamenten und der metronomischen Chemotherapie (Klement et al., 2000).

1.3.7 Immunmodulatorische Effekte der sehr niedrig dosierten metronomischen Chemotherapie (Ultra low dose)

In vitro Studien zeigen, dass niedrige, nichtzytotoxische Konzentrationen der Chemotherapeutika Doxorubicin (DOX), Methotrexat (MTX), Mitomycin C und Paclitaxel (PTX) die Fähigkeit von DZ, Antigen spezifischen T-Zellen Antigene zu präsentieren, steigert (Nars & Kaneno, 2013). Diese Medikamente regulieren signifikant die Expression von CD80, CD86, CD40 und den MHC-Klasse-II Molekülen der DZ nach oben. IL-12 scheint in diesem Zusammenhang auch eine Rolle als Signal 3 Molekül zu spielen. Dabei erhöhen DOX, MTX, PTX und Vinblastin die spontane IL-12 Expression der behandelten DZ (G. V. Shurin, Tourkova, Kaneno, & Shurin, 2009). Die Expression von CD40 ist essentiell für die Interaktion der DZ mit den T-Lymphozyten ebenso wie für die Entwicklung einer effizienten Th1 Antwort (Tong et al., 2001). Da die Expression von CD40 und die CD40 vermittelten Funktionen der DZ während der Tumorentwicklung unterdrückt werden, stellt die Hochregulierung durch die sehr niedrig dosierte Chemotherapie eine gute Möglichkeit dar, um die Entwicklung der Anti-Tumor-Antwort zu unterstützen (Michael R. Shurin, Yurkovetsky, Tourkova, Balkir, & Shurin,

2002). Darüber hinaus schützt die CD40-Ligation die DZ von Mäusen, gleichermaßen wie die von Menschen, vor der Tumor-induzierten Apoptose durch die Expression eines anti-apoptotischen Proteins der Bcl-2-Familie (Pinzon-Charry, Schmidt, & Lopez, 2006; Pirtskhalaishvili et al., 2000).

Die Entwicklung eines spontanen Melanoms in ret-transgenen Mäusen konnte ebenfalls durch die Behandlung mit sehr niedrig dosiertem PTX verhindert werden. Dieser Effekt der „ULD Behandlung“ wurde im Zusammenhang mit einer niedrigen Infiltration der MDSC in die Tumormikroumgebung beobachtet (Michels et al., 2012; Alexandra Sevko et al., 2012). Auch die Untersuchung der Auswirkung der sehr niedrig dosierten (ULD) Chemotherapie mit PTX auf Tumorzellen des Colons, liefert interessante Ergebnisse. Die Analyse der DNA zeigt, dass die Behandlung der Tumorzellen in einigen Genen transkriptionale Wechsel induziert, die mit der Tumorummunogenität und dem Zellwachstum assoziiert sind. Die „ULD Behandlung“ löst eine Hochregulation der Expression von Proteasomen, Peptid-Transporter TAP (transporter associated with antigen presentation), Tapasin und Calnexin aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tumorummunogenität durch den transkriptionellen Wechsel beeinflusst werden kann, was durch die gesteigerte Fähigkeit der behandelten Tumorzellen, die Bildung von tumor-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten zu induzieren, untermauert wird. Tumorzellen, die einer „ULD-Behandlung“ mit PTX unterzogen wurden, zeigen im Vergleich mit nicht behandelten Zellen, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischer T-Lymphozyten Aktivität (Ramon Kaneno et al., 2011).

Zusammenfassend können auch die DZ als Hauptziel der Chemoimmunmodulation im Rahmen der „ultra low dose-Behandlung“ betrachtet werden.

1.3.8 Positive Aspekte in der Durchführung der metronomischen Chemotherapie

Die Ingredienzien einer attraktiven Tumorthherapie für Tumorpatienten mit dem Potenzial einer guten und langen Tumorkontrolle sind in einem metronomischen Konzept vorhanden. Die Therapie kann täglich oral erfolgen, die Dosierung ist niedrig, die fixe Dosis bringt den Vorteil einer alleinigen Rezeptausstellung mit sich und es wird kein intravenöser Zugang benötigt. Die Überwachung der „gefährlichen“ Infusionen fällt weg, ebenso wie das aufwendige Toxizitätsmonitoring. Ein einfaches Dosierungsschema und ein insgesamt geringer medizinischer Überwachungsaufwand sind ein weiterer Vorzug. Außerdem stellt die metronomische Chemotherapie eine kostengünstige Therapie dar (Dellapasqua et al., 2008).

Metronomische Chemotherapie

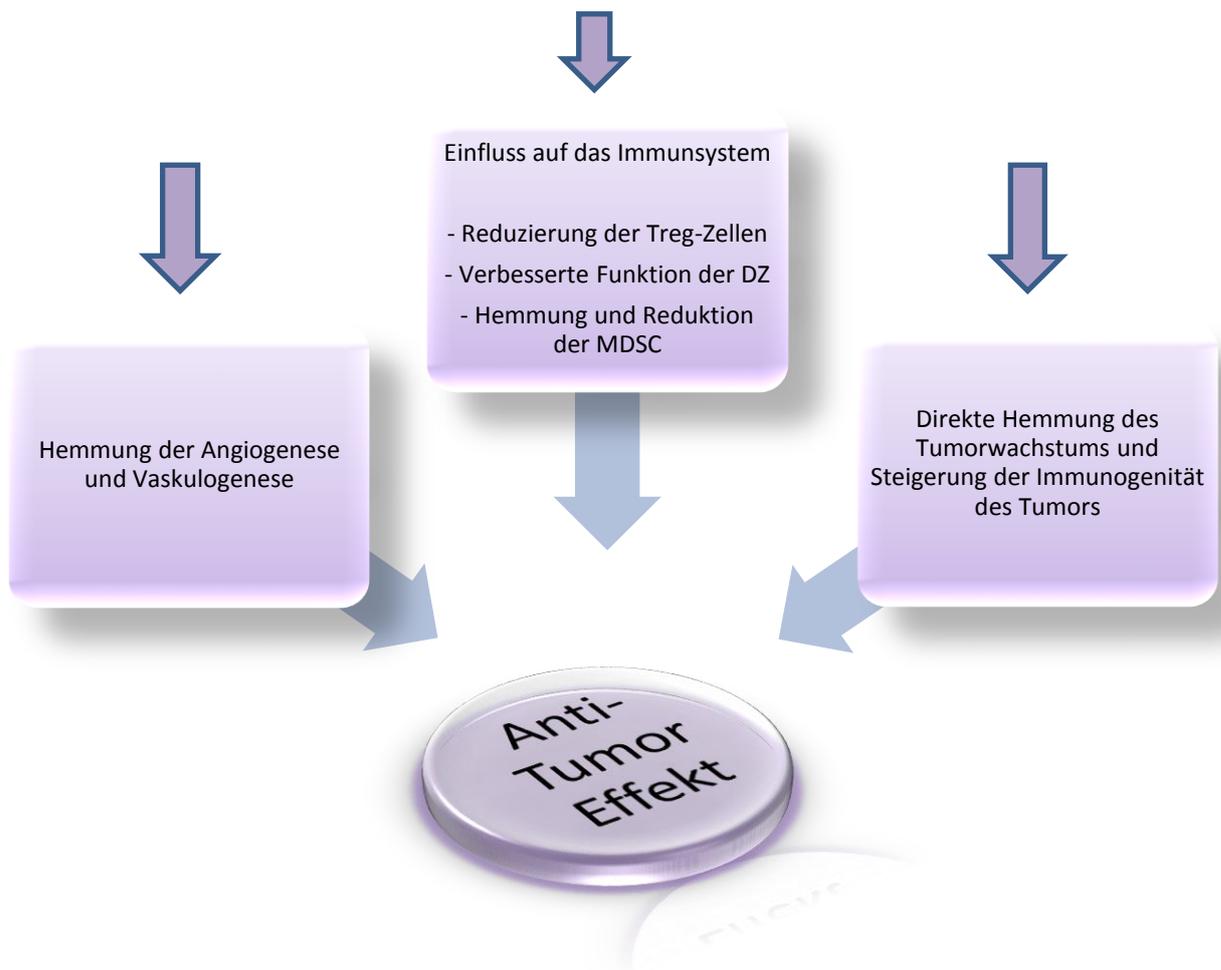


Abb. 1.3.8.1 Übersicht zu den Effekten der metronomischen Chemotherapie

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Zusammenfassung der wichtigsten Fakten:

- 1) Das *duktale Pankreasadenokarzinom* gehört zu den aggressivsten Tumorerkrankungen des Menschen mit einer schlechten Prognose und einer geringen Überlebensrate (Warshaw & Fernandez-del Castillo, 1992)
- 2) Die Chemotherapeutika *5 FU* und *Gemcitabin* sind Therapiestandard in der Behandlung des Pankreaskarzinoms (Neoptolemos et al., 2010)
- 3) *Resistenzen und zytotoxische Nebenwirkungen* der Chemotherapeutika (Nars & Kaneno, 2013)
- 4) Entscheidende Rolle des *Immunsystems* im Kampf gegen den Tumor (Sideras et al., 2014)
- 5) Positive Auswirkung der *metronomischen Chemotherapie* auf das Immunsystem, Minimierung der zytotoxischen Nebenwirkungen und Reduzierung von Resistenzen der Tumorzellen gegen Chemotherapeutika (Hao et al., 2014)

In Anbetracht dieser Tatsachen ist die Notwendigkeit der Entwicklung neuartiger, therapeutischer Ansätze und verbesserter Behandlungsstrategien im Kampf gegen den Tumor essentiell. Aus diesem Grund verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel **die immunmodulatorische Wirkung von 5 FU und Gemcitabin im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms** zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Untersuchung der immunologischen Parameter in Bezug auf die **konventionell verabreichte Chemotherapie im Vergleich zu der niedrig und sehr niedrig dosierten Chemotherapie (metronomische Chemotherapie)**. Zur Kontrolle wurden jeweils nicht behandelte Tiere untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- 1.) Untersuchung des Einflusses der konventionellen und metronomischen Chemotherapie auf das Tumorwachstum und die Metastasierung
- 2.) Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen und den Tumoren von tumortragenden Mäusen, nach Verabreichung konventioneller und metronomischer Chemotherapie (in vivo)
- 3.) Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie (in vitro)
- 4.) Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie (in vitro)
- 5.) Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie von Tumoren der Mäuse im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T- und NK-Zellen (in vitro)
- 6.) Bestimmung der Zytokine des Blutserums der tumortragenden Mäuse und der Mediumüberstände von den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie, in vitro (Luminex)
- 7.) Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie, in vitro (ELISA)
- 8.) Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest der Milzzellen gesunder Mäuse nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie, in vitro (MTT)

Die Angabe „metronomische Chemotherapie“ bezieht sich auf die Behandlung/Therapie mit 5 FU und Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen. Die Konzentrationen der Chemotherapeutika in vitro/ in vivo sind im Kapitel „Material und Methoden“ in der Tabelle 2.1.14.1 aufgelistet.

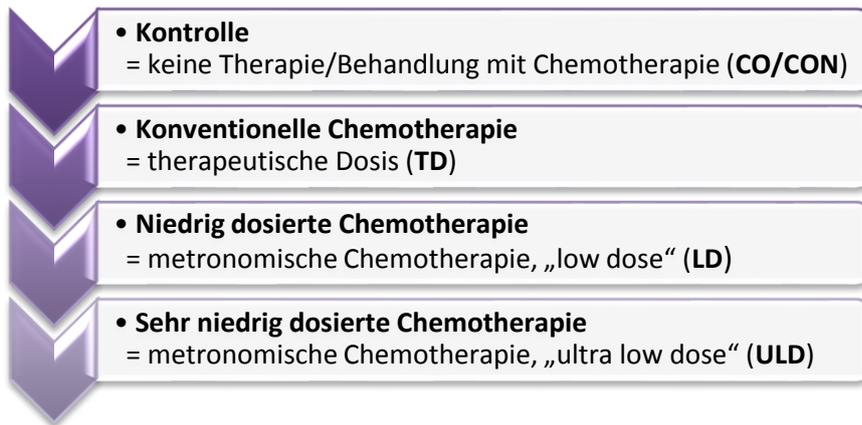


Abb. 1.4.1 Übersicht Behandlungs-/Therapiegruppen

2 Material und Methoden

2.1 Material und Mäuse

2.1.1 Mäuse

Mausstamm	Bezugsquelle
C57BL/6	Charles River, Sulzbach

Tab. 2.1.1.1 Mäuse

2.1.2 Pankreaskarzinomzellen

Linie	
Panc02	vgl. (Corbett et al., 1984)

Tab. 2.1.2.1 Pankreaskarzinomzellen

2.1.3 Anästhetika

Anästhetika	Hersteller
Isofluran Baxter (Inhalationsnarkose)	Baxter GmbH
Ketanest® S 25mg/ml Esketaminhydrochlorid (Injektionslösung)	Pfizer
Rompun® 2% Xylazinhydrochlorid (Injektionslösung)	Bayer

Tab. 2.1.3.1 Anästhetika

2.1.4 Nichtsteroidale Antiphlogistika

NSAID	Hersteller
Rimadyl® ad us.vet., Injektionslösung (Carprofen)	Pfizer AG

Tab. 2.1.4.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika

2.1.5 Chemotherapeutika

Gemcitabin Kabi 38mg/ml Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung (Gemcitabin) 2000mg	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
5-Fluorouracil (5 FU) 50mg/ml 5000mg	medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH

Tab. 2.1.5.1 Chemotherapeutika

2.1.6 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer (FACS) Canto II	BD (Becton, Dickinson and Company)
Lichtmikroskop Axiostar ^{plus}	Zeiss
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Pipetten Pipetman	Gilson
Pipetus [®] -akku	Hirschmann Laborgeräte
Sterilbank Hera ^{safe}	Heraeus
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zählkammer Neubauer Improved	neoLab Laborbedarf GmbH
Inkubator Hera <i>Cell</i>	Heraeus
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Waage EW600-2M	Kern & Sohn GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Multipipette [®] plus	Eppendorf
Pipette Proline	Biohit GmbH
GASTIGHT Syringe 25µl	Hamilton Company
Digital Timer	neoLab
Bio Vortex V1	Lab-4 you
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Opsys MR Dynex Technologies (ELISA)	Dynex Technologies, Inc. USA
Wärmeschrank	Thermo Scientific
Multipipette	Eppendorf
Wundklammergerät Reflex 7mm	fine Science
0,100mm Tiefe/Depth Profondeur, 0,0025mm ²	Neubauer
Luminex [®] 100/200 System	Biorad
MACS-Magnete	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Wasserbad	M & S Laborgeräte GmbH Wiesloch

Tab. 2.1.6.1 Laborgeräte

2.1.7 Antikörper für die Durchflusszytometrie

2.1.7.1 Antikörper

Antigen/Spezifität	Konjugat	Isotyp	Klon	Menge pro 2x10 ⁶ Zellen/50µl	Hersteller
Foxp3 (Anti Maus/Ratte)	FITC	Rat IgG2a, kappa	FJK-16s	1µl	eBioscience
CD115 (c-fms) (Anti Maus)	APC	Rat IgG2a _k	AFS98	1µl	eBioscience
CD45 (Ratte Anti Maus)	V500	Rat (LOU) IgG2b _k	30-F11	2µl	BD Horizon™
Fixable Viability Dye eFluor®450	V450	-	-	1µl	eBioscience
CD107a (Ratte Anti Maus)	APC	Rat (SD) IgG2a _k	1D4B	2µl	BD Pharmingen™
CD3e (Hamster Anti Maus)	APC-Cy™7	Armenian Hamster IgG1 _k	145-2C11	1,5µl	BD Pharmingen™
CD11b (Ratte Anti Maus)	PerCP- Cy™5.5	QC Testing:Mouse	M1/70	1,5µl	BD Pharmingen™
CD19 (Ratte Anti Maus)	V450	Rat (LEW) IgG2a _k	1D3	2µl	BD Horizon™
CD69 (Hamster Anti Maus)	PE	Armenian Hamster IgG1, λ3	H1.2F3	3µl	BD Pharmingen™
CD86 (Ratte Anti Maus)	PE-Cy™7	Rat (LOU) IgG2a _k	GL1	1µl	BD Pharmingen™
CD4 (Ratte Anti Maus)	V500	Rat (DA) IgG2a _k	RM4-5	1µl	BD Horizon™
CD45R (Ratte Anti Maus)	Pacific Blue™	Rat IgG2a _k	RA3-6B2	1µl	BD Pharmingen™
CD4 (Ratte Anti Maus)	V450	Rat (DA) IgG2a _k	RM4-5	1µl	BD Horizon™
CD62L (Ratte Anti Maus)	APC	Rat (F344) IgG2a _k	MEL-14	1µ	BD Pharmingen™
CD11c (Hamster Anti Maus)	APC	Armenian Hamster IgG1, λ2	HL3	1µl	BD Pharmingen™
CD25 (Ratte Anti Maus)	APC	Rat (LEW) IgG2b _k	3C7	1,5µl	BD Pharmingen™
CD8a (Ratte Anti Maus)	PerCP- Cy™5.5	Rat (LOU) IgG2a _k	53-6.7	1µl	BD Pharmingen™

CD69 (Hamster Anti Ratte)	PerCp-Cy TM 5.5	Armenian Hamster IgG1, λ3	H1.2F3	1,5µl	BD Pharmingen TM
CD44 (Ratte Anti Maus)	FITC	Rat IgG2b _k	IM7	0,5µl	BD Pharmingen TM
NK-1.1 (Maus Anti Maus)	PE	Mouse (C3H x BALB/c) IgG2a _k	PK136	1µl	BD Pharmingen TM
Gr-1/Ly-6G und Ly-6C (Ratte Anti Maus)	APC-Cy TM 7	Rat IgG2b _k	RB6-8C5	0,25µl	BD Pharmingen TM
F4/80 (Anti Maus)	FITC	Rat IgG2a, kappa	BM8	1µl	eBioscience
Ly-6G (Ratte Anti Maus)	PE	Rat (LEW) IgG2a _k	1A8	0,3µl	BD Pharmingen TM
Ly-6C (Ratte Anti Maus)	V450	Rat IgM _k	AL-21	0,1µl	BD Horizon TM
I-Ab (Maus Anti Maus)	PE	Mouse (BALB/c) IgG2a _k	AF6-120.1	0,5µl	BD Pharmingen TM
CD80 (Hamster Anti Maus)	FITC	Armenian Hamster IgG2 _k	16-10A1	1µl	BD Pharmingen TM

Tab. 2.1.7.1.1 Antikörper

2.1.8 Blocking Substanz, Compensations Beads, BD Cytometer Setup und Tracking Beads

	Antigen/Spezifität	Isotyp	Klon	Hersteller
Blocking Substanz	Anti Mouse	CD 16/32	93	eBioscience
Compensations Beads	Anti Rat and Anti Hamster Ig _k Negativ Control Compensation Particles Set (BD)	-	-	BD Bioscience
BD Cytometer Setup und Tracking Beads	-	-	-	BD (Becton, Dickinson and Company) San Jose, USA

Tab. 2.1.8.1 Blockingsubstanz, Compensations Beads, BD Cytometer Setup und Tracking Beads

2.1.9 Antikörper für die magnetische Separation

Antigen/Spezifität	Isotyp	Klon	Hersteller
CD45 Micro Beads mouse	Rat IgG2b	30F11.1	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tab. 2.1.9.1 Antikörper für die magnetische Separation

2.1.10 Kommerzielle Standardtests (Kits)

Produkt	Hersteller
Milliplex® MAP Kit TGFβ1 Single Plex Magnetic Bead Kit, 96-Well Plate Assay	EMD Millipore Corporation 290 Concord Road Billerica, MA 01821
Milliplex® MAP Kit Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay (IFNγ, IL- 1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, VEGF)	EMD Millipore Corporation 290 Concord Road Billerica, MA 01821
Easy for You (EZ4U) the 4 th generation non radioactive cell proliferation & cytotoxicity assay (MTT)	Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Mouse IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience®

Tab. 2.1.10.1 Kommerzielle Standardtests (Kits)**2.1.11 Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ethanol 99%	Roth
Aqua ad injectabilia Braun	B Braun
Tryptanblaulösung 0,5%	Biochrom AG
Dulbecco`s PBS Solution (10x)	Sigma
EDTA 0.5M; pH 8.0	SERVA Electrophoresis GmbH
FoxP3 Staining Buffer Set (Permeabilization Buffer 10x, Fixation/Permeabilization Diluent, Fixation/Permeabilization Concentrate)	eBioscience®
RPMI 1640	Sigma Life Science
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH
NaCl Isotone Kochsalzlösung	B Braun
FACS Flow	BD (Becton, Dickinson and Company)
FACS Clean	BD (Becton, Dickinson and Company)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
RBC Erythrozyten Lysepuffer (10x)	BioLegend
Sheath Fluid	Luminex, United States

Tab. 2.1.11.1 Chemikalien und Reagenzien

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Zellsiebe (100µl, 40µl)	BD (Becton, Dickinson and Company)
Zellschaber 25cm	Sarstedt
Spritzen 50ml	B.Braun
Spritzen 5ml	BD (Becton, Dickinson and Company)
Spritzen 1ml	B.Braun
Mikrotiterplatten (96-well, 12-well, 6-well)	BD (Becton, Dickinson and Company)
Probenröhrchen für die Durchflusszytometrie (PS 5ml Tubes)	BD Falcon
Eppendorf Tubes 1,5ml	Eppendorf
Stripette (5ml, 10ml, 25ml)	Costar® USA
Reagenzröhrchen Falcon (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Millex Sterifilter 33mm	Millipore
Polysorb™ USP 5-0	Convidien™ AG
Pipettenspitzen	Greiner
Wundklammern Reflex 7mm	fineScience Berlin
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Desinfektionsspray	Schülke
Kanülen	BD Microlance™
MACS Säulen (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Tab. 2.1.12.1 Verbrauchsmaterialien

2.1.13 Lösungen, Puffer, Medien

Lösungen, Puffer, Medien	Zusammensetzung/Herstellung
Fixierlösung für intrazelluläre FACS-Färbung (Fixation/Permeabilization buffer)	1:4 Verdünnung (1 Teil Fixation/Permeabilization Concentrate + 3 Teile Fixation/Permeabilization Diluent)
Waschlösung für intrazelluläre FACS-Färbung (Permeabilization buffer)	1:10 Verdünnung (1 Teil Permeabilizations Buffer + 9 Teile destilliertes Wasser)
Erythrozyten Lysepuffer	1:10 Verdünnung (1 Teil Erythrozyten Lysepuffer + 9 Teile destilliertes Wasser)
Stain-Puffer (FACS Farbe Puffer/PBS Puffer)	500ml PBS Lösung (10-fach verdünnt) + 1ml EDTA
MACS-Puffer (Puffer zur Färbung der magnetischen Zellsortierung)	500ml PBS Lösung (10-fach verdünnt) + 2,5g Bovines Serum Albumin + 2ml EDTA
Lösung für die Tumorbehandlung („Isolösung“)	Collagenase (Biochrom), Hyaluronidase 2 + 4 (Rosch), Hänks BSS (Sigma), DNase 1 (Rosch), Insulin (Sanofi Aventis)
Medium Zellkultur	500ml RPMI 1640-50ml RPMI 1640 + 50ml 10% Fetales Kälber Serum

Tab. 2.1.13.1 Lösungen, Puffer, Medien

2.1.14 Konzentrationen von Gemcitabin und 5 FU in vitro und in vivo

	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Gemcitabin	5 FU	Gemcitabin	5 FU
Therapeutische Konzentration	15µlM	450µlM	150mg/kg	35mg/kg
Niedrige Konzentration	1,5µlM	45µlM	15mg/kg	3,5mg/kg
Sehr niedrige Konzentration	0,15µlM	4,5µlM	1,5mg/kg	0,35mg/kg

Tab. 2.1.14.1 Konzentrationen von Gemcitabin und 5 FU in vitro und in vivo

Um die in Tab.2.1.14 aufgeführten passenden Konzentrationen für die Behandlung der Mäuse und Zellkulturen zu erreichen, wurden die Chemotherapeutika Gemcitabin Kabi 38mg/ml und 5-Fluorouracil (5 FU) 50mg/ml verdünnt. Für die in vivo Experimente erfolgte dies mit der isotonischen Kochsalzlösung NaCl, die PBS Lösung (10-fach verdünnt) wurde für die Verdünnung der Chemotherapeutika in den in vitro Experimenten eingesetzt.

2.1.15 Software

Software	Hersteller
FlowJo (Version 7.6.1)	Tree Star
BD FACS Diva6.1.2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
GraphPad PRISM (Version 5)	GraphPad Software
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmont, USA
EndNote	Thomson Reuters

Tab. 2.1.15.1 Software

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Tierhaltung

Die Mäuse des Stammes C57BL/6 wurden hinter einer hygienischen Barriere mit einem Schleusensystem unter SPF (**S**pezifiziert-**P**athogen-**F**rei) Bedingungen gehalten. Dies trug zur Sicherung der mikrobiologischen Qualität, dem Schutz vor Infektionskrankheiten der Mäuse und somit zur Vermeidung der Beeinflussung der Versuchsergebnisse bei.

Die Mäuse kamen im Alter von 6-8 Wochen im Tierstall an und saßen mindestens eine Woche, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Die Tiere wurden getrenntgeschlechtlich in kleinen Gruppen (3-4 Tiere) gehalten. Wasser und Futter stand ad libitum zur Verfügung. Die Raumtemperatur lag bei 20-24°C und die Luftfeuchtigkeit betrug 45-65%.

Alle Experimente wurden von dem Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Insbesondere wurde das „Konzept der drei R“ berücksichtigt: **R**eplacement (*Ersetzen*, niedere Organismen, in vitro), **R**eduction (*Reduzieren*, Tierzahl im Tierversuch), **R**efinement (*Vermindern*, Minimierung von Schmerzen, Leiden, Schäden).

Es wurde mit folgenden Tierversuchsanträgen gearbeitet: T47-11, 35-9185.82/A-37/13, 35-91585.81/G-121/11.

2.2.2 Züchtung und Vorbereitung der Pankreaskarzinomzellen (Panc02)

2.2.2.1 Ursprung der Panc02-Zellen

Bereits 1984 wurden wissenschaftliche Untersuchungen zur Frage der erfolgreichen Implantation der Panc02-Zellen in C57BL/6 Mäusen vorgenommen. Es wurde ein mit 3-Methyl-cholanthrene gedränkter Baumwollfaden in das Pankreas eingesetzt und die Mäuse auf Tumorwachstum untersucht (Corbett et al., 1984).

2.2.2.2 Züchtung der Panc02-Zellen

Die Panc02-Zellen wurden in Stickstoff gelagert (1-2 Mio/ml) und zur weiteren Verwendung im Medium (RPMI mit FSC vgl. Medium Zellkultur Tab. 2.1.13.1) gewaschen, in 15ml Medium aufgenommen und in eine 75cm² Zellkulturflasche mit Filterdeckel überführt. Die Zellen wuchsen mindestens eine Woche und wurden bei gutem Wachstum zweimal pro Woche gesplittet, die Verdünnungsrate lag bei 1:2/1:4, je nach Wachstum und Bedarf. Zum Splitten wurde der Überstand abgenommen und verworfen, 2ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben und 5 min im Brutschrank inkubiert damit sich die Zellen vom Boden lösen. Danach wurden 10ml PBS zu den Zellen pipettiert um die Zellen darin aufzunehmen und das Trypsin-PBS-Zellgemisch herausgenommen. Je nach Bedarf wurde 6ml von diesem Zellgemisch abgenommen und zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 6ml Medium aufgenommen. In eine weitere Zellkulturflasche wurden 12ml Medium pipettiert und dann 3ml der gewonnenen Zellsuspension dazu pipettiert.

2.2.2.3 Vorbereitung der Pankreaskarzinomzellen für die Implantation

Die Kulturflasche mit den angesetzten Pankreaskarzinomzellen wurde aus dem Inkubator genommen und der Mediumüberstand abgenommen. Mit Hilfe von 2ml Trypsin EDTA wurden die am Boden haftenden Zellen gelöst. Nach 4 min Einwirkzeit im Inkubator löste man die Zellen durch kräftiges Klopfen an der Kulturflasche und gab 10ml PBS in die Flasche. Danach wurde der gesamte Inhalt incl. der Zellen in ein 15ml Falcon überführt und bei 23°C, 400g, 7 min zentrifugiert.

Als nächstes wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1ml PBS vorsichtig aufgenommen. 20µl dieser Lösung wurden entnommen und mit 180µl der Trypan-Blau-Lösung vermischt. Aus diesem Zell-Farbgemisch wurden 20µl entnommen, unter dem Mikroskop die lebenden Zellen ausgezählt, währenddessen das 15ml Falcon wieder mit derselben Einstellung zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Je nach Zellzahl wurde das Pellet danach in einer bestimmten Menge PBS aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt und auf Kühlakkus gelagert. Die Mäuse wurden mit einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml orthotop gespritzt.

2.2.3 Das Mausmodell

Um den Mäusen die Pankreaskarzinomzellen der syngenen Linie Panc02 orthotop zu implantieren mussten die Mäuse zunächst in Narkose gelegt werden. Zur Anflutung der Inhalationsanästhesie wurden 5% Isofluran[®]/O₂ in eine Narkosebox geleitet in der die Maus saß. Sobald die erwünschte

Narkosetiefe erreicht war wurde bei den männlichen Tieren die Erhaltung der Narkose mit 3,5% Isofluran®/O₂ und bei den weiblichen Tieren mit 3,0% Isofluran®/O₂ fortgesetzt. Das Kneifen mit der Pinzette in die Füße der Maus gab Auskunft über das Vorhandensein der Reflexe und diente damit zur Bestimmung der Narkosetiefe. Zur Sicherstellung der Analgesie peri- und post-operativ wurde 50µl Rimadyl® (1:10 Verdünnung mit 0,9% NaCl, 5mg/KG s.c.) in den Nacken gespritzt und die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe® vor dem Austrocknen geschützt.

Sobald das Tier das chirurgische Toleranzstadium III₂ erreichte, wurde es für die bevorstehende Laparatomie in Rückenlage gebracht, am Abdomen und substernal rasiert und desinfiziert. Besonders wichtig war die ständige Kontrolle der Erhaltung der Narkosetiefe durch die genaue Beobachtung der Maus. Mit einem ca. 0,5-1cm langen Schnitt wurde die Haut caudal des Sternums vorsichtig durchtrennt und stumpf bis zur Muskelschicht präpariert. Um den Bauchraum zu eröffnen wurde ein ca. 1cm langer Schnitt an der Linea alba vorgenommen. Zunächst musste man die Leberlappen vorsichtig hochlagern um ein Blick auf das Pankreas zu erhalten.

Sobald man das Pankreas in die Bauchhöhlenöffnung verlagert hat, injizierte man 5µl der Pankreaskarzinomzellen (2×10^7 Zellen/ml) mit Hilfe der GASTIGHT Syringe (25µl) direkt in den Pankreaskopf. 20-30 Sekunden lang wurde die Injektionsstelle durch das Abklemmen mit einer Pinzette verschlossen. Sobald man das Pankreas wieder vorsichtig zurück verlagert hatte, wurde die Öffnung der Bauchhöhle mit einer fortlaufenden Muskel- und einer fortlaufenden Hautnaht (Kürschnernaht) wieder verschlossen. Dies erfolgte mit einem resorbierbaren polyfilen Faden (Polysorb™ 5-0, Rundnadel 12mm). Nach erfolgter fortlaufender Hautnaht wurden zur Sicherheit noch 3-4 Metallwundklammern über die Naht gesetzt. Nach ca. 7-11 Tagen, je nach Heilungsverlauf, konnten die Klammern abgenommen werden. Die Tiere wurden nach der OP auf eine Wärmeplatte gesetzt und beobachtet bis sie wieder wach waren.

2.2.3.1 Behandlung der Mäuse für die in vivo Experimente

Die Mäuse wurden an Tag 5, 6, 7, 8, 9 post-op mit 5 FU nach Gewicht gespritzt. Die Behandlung mit Gemcitabin erfolgte an Tag 5, 9, 12, 16 post-op ebenfalls nach Gewicht (Tab. 2.2.3.1.2.1 Behandlung nach Gewicht). Die Injektion erfolgte in beiden Fällen intraperitoneal, während die Mäuse in Rückenlage mit dem Kopf nach unten fixiert wurden um einer Organschädigung durch die eindringende Kanüle vorzubeugen.

Um die passende Konzentration der jeweiligen Behandlung (therapeutische, niedrige und sehr niedrige Konzentration) zu erreichen, wurden die beiden Standard Chemotherapeutika Gemcitabin Kabi 38mg/ml und 5-Fluorouracil (50mg/ml) mit der isotonischen Kochsalzlösung NaCl (0,9%) verdünnt (Tab. 2.1.14.1).

Die Mäuse wurden in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt (Kontrollen, therapeutische Dosierung, niedrige und sehr niedrige Dosierung) und falls nötig mit einer Markierung am Ohr versehen um Verwechslungen zu vermeiden. Es wurden vier Gruppen pro Experiment therapiert, wobei die Kontrollgruppe keine Behandlung erhielt, da bei den in vitro Experimenten kein Effekt unter der Therapie mit PBS zu erkennen war.

2.2.3.1.2 Behandlung nach Gewicht

Gewicht	Therapeutische Konzentration	Niedrige Konzentration	Sehr niedrige Konzentration
20g	80µl	80µl	80µl
21g	84,03µl	84,03µl	84,03µl
22g	87,71µl	87,71µl	87,71µl
23g	91,74µl	91,74µl	91,74µl
24g	96,15µl	96,15µl	96,15µl
25g	100µl	100µl	100µl
26g	104,16µl	104,16µl	104,16µl
27g	107,53µl	107,53µl	107,53µl
28g	112,35µl	112,35µl	112,35µl
29g	116,27µl	116,27µl	116,27µl
30g	120,48µl	120,48µl	120,48µl

Tab. 2.2.3.1.2.1 Behandlung nach Gewicht

Die Menge der verabreichten Behandlung richtete sich nach dem Gewicht der Mäuse, während die Konzentration (Tab. 2.1.14.1) innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe gleich blieb.

Eine regelmäßige Kontrolle der operierten Mäuse war wichtig um das Tumorwachstum und den Gesundheitsstatus der Mäuse zu beurteilen und um gegebenenfalls eingreifen zu können. Falls das Leiden und die Schmerzen der Tiere zu groß waren wurden sie getötet. Das Eintreten folgender Kriterien hätte sofort zum Abbruch des Tierversuches geführt:

Abnahme des Körpergewichts (>20% im Vergleich zum Körpergewicht bei Versuchsbeginn unter Berücksichtigung der Gewichtszunahme durch das Tumorwachstum), sichtbare Aszites, Tumordurchmesser >2cm, Unterkühlung, Verkrampfungen, Lähmungen, schwere Automutilation, starkes Hyperventilieren bzw. Atemgeräusche und die Verweigerung der Nahrungsaufnahme.

2.2.3.2 Blutentnahme, Milz- und Tumorentnahme (und Aufbereitung)

Nach 4 Wochen post-op wurden die Tiere mittels Injektionsnarkose (100µl Xylazin und 900µl Ketamin/ml) anästhesiert. Pro Tier wurden 150µl i.p. injiziert und bei Bedarf nachgespritzt. Ziel war es die gewünschte Narkosetiefe zu erreichen, die mit Hilfe der Reflexe an den Beinen der Tiere getestet wurde. Sobald die gewünschte Narkosetiefe erreicht war, wurde das Tier in Rückenlage fixiert und die Kanüle senkrecht zur Oberfläche lateral oder ventral neben dem Sternum durch die Haut gestochen bis die Pulsation des Herzens spürbar war und Blut durch die Kanüle trat. Hilfreich war die Punktionsstelle, an der der Herzspitzenstoß am deutlichsten fühlbar war. Um keinen Herzkollaps zu erzeugen, war eine langsame Blutentnahme von großer Bedeutung. Das Blut wurde in beschriftete Eppendorf Gefäße überführt und sofort gekühlt. Die Blutproben wurden nach der Entnahme zentrifugiert (25 min, 2,6g, 4°C), der Überstand abgenommen und in ein weiteres Eppendorf Gefäß pipettiert. Diese Proben wurden nochmals zentrifugiert (10 min, 10g, 4°C) und der Überstand wieder in ein weiteres Eppendorf Gefäß überführt um danach für weitere Untersuchungen im -20°C Kühlschranks eingefroren zu werden.

Nach erfolgter Blutentnahme wurden die Mäuse zur Entnahme von Milz und Tumor getötet. Die Tötung wurde mit Hilfe der zervikalen Dislokation durchgeführt. Wichtig war hierbei die Durchtrennung des Rückenmarks, der Medulla oblongata und der versorgenden Blutgefäße des Gehirns.

Danach wurde die Maus in Rückenlage fixiert, das Abdomen desinfiziert und eröffnet. Es wurden die Größe und das Vorhandensein von Metastasen an der Bauchwand, dem Darm, der Leber oder an weiteren Lokalisationen notiert und die Größe des Tumors am Pankreas genau vermessen und dokumentiert. Als nächstes wurde die Milz und der Tumor des Pankreas jeweils steril entnommen und in, mit sterilem PBS gefüllte Eppendorf Gefäße, überführt und auf Eis gelagert.

2.2.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Die Milzen und Tumoren wurden durch einen 100µl Sieb mit Hilfe eines Spritzenkolbens (5 ml Spitze) gedrückt und mit PBS gespült. Die Proben wurden bei 300g, 4°C, 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Bei den in vivo Experimenten wurde 1 ml Erythrolysepuffer auf das Zellpellet gegeben. Nach 2 min wurden 10ml PBS in das Reagenzröhrchen pipettiert. Die Zerstörung der Erythrozyten verhindert eine unspezifische Bindung der Antikörper an diese Zellen. Danach wurden die Proben bei denselben Einstellungen zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet wieder in 10ml PBS Puffer vorsichtig aufgenommen und bei 300g, 4°C, 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in PBS Puffer aufgenommen. Das PBS-Zellgemisch wurde dann durch einen 40µl Sieb gerieben und mit PBS gespült und danach wieder bei den genannten Einstellungen zentrifugiert. Bei den Tumorzellen wurde der letzte Schritt nochmal wiederholt, sodass die Zellen zweimal durch den 40µl Sieb zerrieben wurden. Die Reagenzröhrchen wurden nochmals zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Um die genaue Zellzahl zu bestimmen wurde das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und mit Hilfe von Trypan blue angefärbt und in einer 1:100 Verdünnung ausgezählt. Bei den in vivo Experimenten konnte man durch die Anzahl der Zellen die Menge des Puffers für die weitere Verarbeitung für die Durchflusszytometrie errechnen.

Bei den in vitro Experimenten (Milzen von gesunden Mäusen und Milzen von tumortragenden Mäusen) wurde anhand der Zellzahl die Menge des Mediums ausgerechnet, in das die Zellen aufgenommen und in Zellkultur gebracht wurden. Das Zell-Medium Gemisch wurde bei den in vitro Experimenten in 6-well Platten überführt und für eine Stunde in den Inkubator gebracht. Eine Stunde später wurden die Zellen mit den Chemotherapeutika (Tab. 2.1.14.1 Konzentrationen von Gemcitabin und 5 FU in vitro und in vivo) und die Kontrollen mit PBS behandelt. In jedem Well der Mikrotiterplatte waren 5ml Zell-Medium-Lösung (2 Mio Zellen/ml) und es wurden in jedes Well 10µl Behandlung/PBS dazu pipettiert. Die in vitro Experimente wurden nach 24h auf Kontamination untersucht und danach vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in Reagenzröhrchen überführt und bei den oben aufgeführten Einstellungen zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde für weitere Untersuchungen eingefroren und das Zellpellet wieder in 1ml aufgenommen um die Zellzahl erneut zu bestimmen. Die Zellzahl hat die Menge an Puffer festgelegt, in der die Zellen aufgenommen wurden um weiter für die Durchflusszytometrie vorbereitet zu werden. Die Zielkonzentration für die Messung war 2×10^6 Zellen/50µl.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence activated cell sorting) genannt, ermöglicht die Analyse einzelner Zellen in Suspensionen. Diese können anhand ihrer Größe, Granularität und der Ausprägung membranständiger sowie intrazellulärer Moleküle bestimmt werden und durch die Bindung von Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern markiert werden.

Die Leukozyten werden dabei oftmals anhand der Ausprägung von so genannten Differenzierungsantigenen „CD“ (cluster of differentiation) charakterisiert. Durch hydrodynamische Fokussierung in einem Flüssigkeitsstrahl passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl. Da jede Zelle spezifische Eigenschaften aufweist, wird das Licht des Lasers anders gestreut. Licht, das innerhalb eines geringen Winkels (3-10°) streut, wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) bezeichnet und ist proportional zur relativen Größe der Zelle. Das Licht, welches in einem 90° Winkel gestreut wird, wird als Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität der Zelle.

Durch die Markierung der Zellen mit fluoreszenz-konjugierten Antikörpern werden die Fluorochrome beim Passieren des Laserstrahls angeregt und emittieren Licht in einer für das Fluorochrom charakteristischen Wellenlänge. Diese wird von Photodetektoren erkannt und die Signale elektrisch umgewandelt.

Die Software des Durchflusszytometers ermöglicht die Darstellung der gemessenen Parameter als eindimensionales Histogramm (Anzahl gegen Parameter) oder als eine zweidimensionale Punktwolkendarstellung in einem Graphen (dot plot). Zellpopulationen können anhand ihrer Eigenschaften für die Zellanalyse oder -sortierung durch das Setzen von Analysefenstern (gates) ausgewählt und einzelne Subpopulationen aus einem heterogenen Zellgemisch gezielt isoliert werden. Durch geeignete Wahl und Zusammensetzung der einzelnen Marker mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich in einem Färbeansatz viele verschiedene Subpopulationen unterscheiden.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden die Zellsuspensionen auf folgende Zellpopulationen untersucht:

Zielpopulationen und die spezifischen Antikörper/Achsen zur Identifikation

Zellpopulation	Antikörper und Achsen
Tumorzellen	SSC ⁺ /CD45 ⁻
Leukozyten	SSC ⁺ /CD45 ⁺
B-Lymphozyten	CD19 ⁺ /CD3 ⁻
Lymphozyten-T-Zell-Subpopulationen:	CD3 ⁺
CD4 ⁺ -T-Zellen	CD4 ⁺ , CD8 ⁻
CD8 ⁺ -T-Zellen	CD4 ⁻ , CD8 ⁺
Effektor-Gedächtnis-T-Zellen	CD62L ⁻ , CD44 ⁺
Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen	CD62L ⁺ , CD44 ⁺
Naive T-Zellen	CD62L ⁺ , CD44 ⁻
Effektor-T-Zellen	CD62L ⁻ , CD44 ⁻
Früh exprimierter Aktivierungsmarker der T-Zellen	CD69 ⁺
NKT-Zellen	CD3 ⁺ , NK11 ⁻
NK11 Zellen	CD3 ⁻ , NK11 ⁺
Regulatorische T-Zellen	CD4 ⁺ ; FoxP3 ⁺
Myeloide Suppressorzellen	CD11b ⁺ , Gr-1 ⁺
Makrophagen	CD11b ⁺ , F4/80 ⁺ , Gr-1 ⁻
Dendritische Zellen	CD11c ⁺ , CD11b ⁺ , CD 11c ⁺ /CD45R ⁺ /B220, CD80 ⁺ /CD86 ⁺
Lebende Tumorzellen	V. Dye ⁻ /CD45 ⁻
Tote Tumorzellen	V. Dye ⁺ /CD45 ⁻
Lymphozyten	SSC ⁻ /CD45 ⁺
Marker für Degranulation (von NK und CD8 ⁺ -T-Zellen)	Histogramm/CD107a ⁺

Tab. 2.2.5.1.1 Zielpopulationen und die spezifischen Antikörper/Achsen zur Identifikation

Genauere Informationen zu den Antikörpern sind in Tab. 2.1.7.1.1 zu finden.

2.2.5.2 Extrazelluläre Färbung

Im nächsten Schritt wurde die Einzelzellsuspension (in vitro & in vivo) in beschriftete Reagenzröhrchen überführt und je 50µl Zelllösung und 1µl Blocking Substanz (anti-CD16/32) dazugegeben um eine unspezifische Hintergrundfärbung über die Fc-Rezeptoren zu verhindern. Die Zellen wurden danach für 10 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden in jedes Reagenzröhrchen 50µl Zellsuspension pipettiert und die fluoreszenzgekoppelten Antikörper dazugegeben. Den Negativkontrollen wurde zu der Zellsuspension, statt den Antikörpern, dieselbe Menge Färbepuffer dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen noch dreimal mit dem Färbepuffer gewaschen um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Pro Reagenzröhrchen wurden 2ml des Färbepuffers verwendet und die Proben danach bei 400g, 4°C für 5 min zentrifugiert und daraufhin der Überstand vorsichtig verworfen und das Zellpellet wieder in 2ml Färbepuffer aufgenommen. Diese Schritte erfolgten dreimal. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 200-300µl Färbepuffer resuspendiert und die Probe danach mit dem Durchflusszytometer analysiert.

2.2.5.3 Intrazelluläre Färbung

Um ein erfolgreiches Binden der intrazellulären Antikörper an das passende Antigen in der Zelle zu ermöglichen, mussten die Zellen zunächst fixiert und die Zellwand durchgängig gemacht werden. Hierfür wurde den Zellen, die bereits mit extrazellulären Antikörpern markiert wurden, pro Reagenzröhrchen 1ml Fixierlösung zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 4h wurden die Zellen mit 2ml Permeabilizations-Puffer gewaschen und bei 400g, 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Permeabilizations-Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Daraufhin wurden die konjugierten intrazellulären Antikörper zu den Zellen pipettiert und es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 4°C im Dunkeln. Danach wurden nochmals zwei Waschschriffe mit Permeabilizations-Puffer, wie oben beschrieben, durchgeführt. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 200-300µl resuspendiert. Abschließend konnten die Proben mit Hilfe des Durchflusszytometer analysiert werden.

2.2.5.4 Technische Kontrollen der Durchflusszytometrie

2.2.5.4.1 Kompensation

Da die meisten Fluoreszenzfarbstoffe oft ein ganzes Spektrum an Farben ausstrahlen, kann es passieren, dass das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffes nicht nur in den dafür vorgesehenen Kanal bzw. Detektor gelangt und so auch in einem anderen Kanal einen Impuls erzeugen kann. Mit Hilfe der Kompensation ist es möglich zu ermitteln wie stark ein Farbstoff in einen anderen Kanal streut. Dies kann rechnerisch behoben werden. Dazu werden spezielle Kompensationsproben mit nur einem Antikörper mit dem Durchflusszytometer separat gemessen.

100µl des Färbepuffers wurden in den Reagenzröhrchen vorgelegt und jeweils 1 Tropfen der BD CompBeads Negativ Control (FBS) und BD™ Comp Beads Anti-Rat Ig_k dazugegeben. Daraufhin wurden die Antikörper jeweils in das passende Röhrchen pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. 2ml Färbepuffer werden nach der Inkubationszeit in jedes Reagenzröhrchen pipettiert, bei 200g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Beat Pellet in 500µl Färbepuffer aufgenommen. Abschließend konnten die einzelnen Proben mit Hilfe des Durchflusszytometer gemessen und an die folgenden Experimente angehängt werden. Damit konnten eventuelle Fehlerquellen durch eine Überlappung der Fluoreszenzspektren beseitigt werden. Eine Kompensation wurde alle 4 Wochen durchgeführt.

2.2.5.4.2 FMO (Fluorescence Minus One)

FMO Proben werden gemessen, da sie der Kontrolle einer erfolgreichen Kompensation dienen, aber vor allem weil sie einen essentiellen Bestandteil bei der Auswertung („Gating“) darstellen. Die FMO Proben enthalten, wie alle anderen Proben, Zellen aus dem Experiment und die für die jeweilige Probe festgelegten Antikörper. Nur in einem Punkt unterscheiden sie sich von den anderen Proben: Ein Antikörper wird bewusst weggelassen um eine Kontrolle bei der genauen Populationsbestimmung zu haben, die je nach Zellpopulation oder Experiment minimal variieren kann. Der Vergleich der FMO Proben mit den „normalen“ Proben kann die Auswertung erleichtern und deren Qualität sichern. In jedem Experiment wurden ausreichend FMO Proben gemessen, je nach Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen.

2.2.6 Magnetische Zellsortierung (MACS)

2.2.6.1 Allgemeines Prinzip

Bei der magnetischen Zellsortierung werden Antikörper verwendet, die an magnetische Mikropartikel gekoppelt sind. Die Zellsuspension kann damit immunomagnetisch markiert werden. Nachdem die markierten Antikörper an die passenden Zellen gebunden haben, können diese mit Hilfe eines starken Magneten aus der Zellsuspension isoliert werden. Nachdem die Zellen magnetisch markiert sind, wird die Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die an einem starken Magneten befestigt ist. Die Säule dient als magnetischer Zellfilter. Die magnetisch markierten Zellen bleiben in der Säule, die nicht markierten fließen durch. Sobald die Säule entfernt wird, können die retinierten Zellen eluiert werden, da die Säule ohne den Magneten die Zellen nicht länger zurückhält.

2.2.6.2 Magnetische Zellseparation und Kultivierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Tils)

2.2.6.2.1 Magnetische Markierung der Zellen

Der Tumor des Pankreas wurde steril aus dem Tier entnommen (Abschnitt 2.2.3.2 Blutentnahme, Milz- und Tumorentnahme), das Tumorgewebe zerkleinert (2-3mm), mit PBS Puffer ab gespült und zusammen mit 5ml Isolösung (Tab. 2.1.13.1 Lösungen, Puffer, Medien) je Tumor, in einem großen Reagenzröhrchen gesammelt. Alle Tumoren der männlichen Mäuse eines Experiments und alle Tumoren der weiblichen Tiere wurden jeweils zu einer Probe vereint um genug Zellen für das Experiment zu haben. Die Tumor-PBS-Isolösung wurde 15 min in ein warmes Wasserbad gestellt, leicht geschüttelt und danach bei 4°C, 5 min mit 400g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Die Tumorzellen wurden dann genauso behandelt wie in Abschnitt 2.2.4 (Herstellung von Einzelzellsuspensionen) beschrieben. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Mikroskops bestimmt, die Tumorzelllösung für 10 min mit 300g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als nächstes wurde das Zellpellet in Puffer (90µl/10⁷ Zellen) für die magnetische Zellseparation (MACS Puffer) resuspendiert. Danach wurden 10µl CD45 MicroBeads /10⁷ Zellen zu den Tumorzellen gegeben, vorsichtig auf- und ab pipettiert und für 15 min bei 4-8°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in 1ml MACS Puffer/10⁷ Zellen gewaschen und bei 300g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2ml MACS Puffer aufgenommen.

2.2.6.2.2 Magnetische Separation

Die Reagenzröhrchen (LS Säulen) wurden am Magneten befestigt und pro LS Säule mit 3ml MACS Puffer gespült. Nachfolgend wurde die Tumorzelllösung langsam (1-2ml/LS Säule) hinzugefügt. Die magnetisch markierten Zellen CD45⁺ wurden in den LS Säulen zurückgehalten, während die nicht magnetisch markierten Zellen CD45⁻ durchgelaufen sind (da sie nicht vom Magneten zurückgehalten wurden). Danach wurden die LS Säulen mit 2x3ml MACS Puffer gespült und von dem Magneten genommen. Im nächsten Schritt wurden die CD45⁺ Zellen gewonnen, in dem man die LS Säulen mit Hilfe eines Spritzenkolbens mit Druck und 3ml MACS Puffer gespült hat. Um alle CD45⁺ Zellen aus der LS Säule zu gewinnen wurde ein weiteres Mal mit 1ml MACS Puffer ausgespült, die Zellprobe bei den oben genannten Einstellungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.6.2.3 Kultivierung und Analyse der Zellen

Mit Hilfe der Zellzahl wurde die Mediummenge (Tab. 2.1.13.1 Medium Zellkultur) festgelegt in der die Zellen aufgenommen wurden. Sobald die gewünschte Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml erreicht war, wurde die Zelllösung in 6-Well Platten überführt, 3ml in jedes Well. Je nach Behandlungsgruppe wurde in die Wells 7 μ l der Chemotherapeutika Gemcitabin oder 5 FU in therapeutischer, niedriger oder sehr niedriger Konzentration pipettiert, für die Kontrollen wurde 7 μ l PBS verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Kulturen vorsichtig auf und ab pipettiert und in ein Reagenzgefäß überführt. Zellschaber halfen beim Lösen der Zellen vom Boden. Die Proben wurden zentrifugiert (400g, 4°C, 5 min), der Überstand für weitere Untersuchungen weggefroren und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen, die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt und die Zellen wieder in der ausgerechneten Menge Medium (Tab. 2.1.13.1 Medium Zellkultur) aufgenommen um die Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml sicherzustellen.

Danach wurden die Panc02-Zellen ebenso geerntet wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, in Medium (Tab. 2.1.13.1 Medium Zellkultur) aufgenommen und auf eine Konzentration von 10^5 Panc02-Zellen/ml gebracht. Anschließend wurden die Proben in zweifacher Ausführung in 12-Well Platten nach folgendem Schema, Konzentration und Behandlung pipettiert:

Proben:

Kontrolle weiblich/männlich, **therapeutische Konzentration** weiblich/männlich, **niedrige Konzentration** weiblich/männlich, **sehr niedrige Konzentration** weiblich/männlich

Für jede dieser aufgezählten Proben gab es eine 12-Well Platte (alle 6 Wells in Duplikate, falls genug Zellen zur Verfügung standen)

1:5, 1:10, 1:20, 1:40 kennzeichnen die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse der Zielzellen zu den Effektorzellen (Zielzellen:Effektorzellen)

Allgemeines Pipettierschema:

Probenverteilung an einem Beispiel:

Panc02	Tils (= Tumordinfiltrierende Lymphozyten)	Panc02	Tils (= Tumordinfiltrierende Lymphozyten)
10 ⁵ Panc02 (1ml)	Tils (1ml)	KONTROLLE,WEIBLICH	KONTROLLE,WEIBLICH
Medium (2ml)	Keine Panc02	10 ⁵ Panc02 (1ml)	Tils (1ml)
Keine Tils	Medium (2ml)	Medium (2ml)	Keine Panc02
		Keine Tils	Medium (2ml)
1:5	1:10	1:5	1:10
10 ⁵ Panc02 (1ml)	10 ⁵ Panc02 (1ml)	KONTROLLE,WEIBLICH	KONTROLLE,WEIBLICH
5x 10 ⁵ Tils (250µl)	1x10 ⁶ Tils (0,5ml)	10 ⁵ Panc02 (1ml)	10 ⁵ Panc02 (1ml)
Medium (1,75ml)	Medium (1,5ml)	5x 10 ⁵ Tils (250µl)	1x10 ⁶ Tils (0,5ml)
		Medium (1,75ml)	Medium (1,5ml)
1:20	1:40	1:20	1:40
10 ⁵ Panc02 (1ml)	10 ⁵ Panc02 (1ml)	KONTROLLE,WEIBLICH	KONTROLLE,WEIBLICH
2x10 ⁶ Tils (1ml)	4x10 ⁶ Tils (2ml)	10 ⁵ Panc02 (1ml)	10 ⁵ Panc02 (1ml)
Medium (1ml)	Kein Medium	2x10 ⁶ Tils (1ml)	4x10 ⁶ Tils (2ml)
		Medium (1ml)	Kein Medium

Abb. 2.2.6.2.3.1 Verteilung und Konzentration der Proben des Zytotoxizitätsexperiments auf der 12-well Platte

Nachdem die Proben korrekt pipettiert in den 12-Well Platten waren, wurden sie 12h inkubiert, die Zellen geerntet, zentrifugiert (400g, 4°C, 5 min) der Mediumüberstand weggefroren und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Das Zellpellet wurde in 100-200µl aufgenommen, in die Reagenzröhrchen überführt und wie beschrieben im Protokoll der Durchflusszytometrie geblockt, mit PBS Puffer gewaschen und in 1ml PBS Puffer aufgenommen. Danach wurde der Antikörper „Fixable Viability Dye Cell“ dazu pipettiert (1µl/1ml Zellsuspension) und für 30 min bei 2-8°C unter Lichtvermeidung inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen mit dem FACS Färbepuffer gewaschen, bei den oben genannten Einstellungen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die restlichen Antikörper dazugegeben. Das weitere Vorgehen folgte dem Protokoll der Durchflusszytometrie.

Ziel des Experiments war, die tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu isolieren und danach die NK- und CD8⁺-T-Zellen auf ihre Zytotoxizität zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit galt der unterschiedlich hoch dosierten Therapie mit den Standardchemotherapeutika im Hinblick auf die Zytotoxizität der einzelnen Proben.

2.2.7 Luminex Methode

Die Basis der Technologie von Luminex 200 stellt das Prinzip der Fluorometrie von Durchflusspartikeln dar. Kleine Polystyrolpartikel (Beads oder Mikrosphären) dienen als Grundlage der Analyse. Diese binden fest an die Mikrotiterplatten und können spezifische Oberflächenantigene identifizieren. Jeder Beadtyp bindet an sein spezifisches Zielmolekül. Die Beads, die an ein spezifisches Zielmolekül gebunden sind, werden mit einem spezifischen Fluoreszenzmarker (Konjugat) markiert und anhand ihrer Fluoreszenz individuell analysiert und ausgewertet. Hierfür wurde die Probe mit Hilfe einer Sonde aus einer Mikrotiterplatte entnommen und in die Küvette gespritzt. Das System besteht aus zwei Lasern, der eine regt das Farbgemisch der xMAP Mikrokugeln an und der zweite regt die Fluorophore an, die an der Oberfläche der xMAP Mikrokugeln gebunden sind. Die Vorbereitung der Proben und die Durchführung wurden gemäß dem Milliplex MAP Kit-Protokoll durchgeführt.

URL: http://www.merckmillipore.com/INTL/es/product/MILLIPLEX-MAP-TGF%C3%9F1-Magnetic-Bead-Single-Plex-Kit---Immunology-Multiplex-Assay,MM_NF-TGFBMAG-64K-01,
http://www.emdmillipore.com/INTL/en/product/MILLIPLEX-MAP-Mouse-CytokineChemokine-Magnetic-Bead-Panel---Immunology-Multiplex-Assay,MM_NF-MCYTOMAG-70K (Stand: 12.08.2016))

Die Proben wurden über Nacht nach den ersten Bearbeitungsschritten inkubiert und am nächsten Tag mit dem Gerät Luminex 200°™ analysiert und danach ausgewertet. Die Luminex xMap Methode ermöglicht es, pro Probe, mehrere Parameter zu untersuchen und zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus. Bei den durchgeführten Experimenten wurden Seren und Mediumüberstände hinsichtlich ihrer Zytokine und Chemokine untersucht.

2.2.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest stellt ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren dar. Das Prinzip ist die Bindung eines markierten Antikörpers an das nicht markierte Antigen. Eine enzymatische Reaktion gibt Aufschluss ob die Antikörper-Antigenbindung stattgefunden hat. Das Enzym erzeugt aus dem farblosen Produkt ein farbiges, das mit Hilfe der Lichtabsorption gemessen werden kann. Unspezifische Bindungen werden verhindert und ungebundene Antikörper ausgewaschen. Bei den durchgeführten Experimenten wurde der sogenannte Sandwich- oder capture-ELISA durchgeführt, der eine Abwandlung des klassischen ELISA ist. Bei diesem Nachweisverfahren binden spezifische Antikörper am Boden der Mikrotiterplatte, die das gewünschte Antigen mit hoher Affinität binden können. Sobald das Antigen gebunden hat wird ein weiterer Antikörper dazugegeben, der an einer anderen Stelle spezifisch am nachzuweisenden Antigen bindet. Auch hier werden die gebundenen Antikörper durch eine enzymabhängige Reaktion farblich sichtbar und die Lichtabsorption gemessen.

Ziel der Durchführung des ELISA war die Bestimmung von IFN gamma in den Mediumüberständen der Proben des Zytotoxizitätsexperiments. Verwendet wurde dafür der Mediumüberstand des dritten Tages. Die Platten enthielten Standards, Tumordinfiltrierende Lymphozyten, Panc02-Zellen, Proben mit verschiedenen Behandlungen (Kontrollen, therapeutische, niedrige und sehr niedrige Konzentration) in unterschiedlichen Verdünnungen der Ziel- und Effektor-Zellen (Panc02 : Tils). Am ersten Tag wurden die spezifischen Antikörper auf die Platten pipettiert und über Nacht inkubiert. Danach wurde das Protokoll den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt und die Platten am Ende bei 450nm gemessen (Immunoassay – TDS Protocol: URL: <http://www.ebioscience.com/media/pdf/tds/88/88-7346.pdf> (Stand: 12.08.2016)).

2.2.9 MTT-Test

Das Prinzip des nichtradioaktiven Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest basiert auf der Tatsache, dass farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze von lebenden Zellen in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Um eine Referenz zur Berechnung zu haben, wurde stets eine Hintergrundkontrolle mitgeführt. Das Substrat (entsprechende Menge für eine 96-Well Mikrotiterplatte mit 200µl Zellkulturmedium/Well) wurde mit 2,5ml ACT (Aktivator) vermischt und aufgelöst. 100µl der Zelllösung (1×10^6 Zellen/ml) wurde in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert, 100µl Medium (RPMI + 10% FCS) dazugegeben und 2h bei 37° C inkubiert. Die Zellkonzentration lag somit bei 1×10^5 Zellen/Well. Danach wurde die Behandlung (Gemcitabin/5 FU) dazugegeben (Tab. 2.1.14.1 Konzentrationen von Gemcitabin und 5 FU in vitro) und die Zellen 24h bei 37°C inkubiert. Als nächstes wurde der Mediumüberstand abgenommen und nochmals 250µl Medium zu den Zellen pipettiert und 20µl des Substrats dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4-5h, abhängig von der Stoffwechselkapazität der Zellen, konnten die Proben bei 450nm gemessen werden.

2.2.10 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2010 und der Software „GraphPadPrism Version 5.01“ durchgeführt. Die Verteilung der erhobenen Daten wird mit Hilfe der Standardabweichung, dem Standardfehler, dem Median, und den 25% - und 75% Perzentilen veranschaulicht. Um das statistische Testproblem Nullhypothese (das Gegenteil von dem was ich beweisen will, zum Beispiel alle zu vergleichenden Werte sind gleich) vs. Alternativhypothese (Forscherhypothese, das was ich nachweisen will) zu lösen, werden folgende Tests angewandt: Der ungepaarte t-Test für normal verteilte Daten von zwei Gruppen, für normal verteilte Daten von mehreren Gruppen der „one-way ANOVA“ (analysis of variance) mit dem Bonferroni`s post-hoc Test. Der Mann-Whitney Test wurde für nicht parametrische Datenauswertungen angewandt. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein parameterfreier statistischer Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse getestet wird, ob unabhängige Stichproben hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable einer gemeinsamen Population entstammen. Der Chi-Quadrat-Test prüft, ob vorliegende Daten auf eine bestimmte Weise verteilt sind. Je kleiner der p-Wert ausfällt, desto weniger passen die Nullhypothese H_0 und die erhobenen Daten zusammen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$) wurde als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des Einflusses der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf das Tumorwachstum und die Metastasierung

Ziel dieses Experiments war die Untersuchung der Auswirkung der niedrig und sehr niedrig dosierten metronomischen Chemotherapie (LD, ULD) im Vergleich mit der konventionell verabreichten therapeutischen Dosierung (TD) der Standard-Chemotherapeutika auf das Tumorwachstum und die Metastasierung. Dazu wurden die Mäuse mit 5 FU an Tag 5, 6, 7, 8, 9 und mit Gemcitabin an Tag 5, 9, 12, 16 nach der Implantation der Panc02-Zellen behandelt. Nach vier Wochen wurde der Primärtumor entnommen, die Größe bestimmt und statistisch erfasst. Zusätzlich wurden die makroskopisch sichtbaren Metastasen des Peritoneums und des Colons notiert. Zur Kontrolle (co) wurden die Tumoren von nicht behandelten Mäusen vermessen und die Metastasierung dieser Tiere protokolliert.

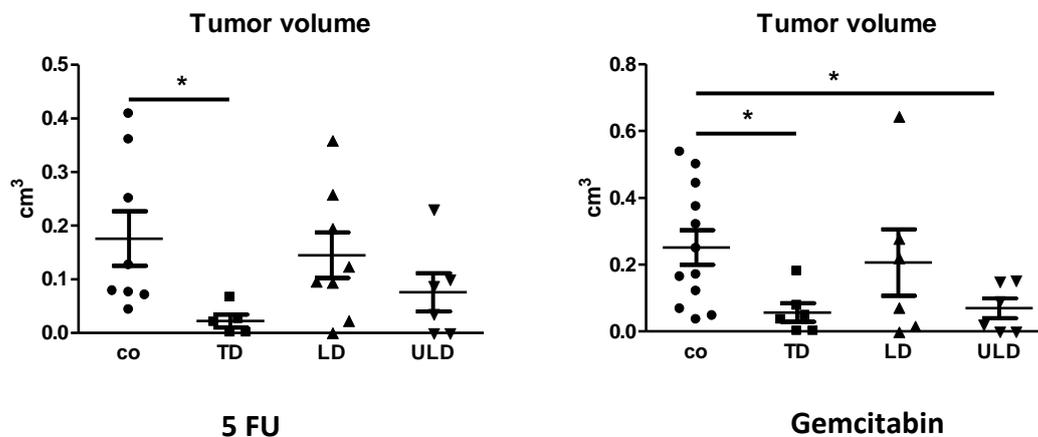


Abb. 3.1.1 Einfluss der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf das Tumorwachstum der an Pankreaskarzinom erkrankten Mäuse. Vier Wochen nach erfolgreicher Implantation der Panc02-Zellen und der Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie wurden die Tumoren entnommen und die Tumorgöße statistisch erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's post test (n=11-14 Kontrollgruppe (co), n=6-8 therapeutische Dosis (TD), n=8-9 low dose (LD), n=7 ultra low dose (ULD)); *p<0,05).

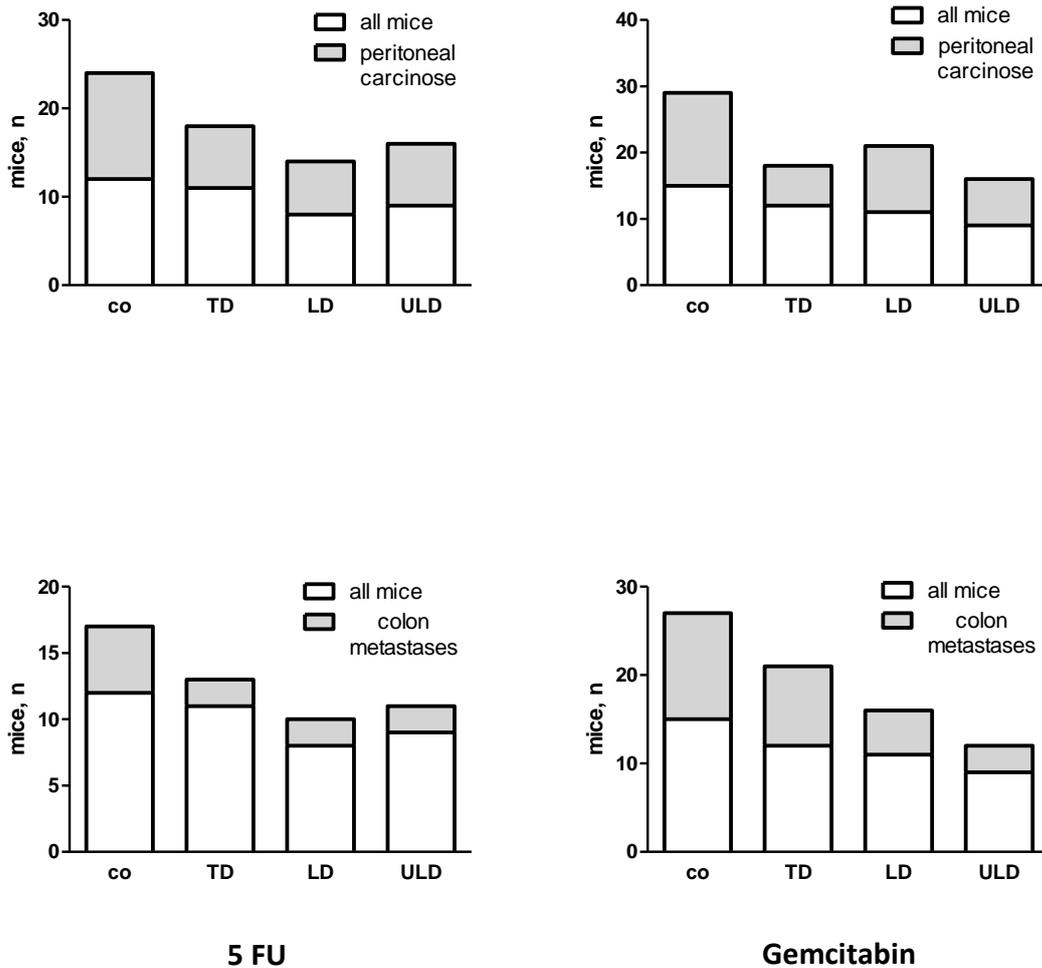


Abb. 3.1.2 Einfluss der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die Metastasierung der an Pankreaskarzinom erkrankten Mäuse. Vier Wochen nach erfolgreicher Implantation der Panc02-Zellen und der Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie wurden die Mäuse auf Metastasen untersucht und die Metastasierungsrate statistisch mittels Chi-Quadrat erfasst.

Abbildung 3.1.1 zeigt eine deutlich geringere TumorgroÙe unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin in allen Behandlungsgruppen (TD, LD, ULD). Dabei unterscheidet sich die TumorgroÙe der mit therapeutischer Dosis behandelten Tiere signifikant von den nicht behandelten. Dies gilt für 5 FU ebenso wie für Gemcitabin. Unter der Behandlung mit Gemcitabin unterscheidet sich außerdem die Behandlungsgruppe ULD bezüglich der TumorgroÙe signifikant von den nicht behandelten Tieren. Des Weiteren zeigt die Abb. 3.1.1 eine vergleichbar geringe TumorgroÙe der sehr niedrig dosierten Behandlungsgruppen (ULD) mit der viel höher dosierten therapeutischen Dosierung (TD). Dieses Ergebnis konnte unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin erzielt werden. Hinsichtlich dieser Beobachtung ist es von großem Interesse, eine Erklärung für die geringe TumorgroÙe der ULD zu finden. Außerdem stellt sich die Frage, welche immunmodulatorischen Auswirkungen die metronomische Chemotherapie hat und ob diese Therapie damit für das positive Ergebnis der

geringen Tumorgröße maßgeblich war. Dazu wurden weitere Experimente durchgeführt, die auf den folgenden Seiten dargestellt und erläutert werden.

Unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin konnten weniger Colon- und Peritonealmetastasen nachgewiesen werden, wie die Abb. 3.1.2 deutlich veranschaulicht (nicht signifikant). Die Metastasierungsrate, der mit metronomischer Chemotherapie behandelten Tiere (LD, ULD), entsprach der therapeutischen Dosierung (TD). Dies traf für die Behandlung mit 5 FU (Colon- und Peritonealmetastasen) und die Peritonealmetastasen unter der Behandlung mit Gemcitabin zu. Die Metastasierungsrate der Colonmetastasen, unter der Behandlung mit Gemcitabin, nahm mit sinkender Dosierung des Chemotherapeutikums ab. Die wenigsten Metastasen wurden bei den Tieren, die mit ULD Gemcitabin behandelt wurden, gefunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die metronomische Chemotherapie, sowohl auf die Tumorgröße als auch auf die Metastasierungsrate, positiv zu Gunsten der tumortragenden Mäuse auswirkt. Das Tumolvolumen ist unter der TD, LD und ULD Behandlung kleiner als ohne Behandlung bzw. unter ULD Therapie ähnlich groß wie unter TD. Die Metastasierungsrate nimmt unter der Behandlung mit Chemotherapie ab und ist genauso gering wie unter TD oder sogar geringer (ULD Gemcitabin). Nur unter der Gabe von LD Gemcitabin konnten geringfügig mehr Peritonealmetastasen als unter der Therapie mit TD gefunden werden.

3.2 Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest der Milzzellen gesunder Mäuse nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vitro (MTT)

Um die Auswirkung der Behandlung mit der konventionellen und metronomischen Chemotherapie auf die Zellviabilität der Milzzellen zu testen, wurden die Zellen in vitro mit einem schwach gefärbten oder farblosen Tetrazoliumsalz behandelt. Der Farbumschlag ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Durch die metabolische Aktivität der lebenden Zellen werden die Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt. Somit kann der Anteil der lebenden Zellen der Behandlungsgruppen mit dem Anteil der nicht behandelten Kontrollen gemessen und danach verglichen werden. Die Behandlung der Milzzellen mit den Chemotherapeutika erfolgte in drei unterschiedlichen Dosierungen und entsprach damit den Konzentrationen der durchgeführten in vitro Experimente im Rahmen dieser Dissertation. Die Durchführung dieses Experiments ist im Abschnitt 2.2.9 MTT-Test näher beschrieben.

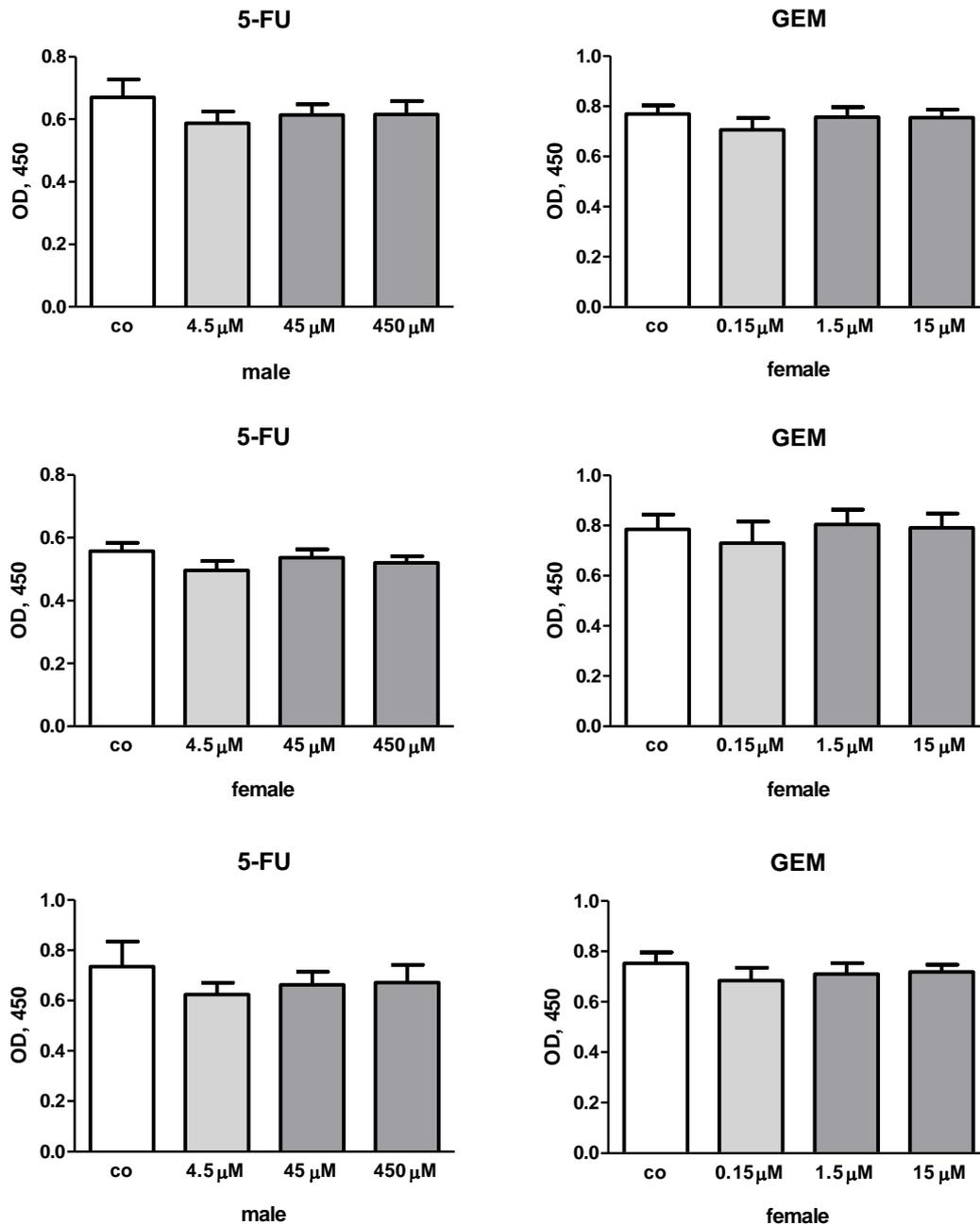


Abb. 3.2.1 Geschlechtsspezifischer Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest der Milzzellen gesunder Mäuse nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=4 pro Gruppe; 2w, 2m).

Die Ergebnisse des Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest zeigen, dass die Behandlung der Milzzellen gesunder Mäuse mit konventioneller oder metronomischer Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin keinen bedeutenden Einfluss auf die Zellviabilität hat. Das Geschlecht hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das Ergebnis der MTT-Tests. Im Rahmen der Experimente zur Zytotoxizität der NK- und CD8⁺-T-Zellen wurde ebenfalls auf geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht und der vorliegende MTT-Test als Referenz herangezogen.

3.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen und den Tumoren von tumortragenden Mäusen, nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin (in vivo)

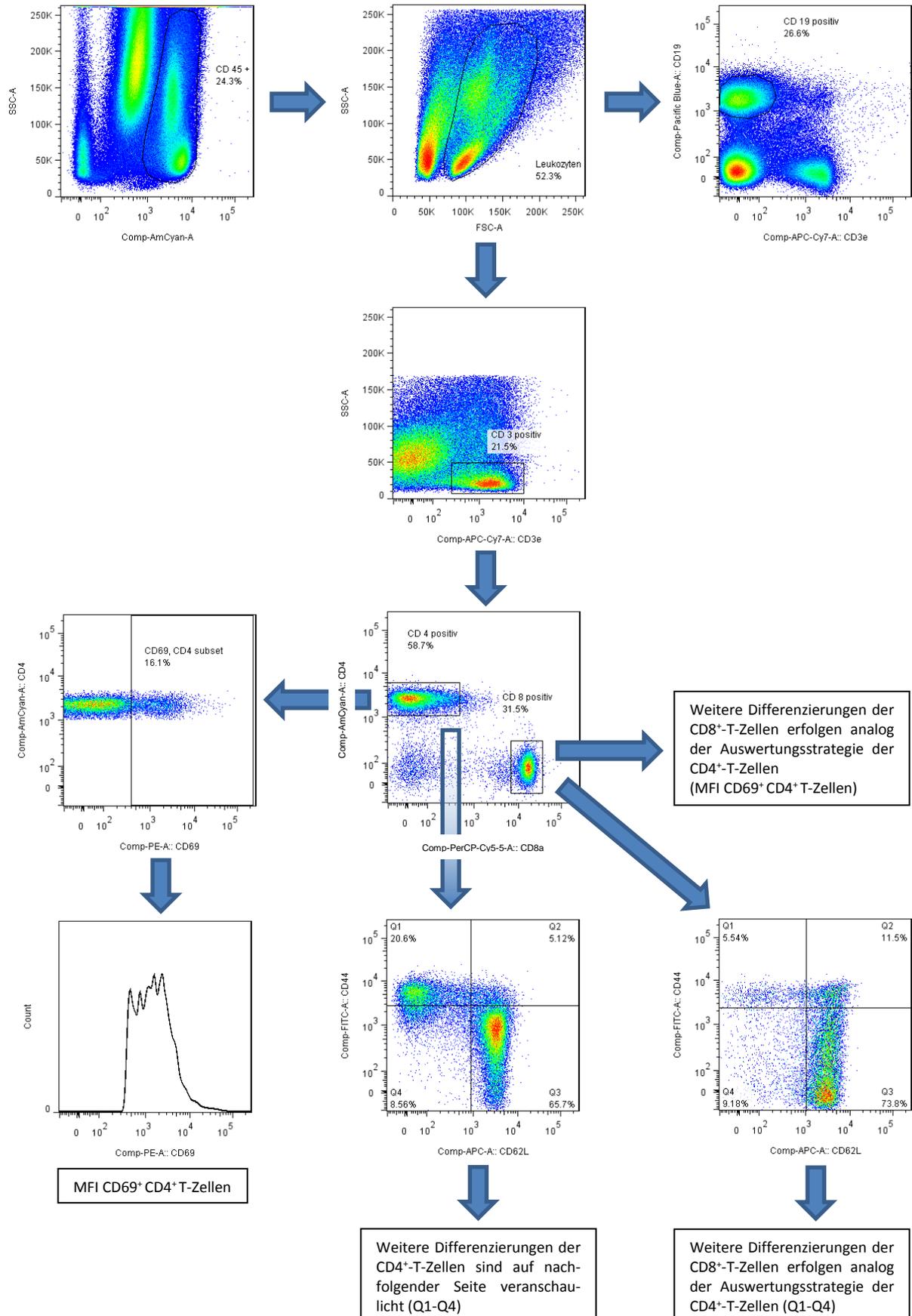
Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, die **immunmodulatorische Wirkung von 5 FU und Gemcitabin im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms** zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Untersuchung der immunologischen Parameter in Bezug auf die **therapeutisch (TD) verabreichte Chemotherapie (konventionelle Chemotherapie) im Vergleich zu der niedrig (LD) und sehr niedrig (ULD) dosierten Chemotherapie (metronomische Chemotherapie)**. Zur Kontrolle (co) wurden jeweils nicht behandelte Tiere untersucht.

Im Alter von 8 Wochen wurden den Mäusen die Pankreaskarzinomzellen der syngenen Linie Panc02 orthotop implantiert. Die Tiere der in vivo Experimente wurden je nach Behandlungsgruppe mit therapeutisch, niedrig oder sehr niedrig dosierter Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin therapiert. Nach 28 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Milzen und Primärtumoren entnommen. Die Herstellung der Einzelzellsuspensionen und die Behandlung der Milz- und Tumorzellen (Tils) mit den jeweiligen Konzentrationen der Standard-Chemotherapeutika erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Nach 24h Inkubation der Zellkulturen wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Das weitere Vorgehen und die Markierung der Zellen wurde gemäß dem Protokoll zur durchflusszytometrischen Bestimmung durchgeführt (Kapitel 2.2.4, 2.2.5.2 und 2.2.5.3). Danach wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert und mit Hilfe der Software FlowJo ausgewertet.

Die Ermittlung der einzelnen Zellpopulationen wurde systematisch in unterschiedlichen Untersuchungsgruppen durchgeführt und dargestellt.

Die Abb. 3.3.1.1-3.3.4.1 zeigen beispielhaft die einzelnen Auswertungsschritte und die Ermittlung der jeweiligen Subpopulationen. Abb. 3.3.1.1 zeigt die durchflusszytometrische Bestimmung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und deren Subpopulationen. Abb. 3.3.2.1 veranschaulicht die NK- und NKT-Zellen, CD4⁺-T-Zellen und deren Subpopulationen. In Abb. 3.3.3.1 werden die Makrophagen ebenso wie die MDSC illustriert. Abb. 3.3.4.1 zeigt die DZ und ihre Subpopulationen. Werden Tumorzellen untersucht, beinhaltet der erste Auswertungsschritt die Separation der CD45⁺-Zellen von den CD45⁻-Zellen. Aus den CD45⁺-Zellen wird im nächsten Schritt die Leukozyten-/Lymphozytenpopulation bestimmt. Bei der Auswertung der Milzzellen ist keine Differenzierung zwischen Tils und Tumorzellen nötig, daher beginnt die Auswertung mit der Leukozytenpopulation.

3.3.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen mittels FlowJo-Software



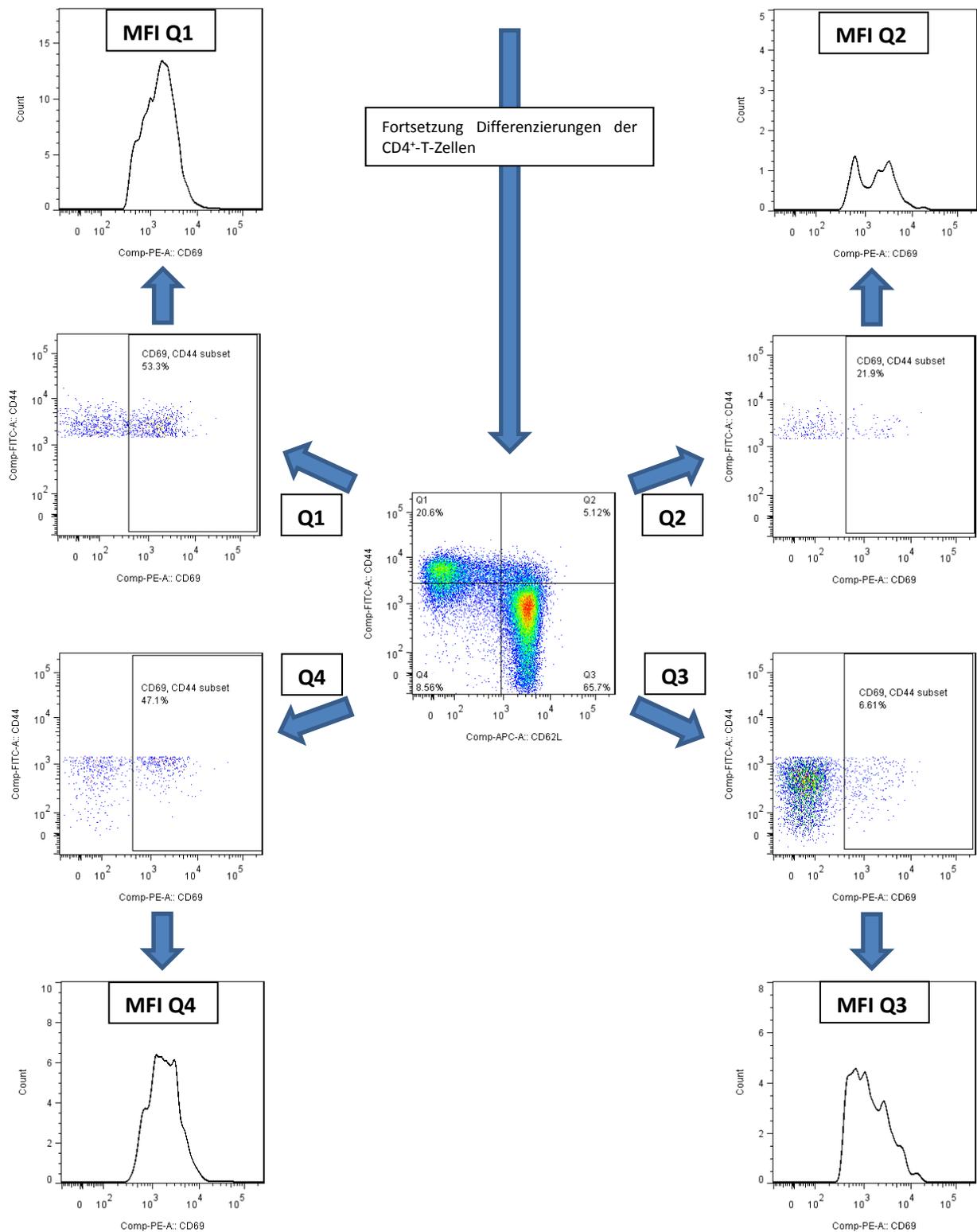


Abb. 3.3.1.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software. Mit Hilfe des CD45⁺ Markers wurden die Tumorzellen von den Leukozyten getrennt und danach auf lebende Leukozyten selektiert. Danach wurden die CD3⁺-Zellen ermittelt und weiter in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterteilt. Daraufhin folgte jeweils die weitere Analyse ihrer Subpopulationen in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (Q1), Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen (Q2), naive T-Zellen (Q3) und Effektor-T-Zellen (Q4). Die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean fluorescence intensity, MFI) wurde aus der CD69⁺-Zellpopulation (Aktivierungsmarker der T-Zellen) der jeweiligen T-Zellsubpopulation bestimmt.

3.3.2 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4⁺-T-Zell Subpopulationen und NK-Zellen mittels FlowJo-Software

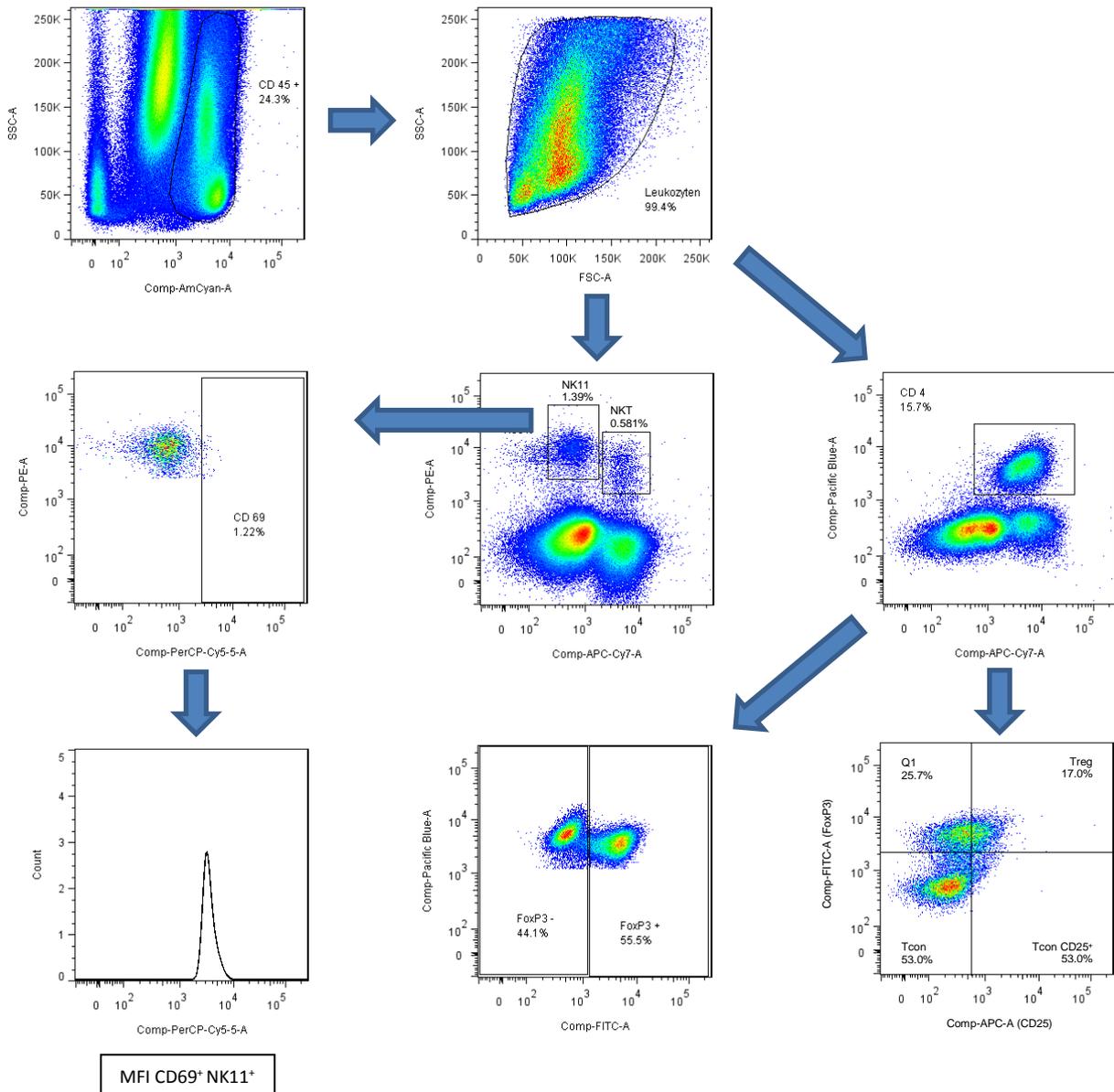


Abb. 3.3.2.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4⁺-T-Zell Subpopulationen, sowie der NK- und NKT-Zellen aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software. Anhand des Markers CD45⁺ wurden die Tumorzellen von den Leukozyten getrennt und anschließend mittels CD3 die CD4⁺-T-Zellen betrachtet. Danach erfolgte die weitere Analyse der CD4⁺-T-Zellen mit FoxP3 und CD25 auf die Treg-Subpopulation. Die Leukozyten wurden weiter auf ihre Subpopulationen mit Hilfe der Antikörper NKT und NK11 untersucht. Die MFI wurde aus der CD69⁺-Population der NK11⁺-Zellen bestimmt.

3.3.3 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Makrophagen und MDSC mittels FlowJo-Software

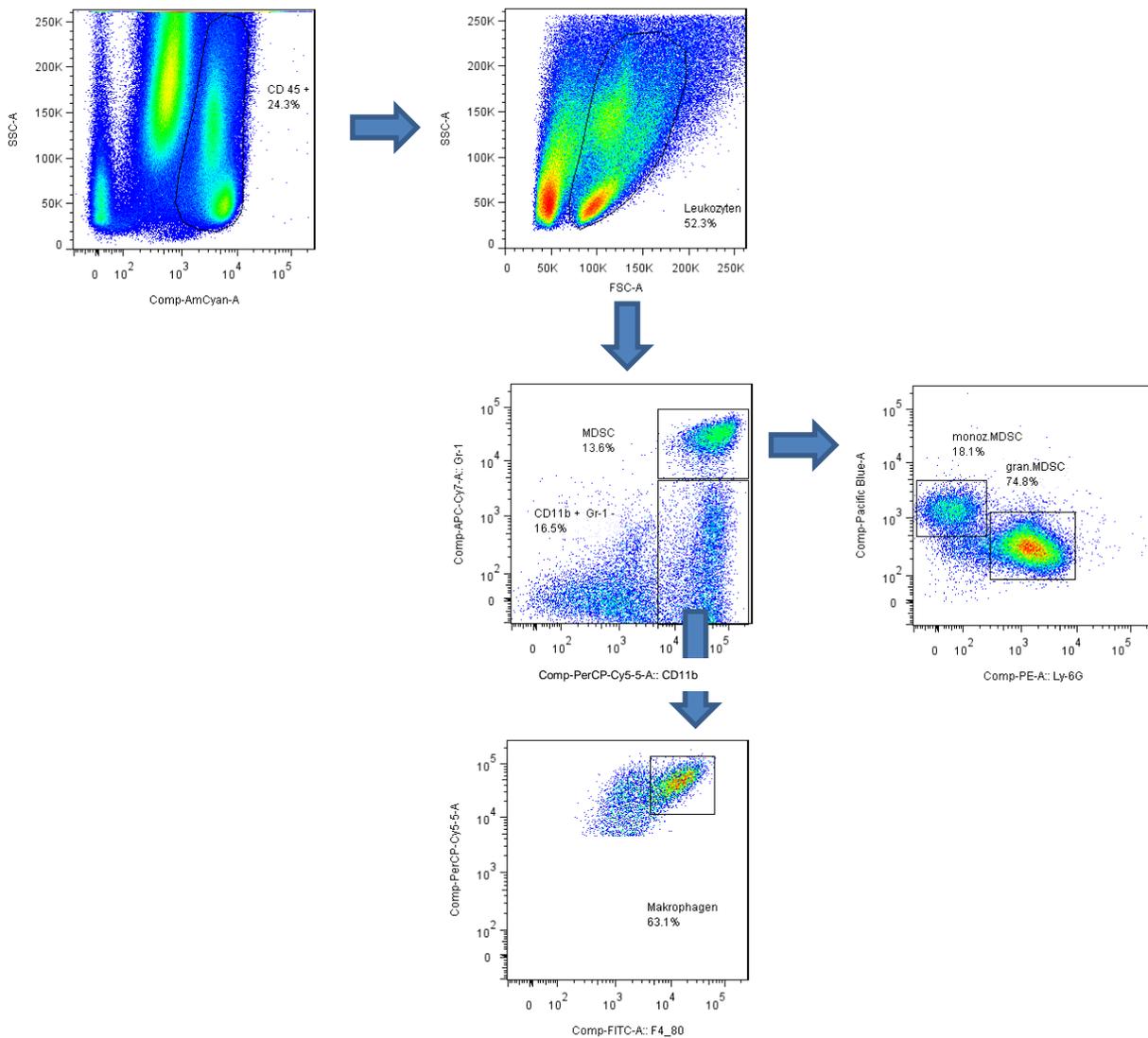
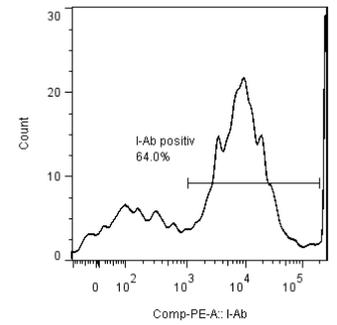
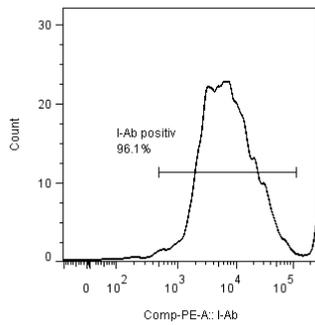
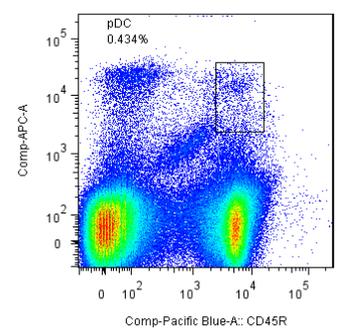
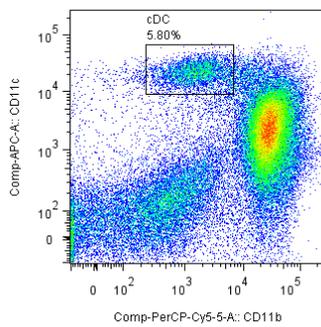
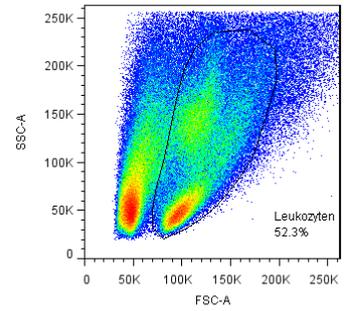
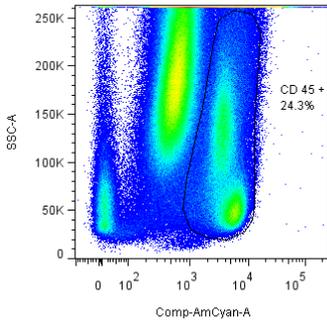


Abb. 3.3.3.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Makrophagen und MDSC aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software. Mit Hilfe des CD45⁺ Markers wurden die Tumorzellen von den Leukozyten getrennt und danach auf lebende Leukozyten selektiert. Danach wurden die Gr-1⁺CD11b⁺-Zellen sowie deren Subpopulationen (granulozytäre und monozytäre MDSC) bestimmt. Mit Hilfe des Markers F4/80 wurden die Makrophagen aus der CD11b⁺Gr-1⁻-Zellpopulation selektiert.

3.3.4 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der DZ-Zellen mittels

FlowJo-Software



Weitere Differenzierungen der cDC sind auf nachfolgender Seite veranschaulicht (CD80⁺ cDC, CD86⁺ cDC)

Weitere Differenzierungen der pDC sind auf nachfolgender Seite veranschaulicht (CD80⁺ pDC, CD86⁺ pDC)

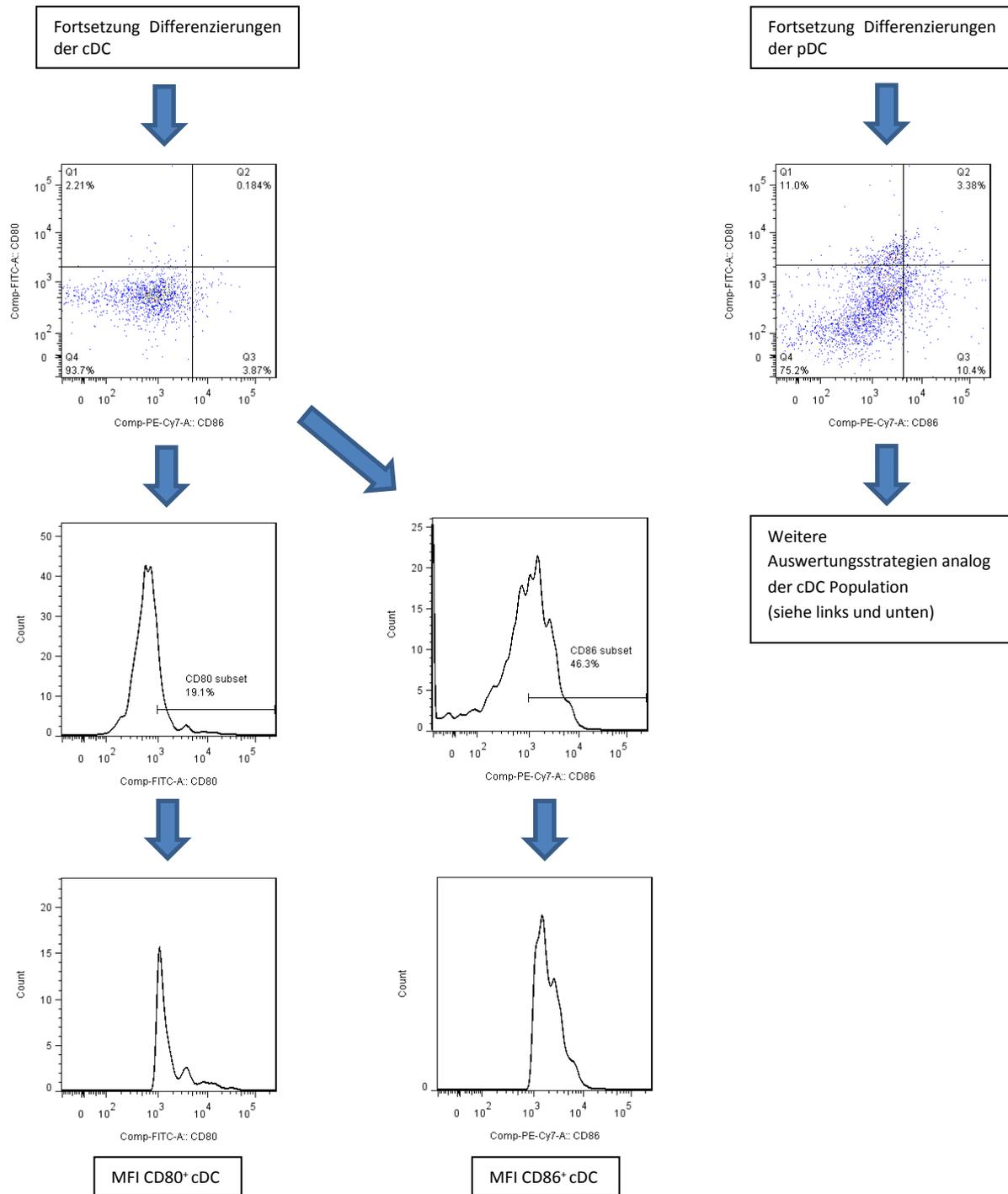


Abb. 3.3.4.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der DZ-Zellen aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software. Mit Hilfe des CD45⁺ Markers wurden die Tumorzellen von den Leukozyten getrennt und danach auf lebende Leukozyten selektiert. Danach wurde der Anteil der cDZ (myeloide DZ) und pDZ (plasmazytoide DZ) und die MFI der Reifungsmarker CD80 und CD86 bestimmt.

3.3.5 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU

3.3.5.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

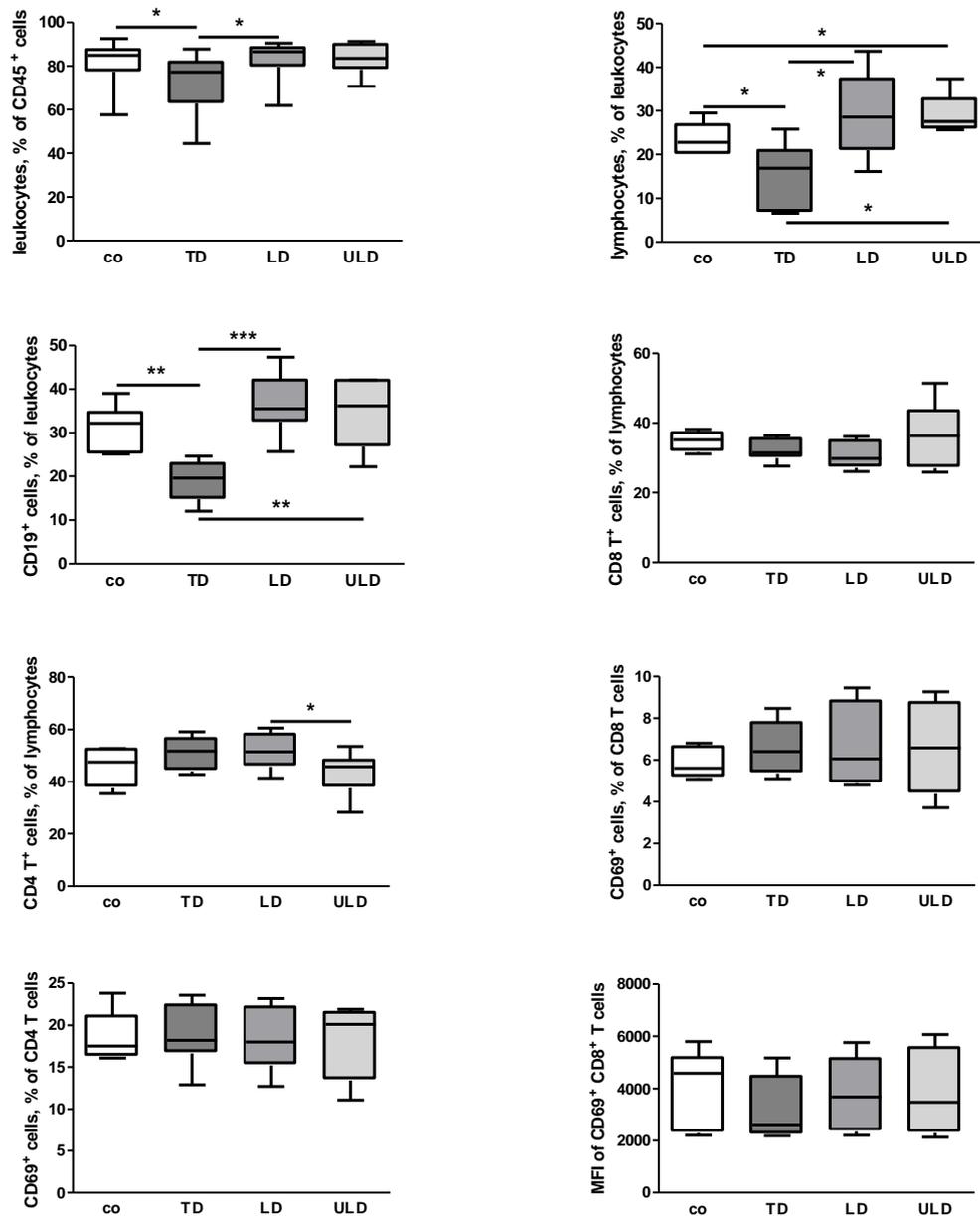


Abb. 3.3.5.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der B-Zellpopulationen, den T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

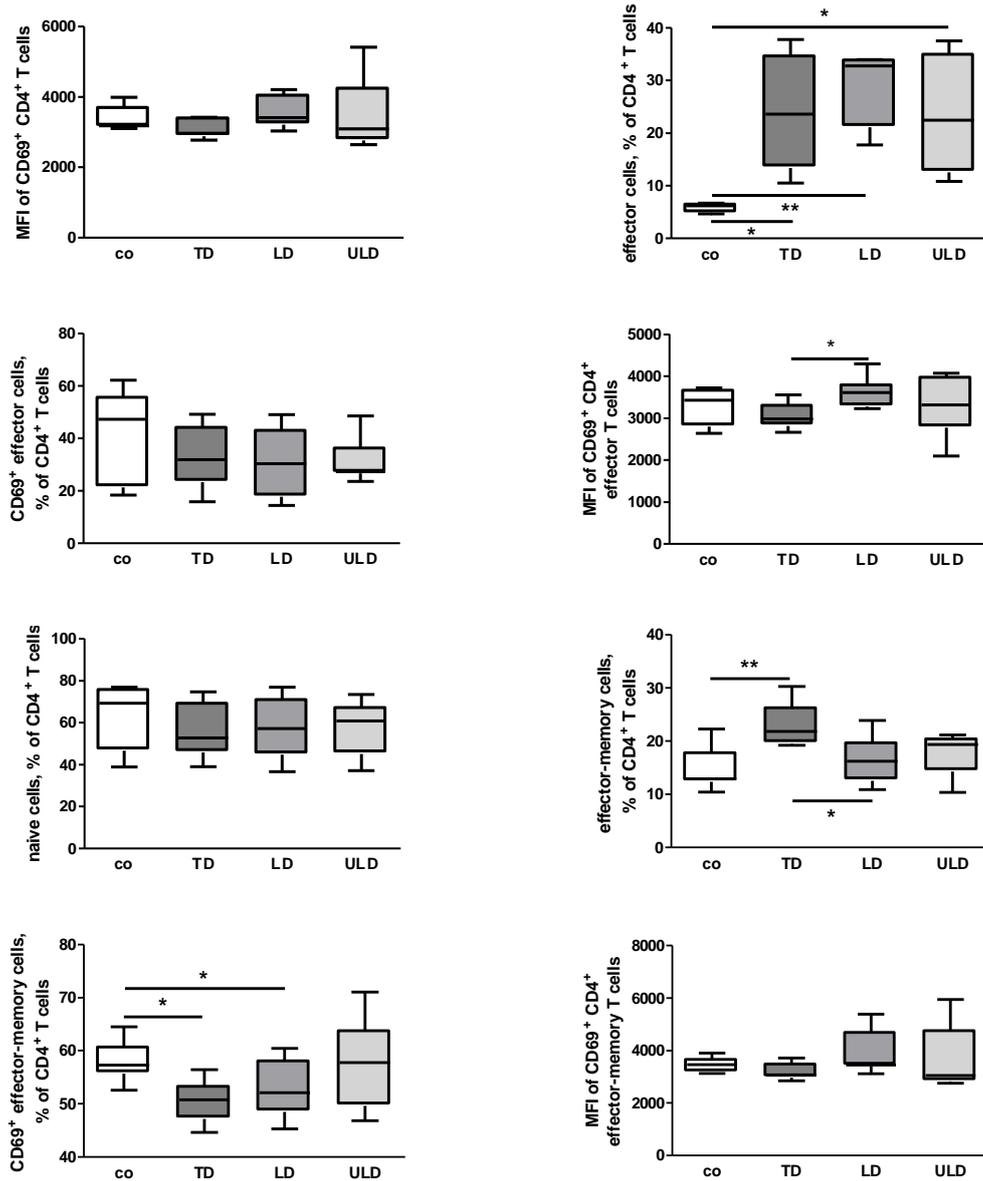


Abb. 3.3.5.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

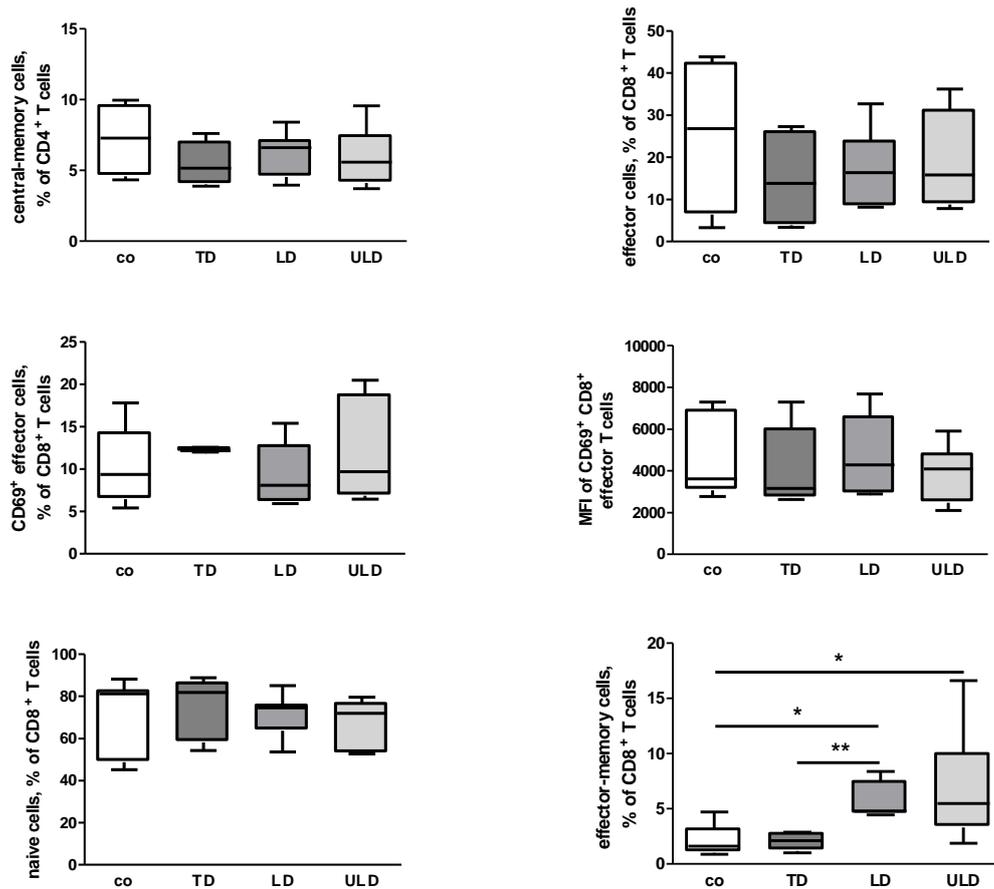


Abb. 3.3.5.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

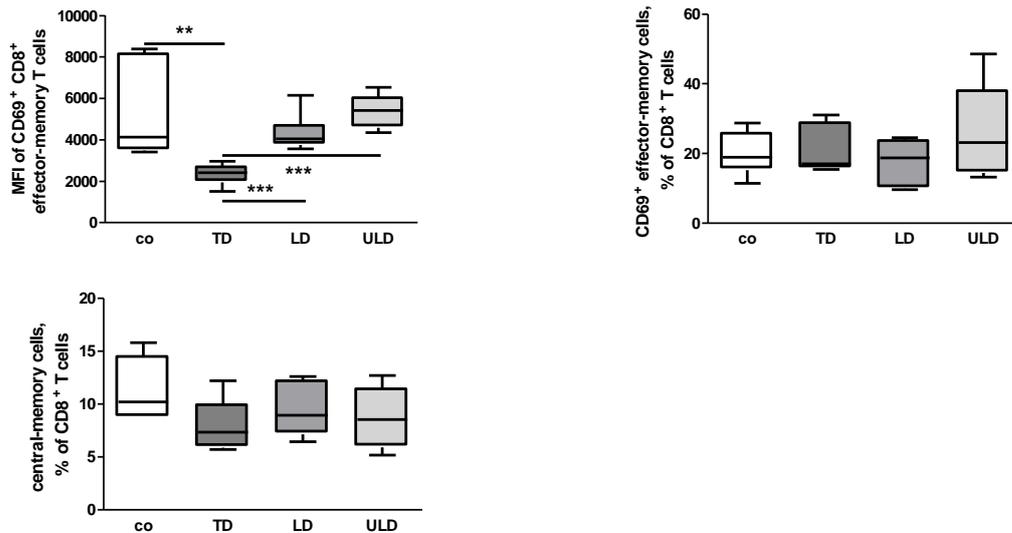


Abb. 3.3.5.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; **p<0,01).

Betrachtet man die in Abb. 3.3.5.1.1 dargestellten Zellpopulationen, lässt sich ein signifikanter Abfall der Leukozytenzahl unter der Behandlung mit TD im Vergleich zur LD und den Kontrollen erkennen. Des Weiteren ist die Anzahl der CD3⁺-Lymphozyten der TD gegenüber den Kontrollen, der LD und ULD signifikant erniedrigt. Außerdem ist die Anzahl der CD3⁺-Lymphozyten der ULD signifikant erhöht, verglichen mit den Kontrollen. Ein ähnliches Ergebnis liefern die Zahlen der CD19⁺-Zellen. Auch hier ist die Anzahl der CD19⁺-Zellen unter TD bei der Gegenüberstellung mit den Kontrollen, der LD und ULD, signifikant erniedrigt. Dagegen weisen die LD und ULD eine höhere Anzahl von CD19⁺-Zellen auf. Prozentual unterscheiden sich die verschiedenen Behandlungsgruppen und die Kontrollen in Bezug auf die CD8⁺-T-Zellen kaum. Unter der Behandlung mit ULD konnten im Vergleich zu TD und LD eine minimal höhere Anzahl dieser Zellen bestimmt werden. Bei der CD4⁺-T-Zellpopulation verhält es sich anders. Die Abbildung zeigt, dass die Behandlung unter LD signifikant mehr CD4⁺-T-Zellen aufweist als die ULD. TD und LD wiesen etwa gleich viele CD4⁺-T-Zellen auf. Die Auswertung der CD69⁺-Zellen der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, ebenso wie die MFI aus den jeweiligen Populationen, zeigt keine nennenswerte Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen und den unbehandelten Tieren.

Die T-Zell-Subpopulationen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse nach Verabreichung der therapeutischen, niedrigen und sehr niedrigen Konzentration von 5 FU in vivo werden in der Abb. 3.3.5.1.2 dargestellt. Die Anzahl der Effektor-T-Zellen (CD4⁺-T-Zellen) ist in allen

Behandlungsgruppen, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant erhöht. Unter LD 5 FU konnten dabei am meisten Effektor-T-Zellen dokumentiert werden. Die Menge der naiven T-Zellen (CD4⁺-T-Zellen) hingegen unterscheidet sich kaum. Prozentual ist der Anteil der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen unter der Behandlung mit 5 FU höher als in den Milzen der unbehandelten Tiere. Dabei ist die Zahl unter der TD Behandlung in Relation zu den Kontrollen und der LD signifikant erhöht. Hinsichtlich der Quantität des frühen Aktivierungsmarkers der T-Lymphozyten (CD69⁺-Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD4⁺-T-Zellen)) liefern die Kontrollen, verglichen mit der TD und LD, ein signifikant höheres Ergebnis. Die Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD4⁺-T-Zellen), die naiven T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) ebenso wie die Effektor-T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) unterscheiden sich zahlenmäßig kaum. Insgesamt sind etwas weniger Effektor-T-Zellen unter der Behandlung mit 5 FU als ohne Therapie nachzuweisen. Die Anzahl der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) der LD und ULD unterscheidet sich jedoch signifikant von den Kontrollen. Hierbei findet man einen signifikant höheren Anteil unter der Behandlung mit metronomischer Chemotherapie (LD, ULD). Diese Ergebnisse sind in Abb. 3.3.5.1.3 veranschaulicht. Die MFI der CD69⁺CD8⁺-T-Zellen spiegelt das Ergebnis wieder, indem die MFI unter der LD und ULD signifikant, im Vergleich zu der TD, erhöht ist. Die Kontrollen weisen in Bezug auf die TD ebenso eine signifikant höhere MFI auf. Numerisch gibt es kaum einen Unterschied in Bezug auf die Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen), wobei die TD den geringsten Anteil an dieser Zellpopulation aufweist (Abb. 3.3.5.1.4).

3.3.5.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

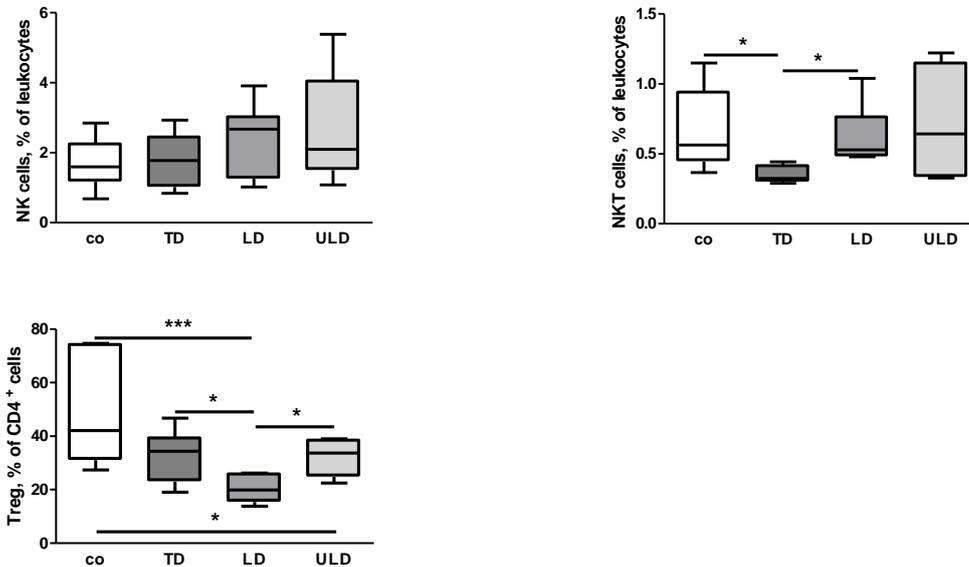


Abb. 3.3.5.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-, NKT- und Treg-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, ***p<0,001).

Abb. 3.3.5.2.1 zeigt eine ähnlich hohe Präsenz der NK-Zellen in den Behandlungsgruppen ebenso wie in den nicht behandelten Tieren. Der prozentuale Anteil der NKT-Zellen der TD ist, im Vergleich zu den Kontrollen und der LD, signifikant erniedrigt. Einen deutlichen Unterschied lässt sich auch in der Quantität der Treg feststellen. Hier zeigt sich eine signifikante Überlegenheit der Kontrollen im Vergleich zu LD und ULD. Die wenigsten Treg-Zellen konnte man unter der LD nachweisen, deren Anteil dieser Zellen signifikant geringer als bei der ULD und TD ausfällt.

3.3.5.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die MDSC und Makrophagen



Abb. 3.3.5.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b⁺Gr⁺-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; **p<0,01, ***p<0,001).

Eine weitere relevante Zellpopulation wird in der Abb. 3.3.5.3.1 dargestellt. Es handelt sich hierbei um die MDSC. Umso geringer dosiert 5 FU verabreicht wurde, umso weniger MDSC konnten in den Milzen der tumortragenden Mäuse nachgewiesen werden. Somit korreliert die Dosis des verabreichten Chemotherapeutikums negativ mit der Anzahl der MDSC. Die Kontrollen weisen eine signifikant höhere Anzahl an MDSC im Vergleich zu LD und ULD auf. Der Anteil der Zellen der TD ist ebenfalls signifikant, in Bezug auf die LD und ULD, erhöht. Somit wurde die geringste Menge MDSC unter der Behandlung mit LD und ULD nachgewiesen. Die Anzahl der Makrophagen unterscheidet sich kaum, wobei unter der TD am meisten Makrophagen aus den Milzen gewonnen wurden.

3.3.5.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die DZ

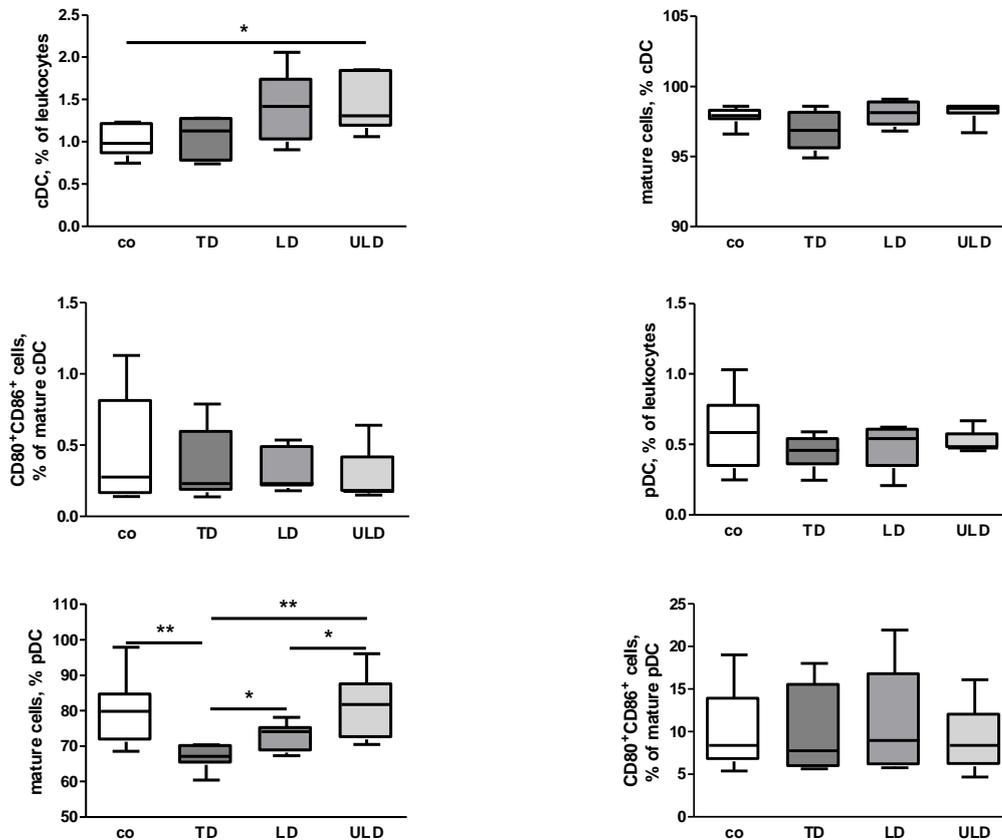


Abb. 3.3.5.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Betrachtet man die Subpopulationen der DZ, so lässt sich eine signifikante Erhöhung der Anzahl der cDZ unter ULD 5 FU, verglichen mit den unbehandelten Tieren, feststellen. Dabei weisen die LD und ULD den höchsten prozentualen Anteil auf. Auch die Zahl der ausgereiften cDZ ist in der LD und ULD Behandlungsgruppe höher als in der TD. Während sich der Anteil der pDZ in allen untersuchten Gruppen prozentual kaum unterscheidet, zeigt die TD bei der Gegenüberstellung mit den Kontrollen, der LD und ULD signifikant weniger ausgereifte pDZ. In den mit ULD behandelten Tieren konnten signifikant mehr reife pDZ gefunden werden als in den TD und LD. Bezüglich der Reifungsmarker (CD80⁺/CD86⁺) sind weder bei den cDZ noch bei den pDZ bedeutende Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen zu beobachten (Abb. 3.3.5.4.1). Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vivo Experiments (Milzzellen von tumortragenden Mäusen) festhalten, dass die Behandlung mit 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten	100	75	100	100
Lymphozyten	75	50	100	100
CD19	75	50	100	100
CD8				
CD4	75	100	100	75
Effektorzellen CD4	25	75	100	75
naive Zellen CD4				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4	50	100	50	75
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4				
Effektorzellen CD8				
naive Zellen CD8				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8	25	25	50	50
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8				
Treg	100	75	50	75
Tcon				
NK				
NKT	75	50	75	100
Makrophagen				
MDSC	100	50	25	25
gran. MDSC				
monozyt. MDSC				
cDZ	50	75	100	100
mature cDC				
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ				
pDZ				
mature pDC	100	50	75	100
CD80 mature pDZ				
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ				

Abb. 3.3.5.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, in vivo

In der Abb. 3.3.5.4.2 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.3.6 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin

3.3.6.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

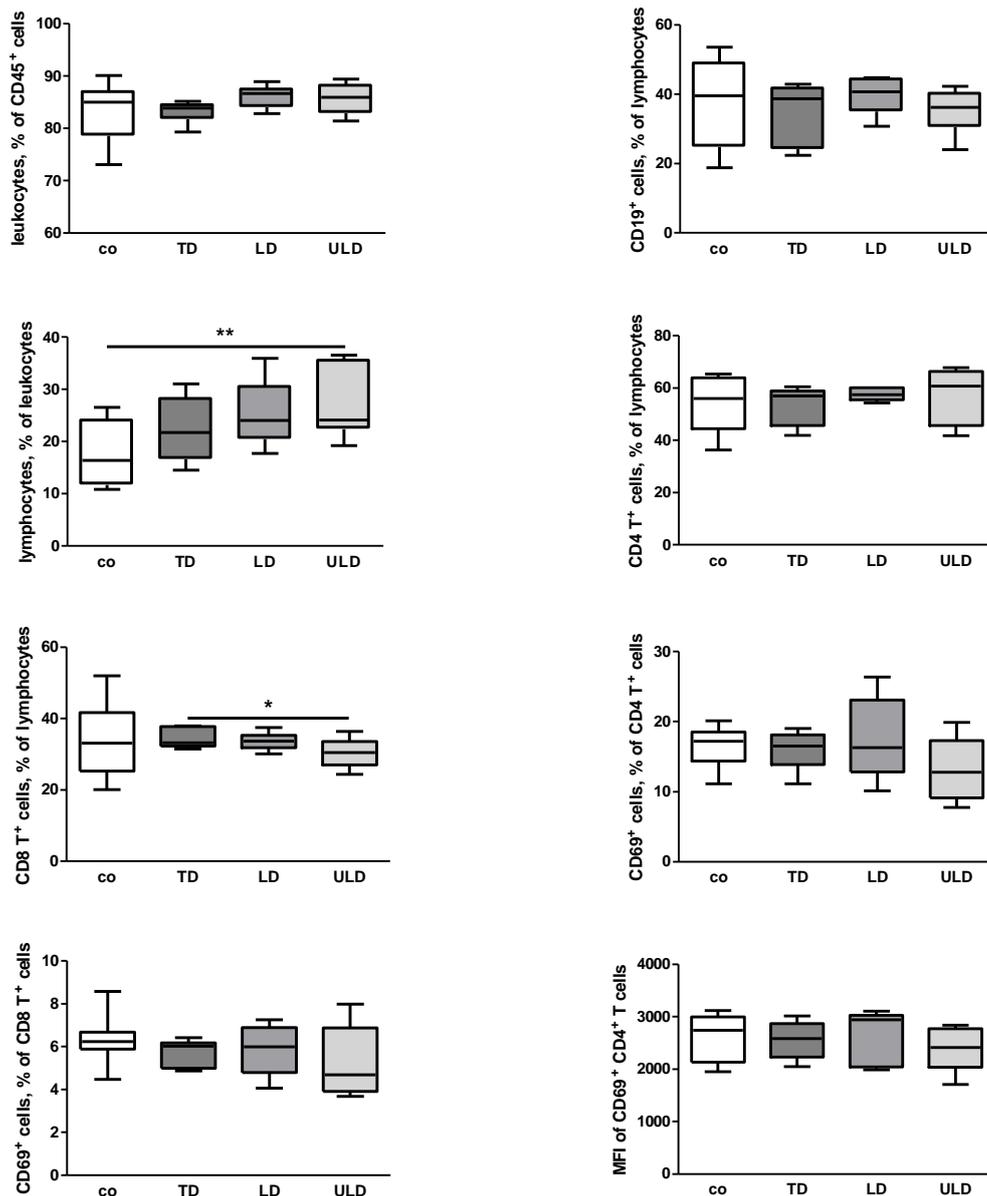


Abb. 3.3.6.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der B-Zellpopulationen, den T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

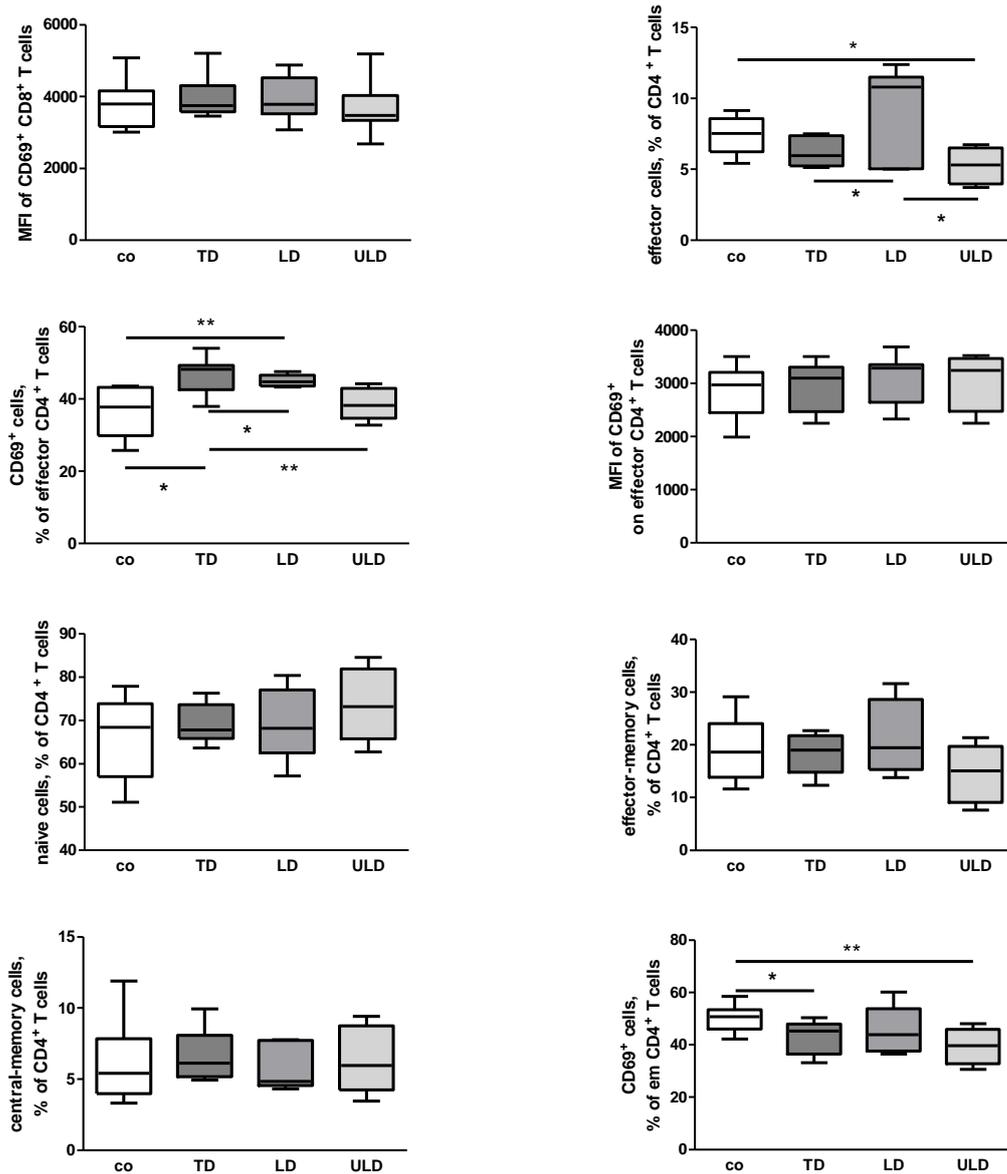


Abb. 3.3.6.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

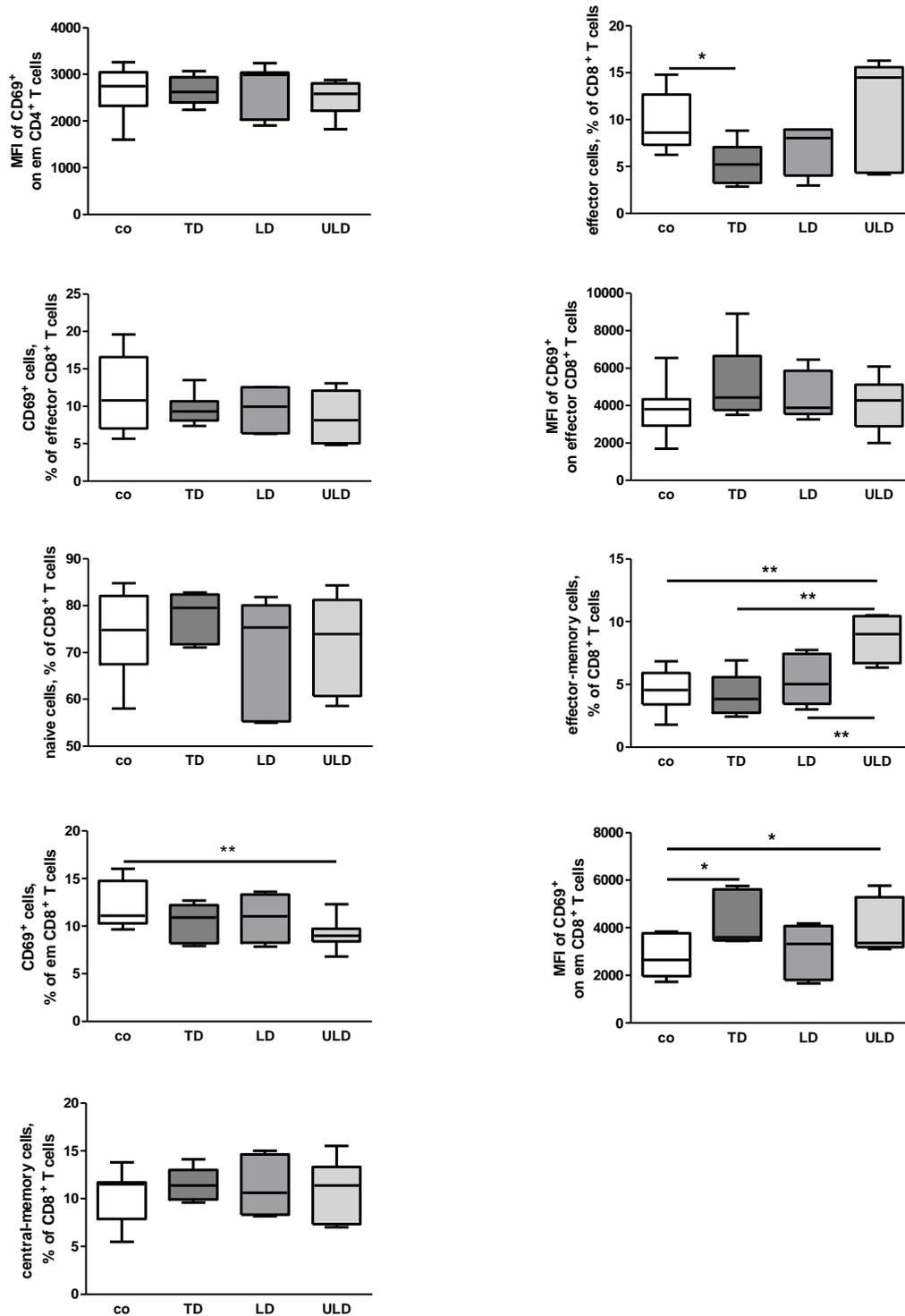


Abb. 3.3.6.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

Die in Abb. 3.3.6.1.1 veranschaulichten Ergebnisse des in vivo Experiments mit Gemcitabin zeigen einen Anstieg der Lymphozytenpopulationen aller Behandlungsgruppen im Vergleich zu den Kontrollen. Die meisten Lymphozyten lassen sich unter der Behandlung mit LD und ULD nachweisen. Unter ULD Gemcitabin konnten signifikant mehr Lymphozyten, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, dokumentiert werden. Quantitativ gibt es keine großen Differenzen in den Leukozytenpopulationen, den CD19⁺-Zellen und den CD4⁺-T-Zellen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und den Kontrollen. Prozentual gibt es unter der Behandlung mit ULD signifikant weniger CD8⁺-T-Zellen als unter TD. Des Weiteren ist die Anzahl der Aktivierungsmarker (CD69⁺) der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) unter TD und ULD, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant erniedrigt und die Aktivierungsmarker (CD69⁺) der Effektor-T-Zellen (CD4) unter der Behandlung mit TD und LD, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant erhöht. Der Anteil der Effektor-T-Zellen (CD4) ist unter der Behandlung mit LD Gemcitabin bei der Gegenüberstellung mit der TD und ULD signifikant erhöht. Unter ULD lässt sich ein minimaler Anstieg der Menge an naiven T-Zellen (CD4), im Vergleich mit den anderen Behandlungsgruppen, feststellen (Abb. 3.3.6.1.2). Die Effektor-T-Zellpopulation (CD8) ist unter der Behandlung mit ULD, im Vergleich zu LD und TD größer, jedoch ist der Anteil dieser Zellen unter der Therapie mit TD signifikant geringer, im Vergleich zu den Kontrollen. Prozentual lässt sich ein geringfügiger Anstieg der naiven T-Zellen (CD8) unter der Behandlung mit TD, verglichen mit den Kontrollen, LD und ULD nachweisen. Die Tiere, die mit ULD Gemcitabin behandelt wurden, wiesen signifikant mehr Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) auf als die mit TD und LD behandelten Tiere und die Kontrollen. Der Anteil der Aktivierungsmarker (CD69⁺) der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) ist unter der Behandlung mit ULD, im Vergleich zu den Kontrollen, signifikant erniedrigt. Die MFI der Aktivierungsmarker (CD69⁺) der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) ist unter der Behandlung mit TD und ULD signifikant erhöht, im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.3.6.1.3).

3.3.6.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

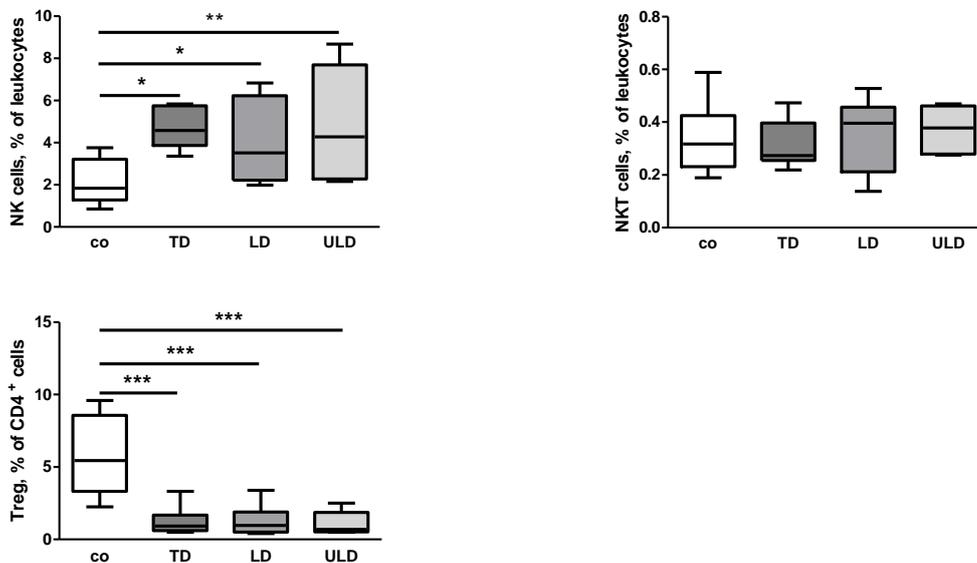


Abb. 3.3.6.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-Zellen, NKT-Zellen und Treg-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test ($n=9-12$ pro Gruppe; $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$).

Bei der Phänotypisierung der NK-, NKT- und Treg-Zellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse nach der Behandlung mit Gemcitabin kann man eine signifikante Erhöhung der Anzahl an NK-Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, beobachten. Die NKT-Zellpopulation weist kaum Unterschiede in der Anzahl auf, wobei ein geringer Anstieg unter der Behandlung mit LD und ULD bei der Gegenüberstellung mit den Kontrollen und der TD zu verzeichnen ist. Das Ergebnis der Treg-Zellpopulation hingegen führt zu einem eindeutigen Fazit: Unter der Behandlung (TD, LD, ULD) mit Gemcitabin sind, verglichen mit den Kontrollen, signifikant weniger Treg-Zellen nachzuweisen (Abb.3.3.6.2.1).

3.3.6.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die MDSC und Makrophagen

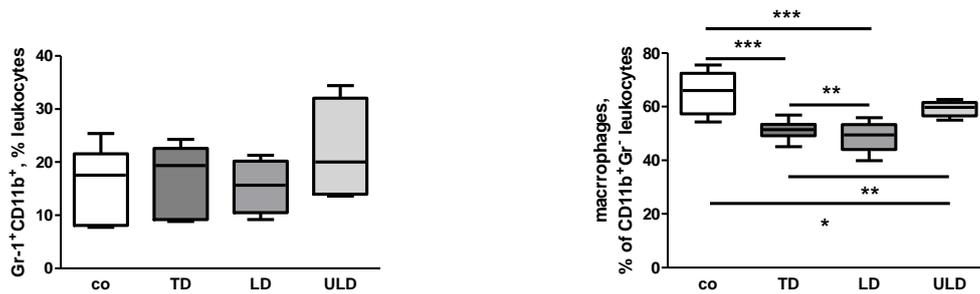


Abb. 3.3.6.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b⁺Gr⁺-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 3.3.6.3.1 lässt sich ein minimaler Anstieg der MDSC unter der Behandlung mit ULD Gemcitabin feststellen. Insgesamt unterscheidet sich jedoch die Anzahl, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit 5 FU (Abb. 3.3.5.3.1), kaum zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen und den Kontrollen. Die unbehandelten Tiere wiesen die größte Population der Makrophagen, verglichen mit den Behandlungsgruppen auf. Während unter Behandlung mit TD und LD die Anzahl annähernd gleich ist, zeigt sich unter der Behandlung mit ULD eine signifikante Erhöhung der Makrophagen im Vergleich zu TD.

3.3.6.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die DZ

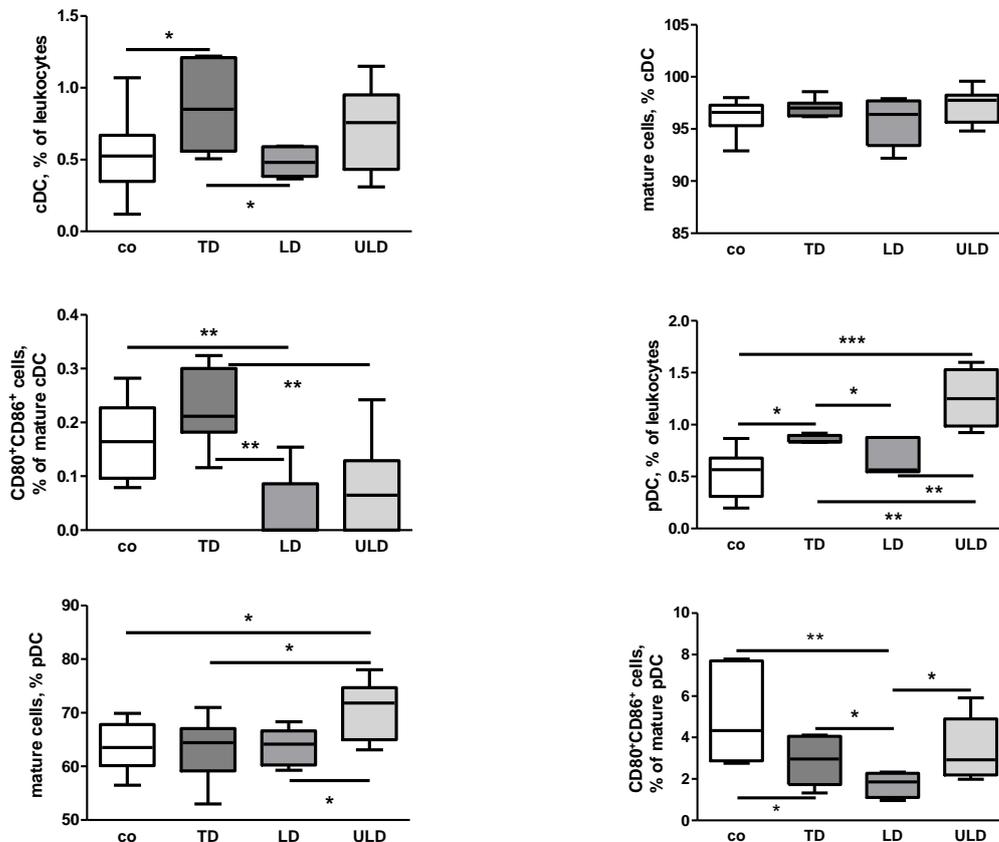


Abb. 3.3.6.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=9-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die Ergebnisse in Abb. 3.3.6.4.1 zeigen einen signifikanten Anstieg der Anzahl der cDZ unter der Behandlung mit TD im Vergleich mit den Kontrollen und der LD und einen minimalen Anstieg der Anzahl der cDZ unter der Behandlung mit ULD im Vergleich zu den Kontrollen und der LD. Die Behandlungsgruppen TD und ULD zeigen einen signifikanten Anstieg der pDZ im Vergleich zu den Kontrollen. Unter der Behandlung mit ULD lassen sich signifikant am meisten pDZ nachweisen. Ebenso ist die Anzahl der ausgereiften pDZ unter der Behandlung mit ULD, im Vergleich zu den Kontrollen, LD und TD, signifikant erhöht. Der prozentuale Anteil der Reifungsmarker (CD80⁺/CD86⁺) der ausgereiften pDZ ist unter der Behandlung mit TD und LD im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt, wobei der Anteil unter der Behandlung mit ULD und TD im Vergleich zu LD signifikant erhöht ist. Betrachtet man die Verteilung der Reifungsmarker der ausgereiften cDZ, kann man eine signifikante Erhöhung der Anzahl unter der Behandlung mit TD im Vergleich mit LD und ULD feststellen (Abb. 3.3.6.4.1).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vivo Experiments (Milzzellen von tumortragenden Mäusen) festhalten, dass die Behandlung mit Gemcitabin in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten				
Lymphozyten	50	75	100	100
CD19				
CD8	100	100	100	75
CD4				
Effektorzellen CD4	75	50	100	50
naïve Zellen CD4				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4				
Effektorzellen CD8	75	50	75	100
naïve Zellen CD8				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8	75	50	75	100
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8				
Treg	100	25	25	25
Tcon				
NK	25	100	75	100
NKT				
Makrophagen	100	50	50	75
MDSC				
gran. MDSC				
monozyt. MDSC				
cDZ	50	100	50	75
mature cDC				
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ	75	100	25	50
pDZ	50	75	50	100
mature pDC	75	75	75	100
CD80 mature pDZ				
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ	100	75	50	75

Abb. 3.3.6.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, in vivo

In der Abb. 3.3.6.4.2 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.3.7 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU

3.3.7.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

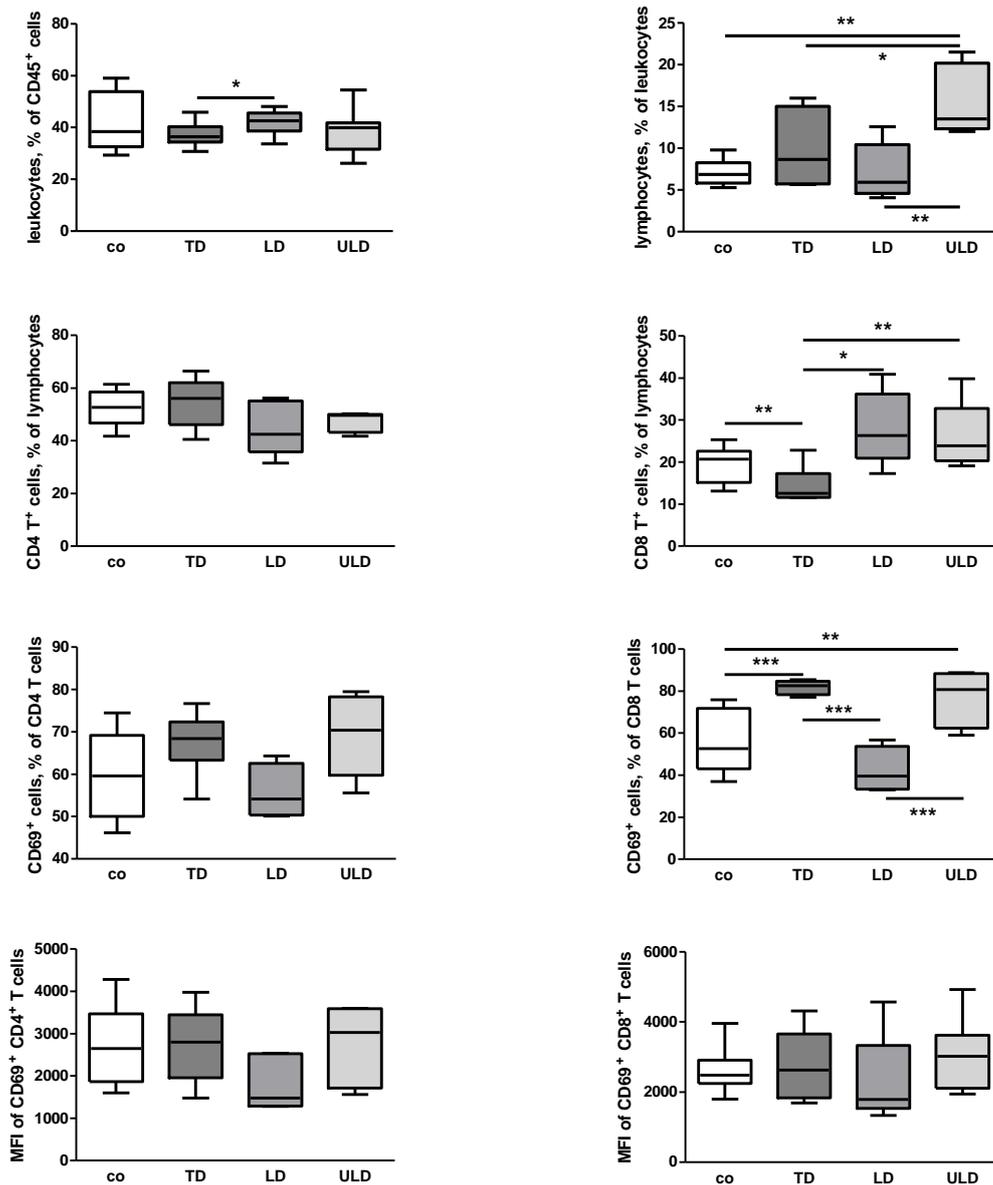


Abb. 3.3.7.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

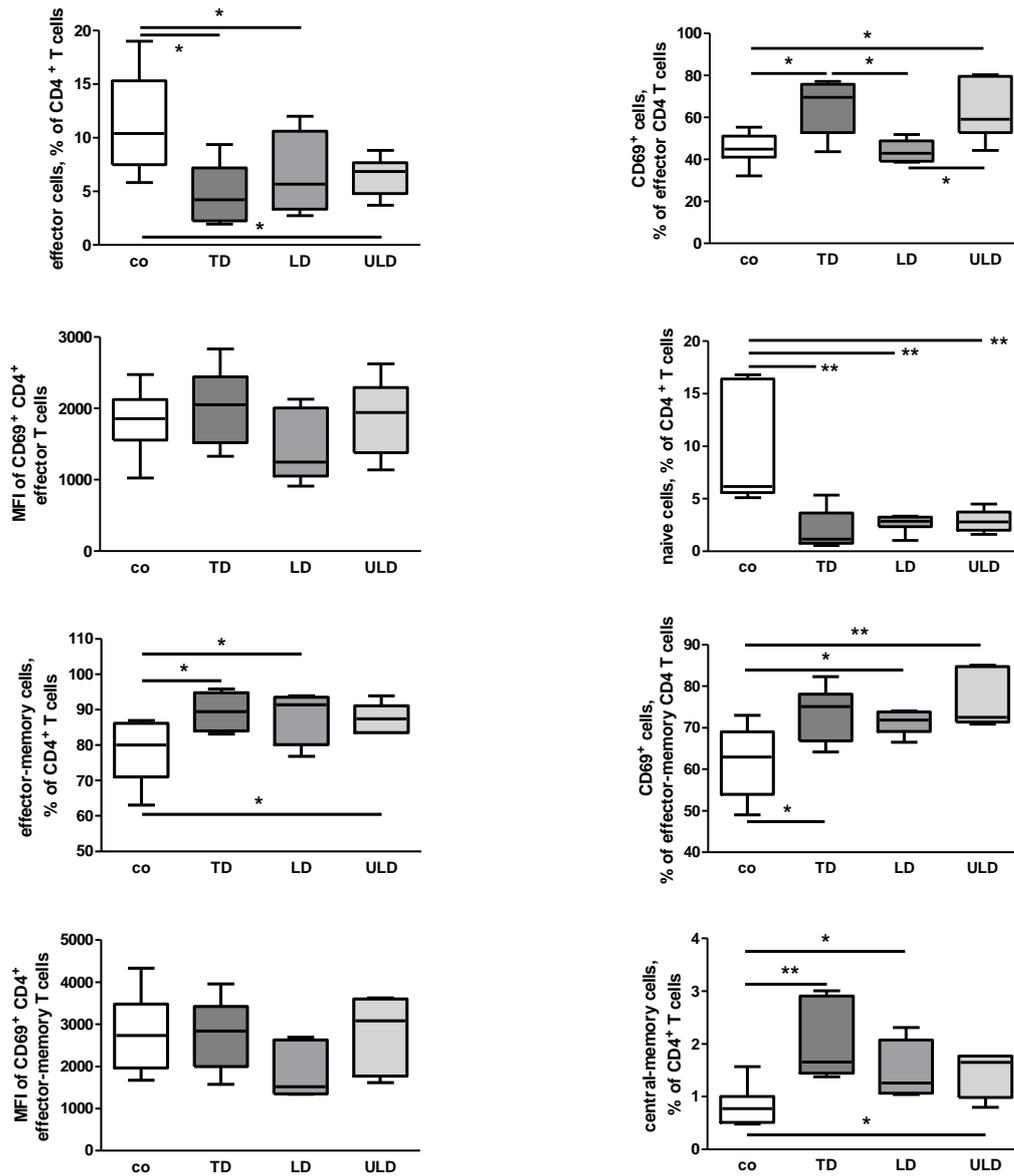


Abb. 3.3.7.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

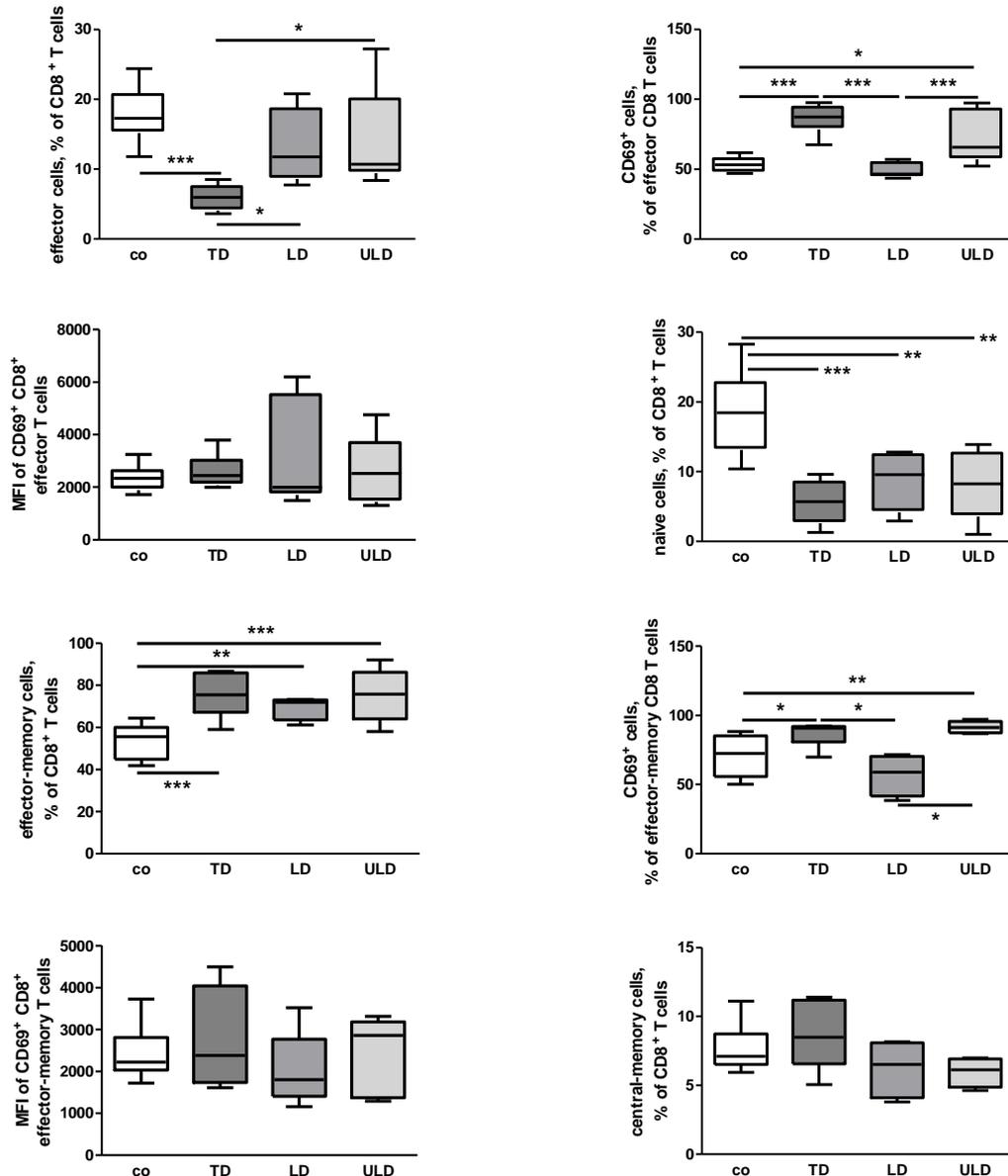


Abb. 3.3.7.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die Phänotypisierung der Immunzellen aus den Tumoren des in vivo Experiments mit 5 FU zeigt folgendes Ergebnis: Die Tumoren der mit LD 5 FU behandelten Mäuse hatten einen signifikant höheren Anteil an Leukozyten im Vergleich mit der TD. Auch die Anzahl der Lymphozyten unterschied sich deutlich. Dabei konnten unter der Behandlung mit ULD signifikant mehr Lymphozyten nachgewiesen werden als unter der Behandlung mit LD, TD und den Kontrollen. Während die Zellpopulationen der CD4⁺-T-Zellen keine signifikanten Unterschiede aufweisen, zeigt sich bei der Verteilung der CD8⁺-T-Zellen ein eindeutiges Ergebnis zu Gunsten der metronomischen

Chemotherapie. Hierbei finden sich signifikant mehr CD8⁺-T-Zellen in den Tumoren der LD und ULD behandelten Tiere als in denen mit TD behandelten. Im Vergleich mit den Kontrollen konnten in den TD Mäusen signifikant weniger CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der Aktivierungsmarker der CD8⁺-T-Zellen war unter der Behandlung mit TD und ULD bei der Gegenüberstellung mit LD und den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 3.3.7.1.1).

Betrachtet man die Anzahl der Effektor-T-Zellen (CD4) fällt auf, dass die Anzahl der Zellen unter der Behandlung mit TD und LD im Vergleich zu den unbehandelten signifikant erniedrigt ist. Unter der Behandlung mit TD sind signifikant mehr Aktivierungsmarker der Effektor-T-Zellen (CD4) im Vergleich zu den Kontrollen und der LD Behandlung im Tumor zu finden. Darüber hinaus liegt unter der Behandlung mit ULD ein signifikanter Anstieg der Aktivierungsmarker, verglichen mit den Ergebnissen der LD Therapie und den Kontrollen, vor. Zudem ist die Anzahl der naiven T-Zellen (CD4) unter der Behandlung mit TD, LD und ULD, verglichen mit den Kontrollen, signifikant erniedrigt. Bei der Quantifizierung der Lymphozyten lässt sich unter der Behandlung mit TD, LD und ULD eine signifikant höhere Anzahl von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) im Vergleich mit den Kontrollen nachweisen. Die Anzahl der Aktivierungsmarker der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) aus den Tumoren der behandelten Mäuse ist, in Relation zur Anzahl aus den Tumoren der nicht behandelten Tiere, signifikant erhöht. Ebenfalls ist der Anteil der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) aus den behandelten Tieren signifikant höher, im Vergleich mit den unbehandelten Tieren (Abb. 3.3.7.1.2).

Wie die Ergebnisse in Abb. 3.3.7.1.3 zeigen, hat die Behandlung mit 5 FU auch modulatorische Auswirkungen auf die Effektor-T-Zellen (CD8). Unter der Behandlung mit LD und ULD ist die Anzahl dieser Zellen im Vergleich zu TD signifikant erhöht. Den größten Teil der Effektor-T-Zellen (CD8) weisen jedoch die Kontrollen auf. Verglichen mit TD ist der prozentuale Anteil der Kontrollen signifikant erhöht. Betrachtet man die Auswirkung der Behandlung mit 5 FU auf die Immunzellen, so zeigt sich ein signifikant erhöhter Anteil an Aktivierungsmarker der Effektor-T-Zellen (CD8) unter der Behandlung mit TD im Vergleich zu LD und den Kontrollen. Die Menge der Zellen ist ebenso unter der Behandlung mit ULD signifikant erhöht, verglichen mit der Menge der Aktivierungsmarker, isoliert aus den Tumoren der unbehandelten oder mit LD behandelten Mäuse. Des Weiteren konnten signifikant weniger naive T-Zellen (CD8) unter der Behandlung (TD, LD, ULD) im Vergleich zu den Kontrollen identifiziert werden. Dabei ist die Zahl der Zellen unter LD und ULD etwas höher als unter TD. Zum anderen ist der prozentuale Anteil der Aktivierungsmarker der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen unter der Behandlung mit TD signifikant erhöht im Vergleich mit der Zellzahl unter der Behandlung mit LD oder den Kontrollen. Es liegen signifikant mehr Aktivierungsmarker dieser Zellen unter der Behandlung mit ULD im Vergleich zu LD und den Kontrollen vor. Ebenfalls ist die Anzahl der Effektor-

Gedächtnis-T-Zellen (CD8) unter der Behandlung mit TD bei der Gegenüberstellung mit den Kontrollen signifikant erhöht. Gleichmaßen verhält es sich unter der Behandlung mit LD und ULD. Die Anzahl der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ist, verglichen mit den Kontrollen, signifikant erhöht. ULD und TD zeigen hierbei eine ähnlich hohe Anzahl.

3.3.7.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

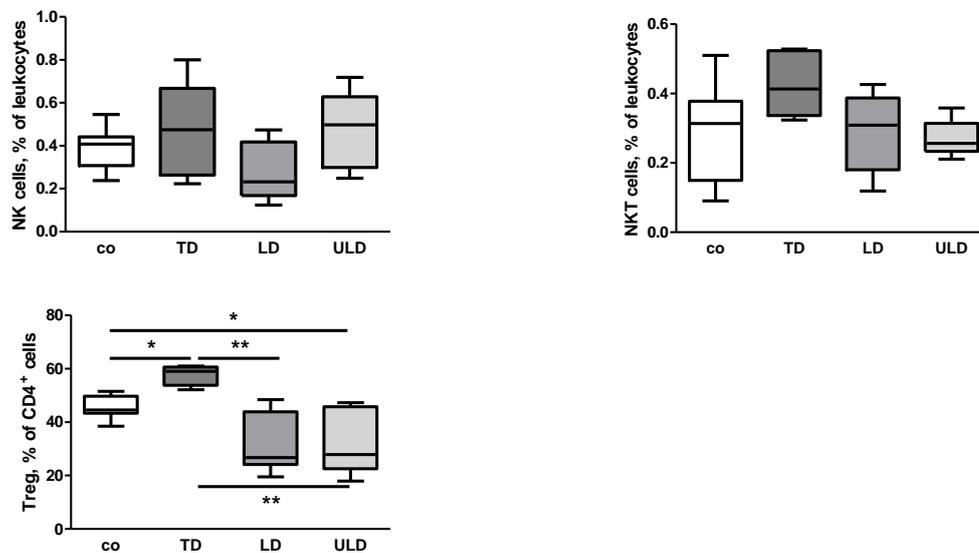


Abb. 3.3.7.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-Zellen, NKT-Zellen und Treg-Zellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

Abb. 3.3.7.2.1 zeigt unter LD weniger NK-Zellen als unter ULD, TD und den Kontrollen. Dabei ist die Anzahl unter der metronomischen Chemotherapie (ULD) genauso hoch wie unter der konventionellen Chemotherapie (TD). Im Hinblick auf die Anzahl der NKT-Zellen ist die TD der metronomischen Chemotherapie (LD, ULD) etwas überlegen. Des Weiteren sind unter der metronomischen Chemotherapie (LD, ULD), im Vergleich zu TD, signifikant weniger Treg nachzuweisen. Unter der Therapie mit TD konnten, verglichen mit LD, ULD und den Kontrollen, signifikant mehr Treg identifiziert werden. Im direkten Vergleich der Anzahl der Treg unter der ULD Behandlung mit 5 FU mit der Anzahl der Treg der unbehandelten Tiere, fällt das Ergebnis signifikant geringer zu Gunsten der ULD Behandlung aus.

3.3.7.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die MDSC und Makrophagen

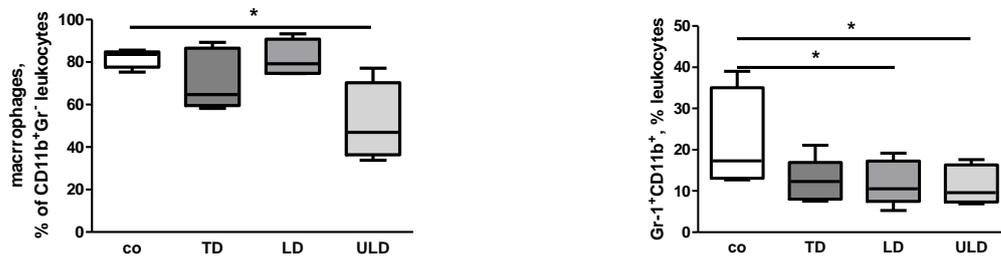


Abb. 3.3.7.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b⁺Gr⁻-Zellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05).

Die Untersuchungsergebnisse in Abb. 3.3.7.3.1 zeigen signifikant weniger Makrophagen unter der Behandlung mit ULD als bei den unbehandelten Tieren. Am meisten Makrophagen konnte man unter LD und den Kontrollen nachweisen. Im Hinblick auf die immunsuppressiven MDSC kann ein eindeutiges Fazit gezogen werden: Unter der Behandlung mit 5 FU (TD, LD, ULD) sind deutlich weniger MDSC, verglichen mit den unbehandelten Tieren, zu finden. Dabei ist der Anteil der MDSC unter der Behandlung mit LD und ULD signifikant geringer als in den Kontrollen.

3.3.7.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die DZ

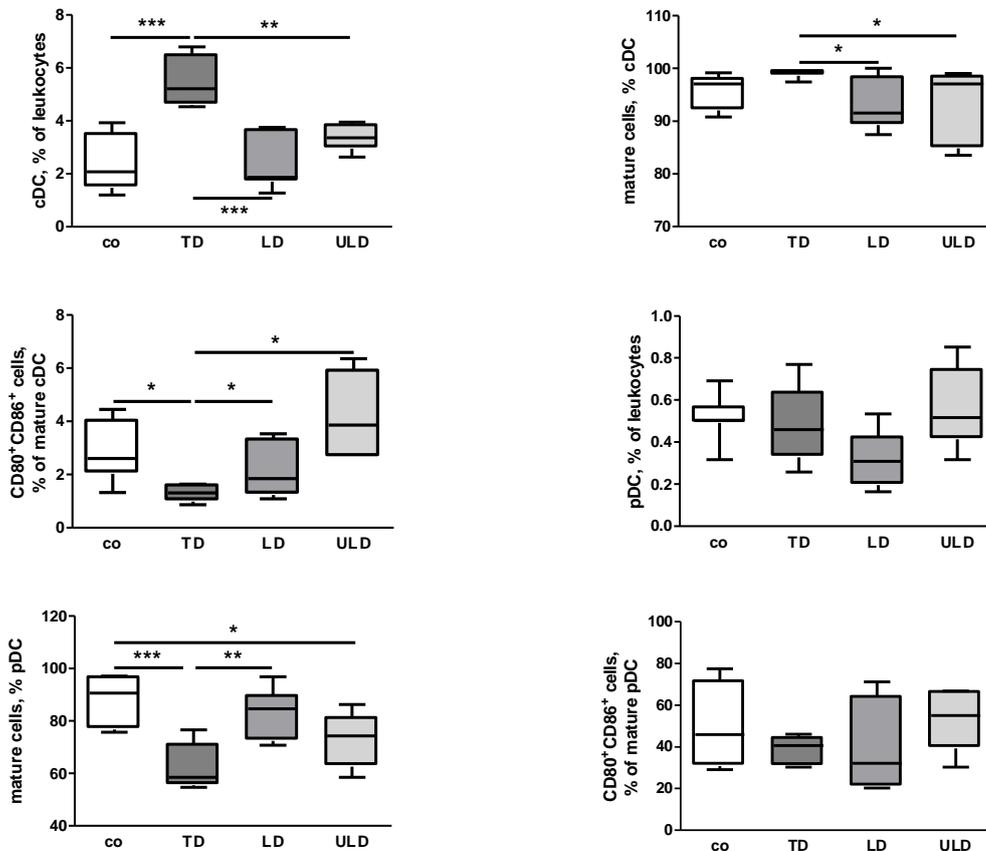


Abb. 3.3.7.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 3.3.7.4.1, sticht ein signifikanter Anstieg der cDZ unter der Therapie mit TD im Vergleich zu den Kontrollen und der Behandlung unter LD und ULD ins Auge. Ebenso zeigt sich bei der Gegenüberstellung mit LD und ULD ein signifikant höherer Anteil der ausgereiften cDZ unter der Behandlung mit TD. Der prozentuale Anteil der Reifungsmarker der cDZ zeigt wiederum ein anderes Ergebnis. Hierbei ist der Anteil der Reifungsmarker unter der Behandlung mit TD signifikant geringer als der Anteil unter LD, ULD und den Kontrollen. Dasselbe Ergebnis liefert die Untersuchung der reifen pDZ. Der Anteil der ausgereiften pDZ ist unter der Behandlung mit TD signifikant geringer, im Vergleich zu LD und den Kontrollen. Die Tiere, die mit ULD behandelt wurden, zeigten signifikant weniger ausgereifte pDZ, verglichen mit den unbehandelten Tieren. Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vivo Experiments (Tils von tumortragenden Mäusen) festhalten, dass die Behandlung mit 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten	75	50	100	75
Lymphozyten	50	75	50	100
CD19				
CD8	75	50	100	100
CD4				
Effektorzellen CD4	100	50	75	75
naïve Zellen CD4	100	25	50	50
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4	50	75	100	75
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4	50	100	75	100
Effektorzellen CD8	100	50	75	75
naïve Zellen CD8	100	25	50	50
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8	50	100	75	100
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8				
Treg	75	100	50	50
Tcon				
NK				
NKT				
Makrophagen	100	75	100	50
MDSC	100	75	50	50
gran. MDSC				
monozyt. MDSC				
cDZ	25	100	25	50
mature cDC	75	100	50	75
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ	75	25	50	100
pDZ				
mature pDC	100	25	75	50
CD80 mature pDZ				
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ				

Abb. 3.3.7.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse, in vivo

In der Abb. 3.3.7.4.2 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.3.8 In vivo Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin

3.3.8.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

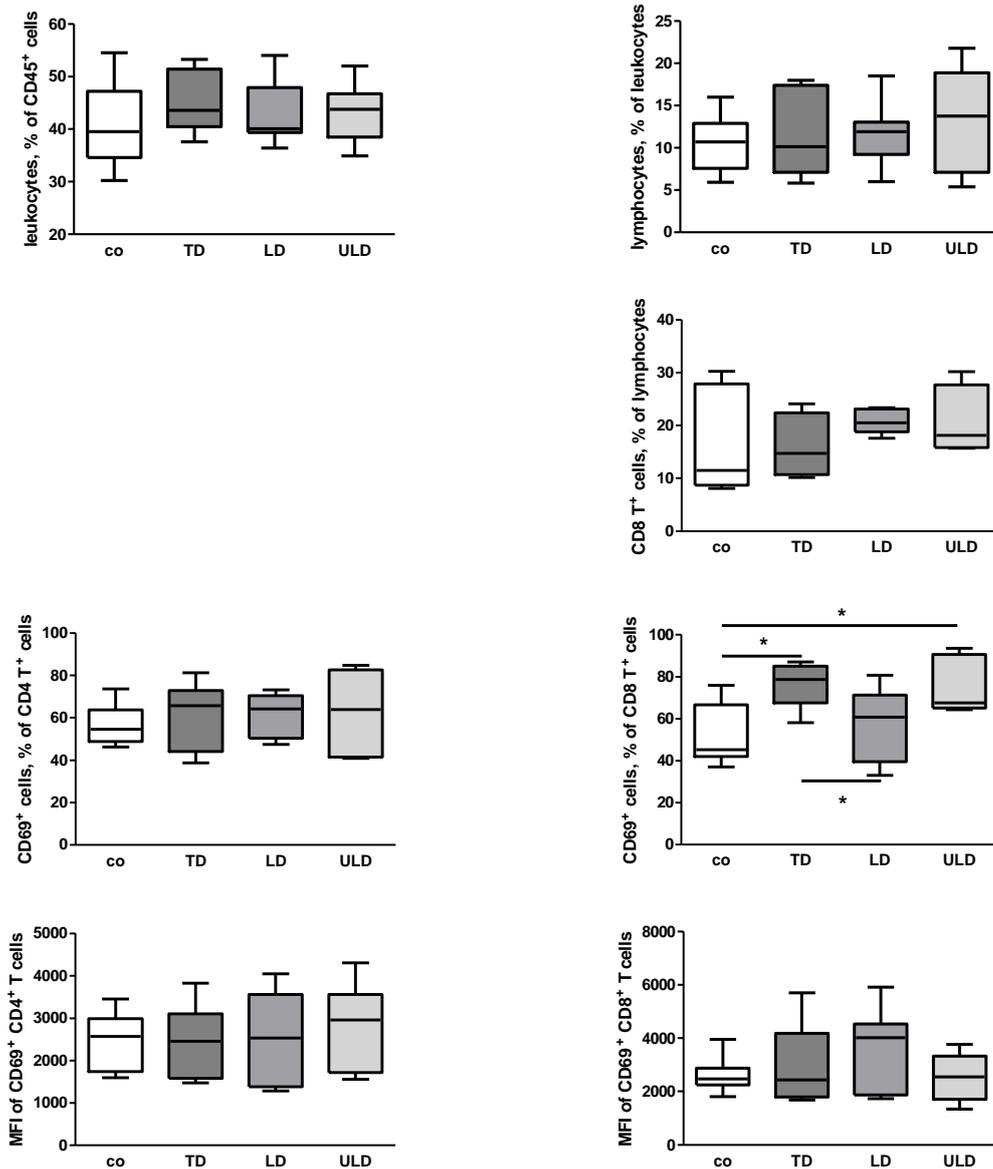


Abb. 3.3.8.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der B-Zellpopulationen, den T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05).

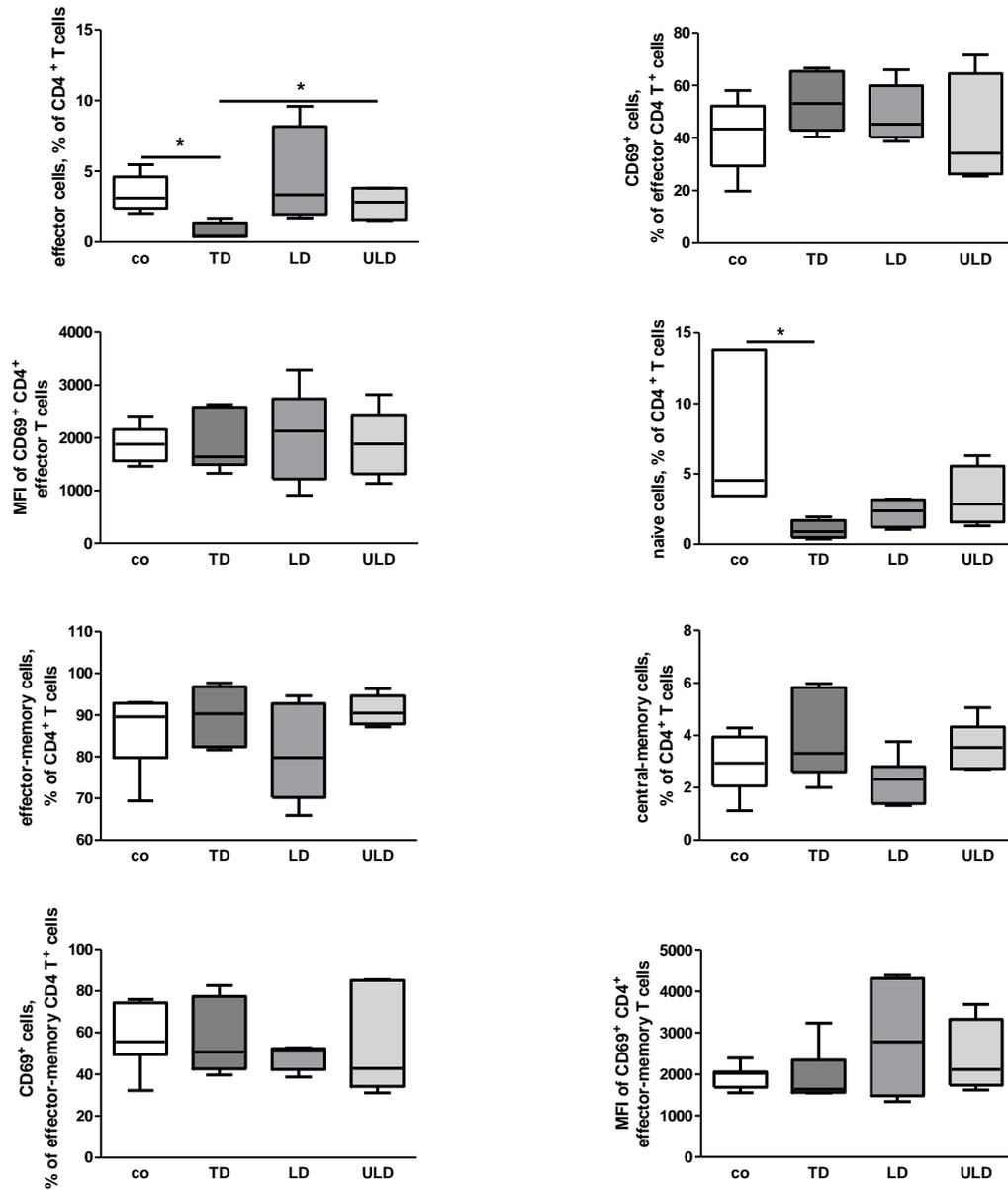


Abb. 3.3.8.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05).

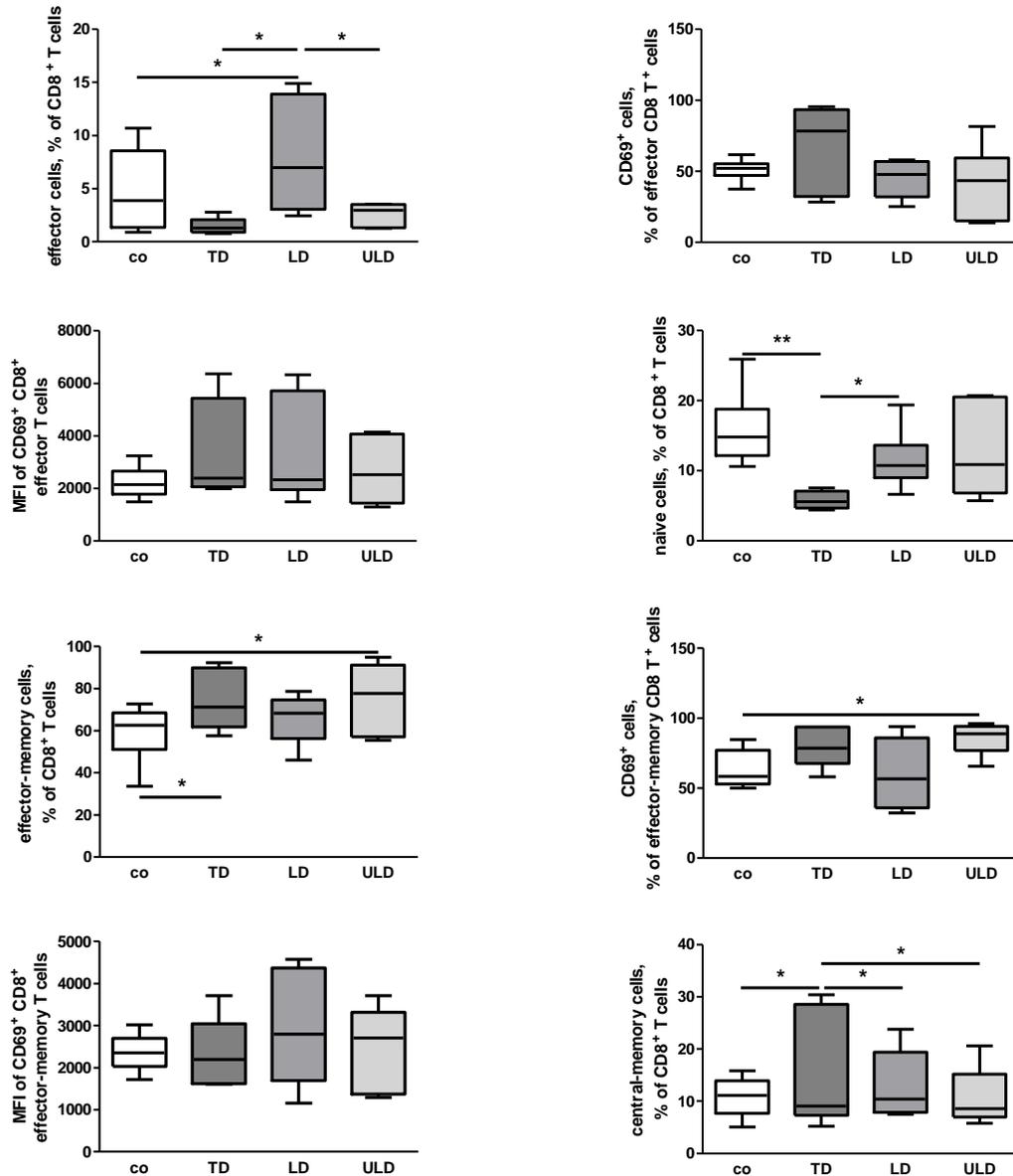


Abb. 3.3.8.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, der CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

Betrachtet man die Ergebnisse der Phänotypisierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie deren Subpopulationen, so lassen sich hinsichtlich der Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen kaum Unterschiede zwischen den behandelten und den unbehandelten Tiere feststellen. Unter der Behandlung mit LD und ULD konnten im Vergleich zu TD und den Kontrollen mehr CD8⁺-T-Zellen bestimmt werden. Therapeutisch dosiert behandelte Tiere wiesen signifikant mehr Aktivierungsmarker der CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zu LD und den Kontrollen auf. Bei der Gegenüberstellung von ULD und den Kontrollen, konnten unter ULD signifikant mehr Aktivierungsmarker der CD8⁺-T-Zellen phänotypisiert werden (Abb. 3.3.8.1.1). Die Zahl der Effektor-T-

Zellen (CD4) ist unter der Behandlung mit LD im Vergleich mit ULD und TD signifikant erhöht. Die unbehandelten Mäuse wiesen, verglichen mit den konventionell therapierten Tieren (TD), signifikant mehr Effektor-T-Zellen (CD4) auf. Auch in Bezug auf die naiven T-Zellen (CD4) konnte eine signifikante Überlegenheit der Kontrollen im Vergleich zu der TD Gruppe aufgezeigt werden. Der Anteil der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, ebenso wie der der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen, fiel in allen Untersuchungsgruppen ähnlich aus, wobei unter der LD jeweils eine etwas geringere Zellzahl zu finden war (Abb. 3.3.8.1.2). Prozentual zeigte sich unter der Behandlung mit LD eine signifikante Überlegenheit der Effektor-T-Zellen (CD8) im Vergleich zu TD, ULD und den Kontrollen. Außerdem ist der Anteil der naiven T-Zellen (CD8) der LD und den Kontrollen bei der Gegenüberstellung mit TD jeweils signifikant erhöht. Die mit TD und ULD behandelten Tiere wiesen, verglichen mit den Kontrollen, signifikant mehr Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) auf. Aus den Tils, der mit ULD behandelten Tiere, konnten, im Vergleich mit den Kontrollen, signifikant mehr Aktivierungsmarker der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) nachgewiesen werden. Die konventionelle Dosierung (TD) mit Gemcitabin zeigte eine signifikant geringere Anzahl der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen im Vergleich mit allen anderen Untersuchungsgruppen (Abb. 3.3.8.1.3).

3.3.8.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

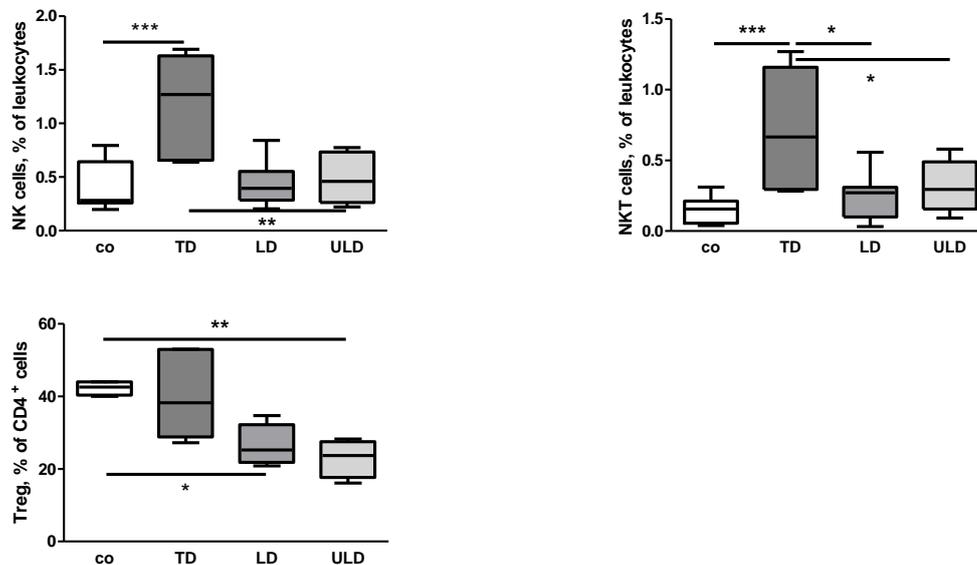


Abb. 3.3.8.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-Zellen, NKT-Zellen und Treg-Zellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test ($n=6-12$ pro Gruppe; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Abb. 3.3.8.2.1 zeigt unter der Behandlung mit TD die quantitative Überlegenheit hinsichtlich der NK-Zellen bei der Gegenüberstellung mit der sehr niedrig dosierten Chemotherapie (ULD) und den Kontrollen. Dasselbe Ergebnis wurde bei den NKT-Zellen erzielt. Unter der Behandlung mit TD ist die Zellzahl signifikant, im Vergleich zu LD, ULD und den Kontrollen, erhöht. Zudem wurden mehr Treg-Zellen unter der konventionellen Chemotherapie (TD) als unter der metronomischen Chemotherapie (LD, ULD) nachgewiesen. Dabei waren unter der Behandlung mit LD und ULD signifikant weniger Treg als in den Kontrollen zu finden.

3.3.8.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die MDSC und Makrophagen

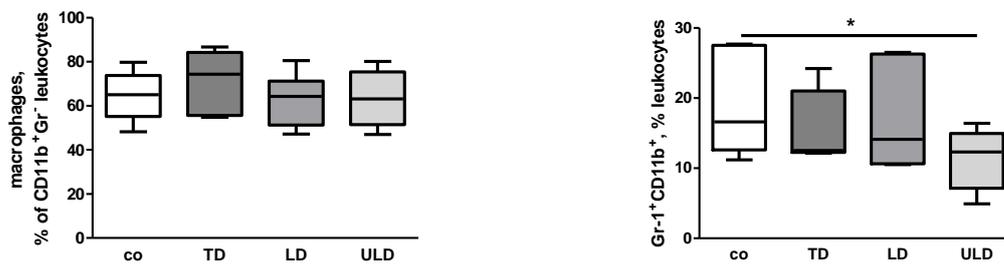


Abb. 3.3.8.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b⁺Gr⁻-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05).

Die Anzahl der Makrophagen unterscheidet sich innerhalb der Untersuchungsgruppen kaum. Unter der Behandlung mit TD konnten etwas mehr Makrophagen nachgewiesen werden. Die metronomische Chemotherapie zeigte im Hinblick auf die immunsuppressive Zellpopulation der MDSC positive Auswirkungen. Die sehr niedrige Dosierung (ULD) von Gemcitabin erzielte eine signifikant niedrigere Anzahl der MDSC im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Abb. 3.3.8.3.1).

3.3.8.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die DZ

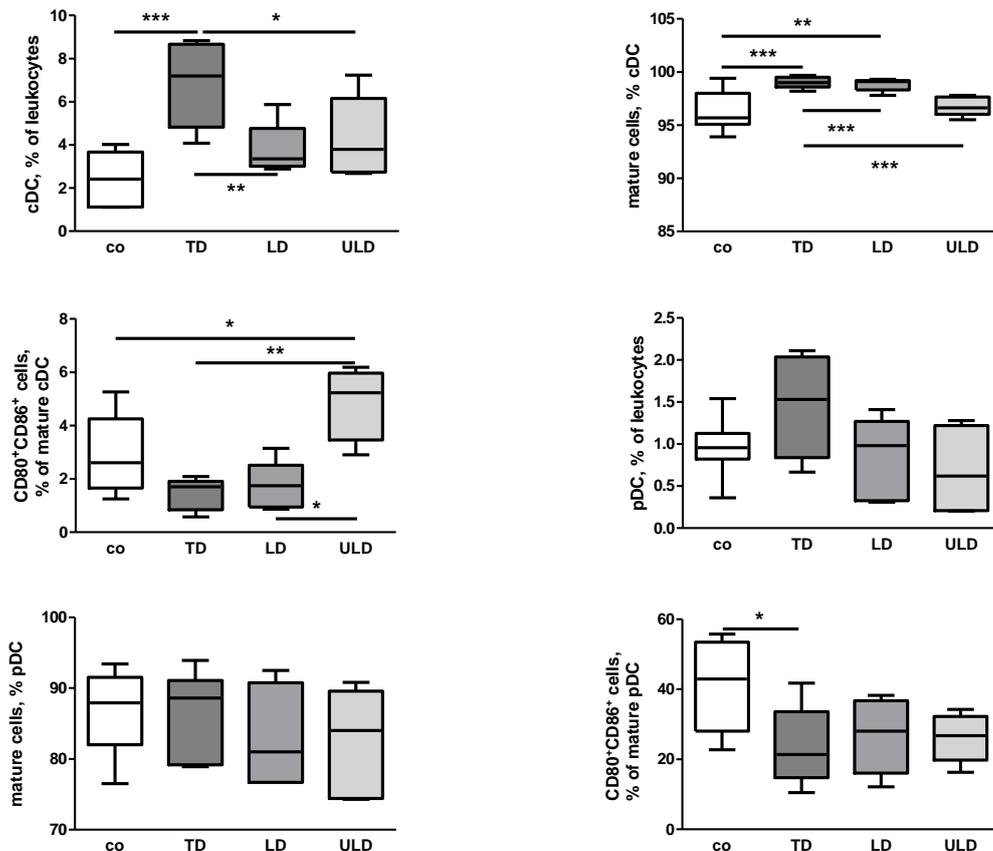


Abb. 3.3.8.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6-12 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die mit konventioneller Chemotherapie (TD) behandelten Tiere wiesen eine signifikant höhere Anzahl von cDZ im Vergleich zu LD, ULD und den Kontrollen auf. Ebenso war die Menge der ausgereiften cDZ unter TD im Vergleich mit LD, ULD und den Kontrollen signifikant erhöht. Außerdem konnte eine signifikant höhere Anzahl dieser Zellpopulation unter LD im Vergleich zu den Kontrollen aufgezeigt werden. Jedoch konnten unter ULD signifikant mehr Reifungsmarker der ausgereiften cDZ im Vergleich mit LD, TD und den Kontrollen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Während sich die Zahl der pDZ innerhalb der Untersuchungsgruppen nicht bedeutend unterscheidet, weisen die Kontrollen signifikant mehr Reifungsmarker der ausgereiften pDZ bei der Gegenüberstellung mit TD auf (Abb. 3.3.8.4.1).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vivo Experiments (Tils von tumortragenden Mäusen) festhalten, dass die Behandlung mit Gemcitabin in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten				
Lymphozyten				
CD19				
CD8				
CD4				
Effektorzellen CD4	100	50	100	75
naive Zellen CD4	100	50	75	75
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4				
Effektorzellen CD8	75	50	100	75
naive Zellen CD8	100	50	75	75
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8	50	75	75	100
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8	100	75	100	75
Treg	100	75	50	50
Tcon				
NK	50	100	75	75
NKT	50	100	75	75
Makrophagen				
MDSC	100	50	75	50
gran. MDSC				
monozyt. MDSC				
cDZ	50	100	75	75
mature cDC	50	100	100	75
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ	75	50	50	100
pDZ				
mature pDC				
CD80 mature pDZ				
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ	100	50	75	75

Abb. 3.3.8.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse, in vivo

In der Abb. 3.3.8.4.2 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin (in vitro)

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Therapie der Milzzellkulturen der gesunden Mäuse mit den Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin auf die Immunzellen hat, wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt. Wichtig war hierbei der Vergleich zwischen den konventionell und metronomisch behandelten Proben. Als Referenz wurden die unbehandelten Milzzellkulturen (Kontrollen) genutzt.

Im Alter von 8 Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und die Milzen entnommen. Die Herstellung der Einzelzellsuspensionen und die Therapie der Milzzellen mit den Standard-Chemotherapeutika erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Je nach Therapiegruppe wurde in die Zellkulturen die therapeutische, niedrige oder sehr niedrige Dosierung der Chemotherapie pipettiert. Nach 24h Inkubation der Zellkulturen wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert, die Zellzahl bestimmt, in Medium aufgenommen und weiter gemäß dem Protokoll zur durchflusszytometrischen Analyse fortgeföhren (Abschnitte 2.2.3.2 und 2.2.4). Nach der Färbung mit den Antikörpern (Abschnitte 2.2.5.2 und 2.2.5.3) konnten die Proben im Durchflusszytometer analysiert werden.

Die Auswertung mit der Software FlowJo erfolgte analog der vorherigen Experimente mit Milzzellen. Die Auswertungsstrategie ist in den Abschnitten 3.3.1-3.3.4 dargestellt.

3.4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU

3.4.1.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

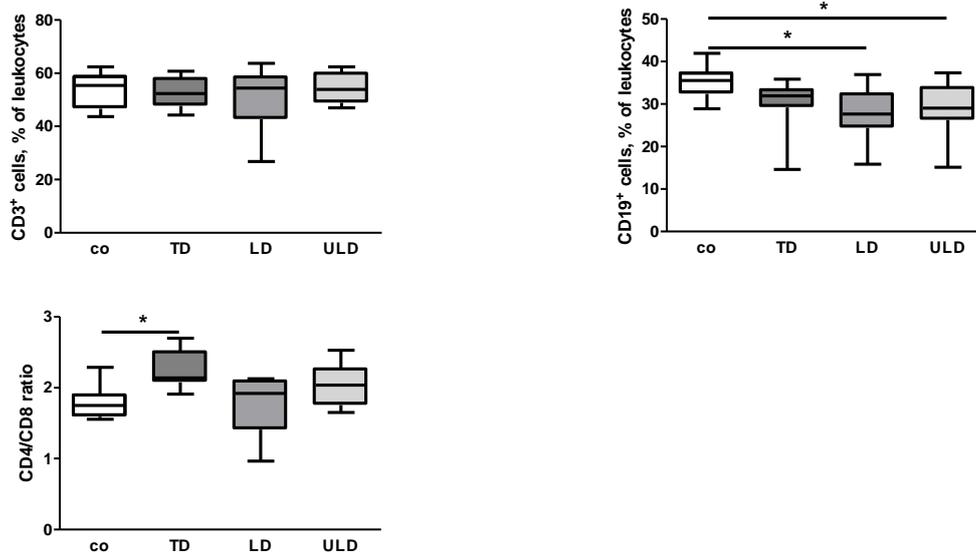


Abb. 3.4.1.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD3⁺-Zellen, B-Zellen und CD4/CD8 Ratio aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05).

Vergleicht man die Ergebnisse der Durchflusszytometrie aus Abb. 3.4.1.1.1, fällt auf, dass die Anzahl der CD19⁺-Zellen unter der Behandlung mit LD und ULD jeweils signifikant geringer ausfiel als bei den Kontrollen. Außerdem war die CD4/CD8 Ratio unter TD, im Vergleich zu der CD4/CD8 Ratio aus den unbehandelten Tieren, signifikant erhöht.

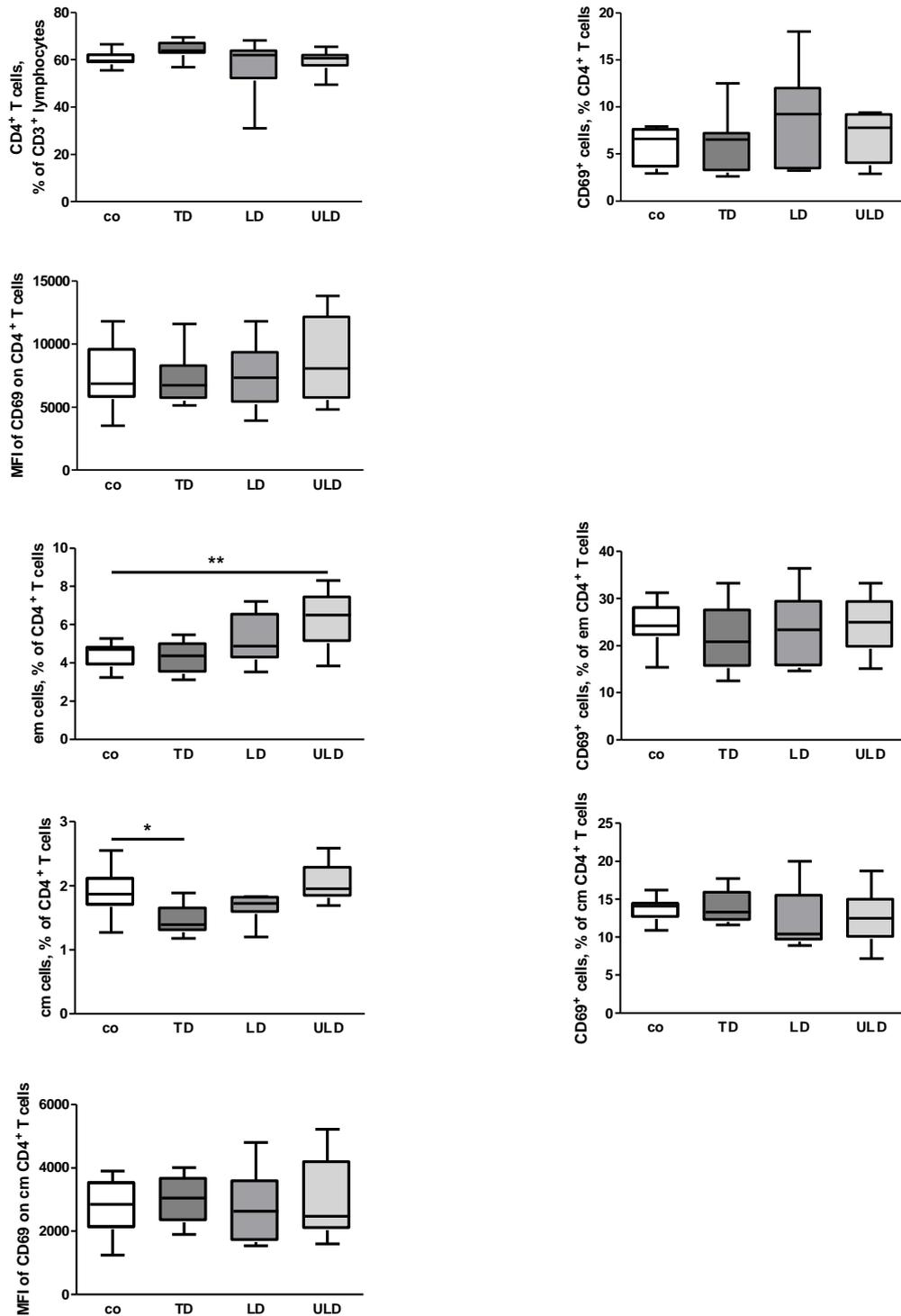


Abb. 3.4.1.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

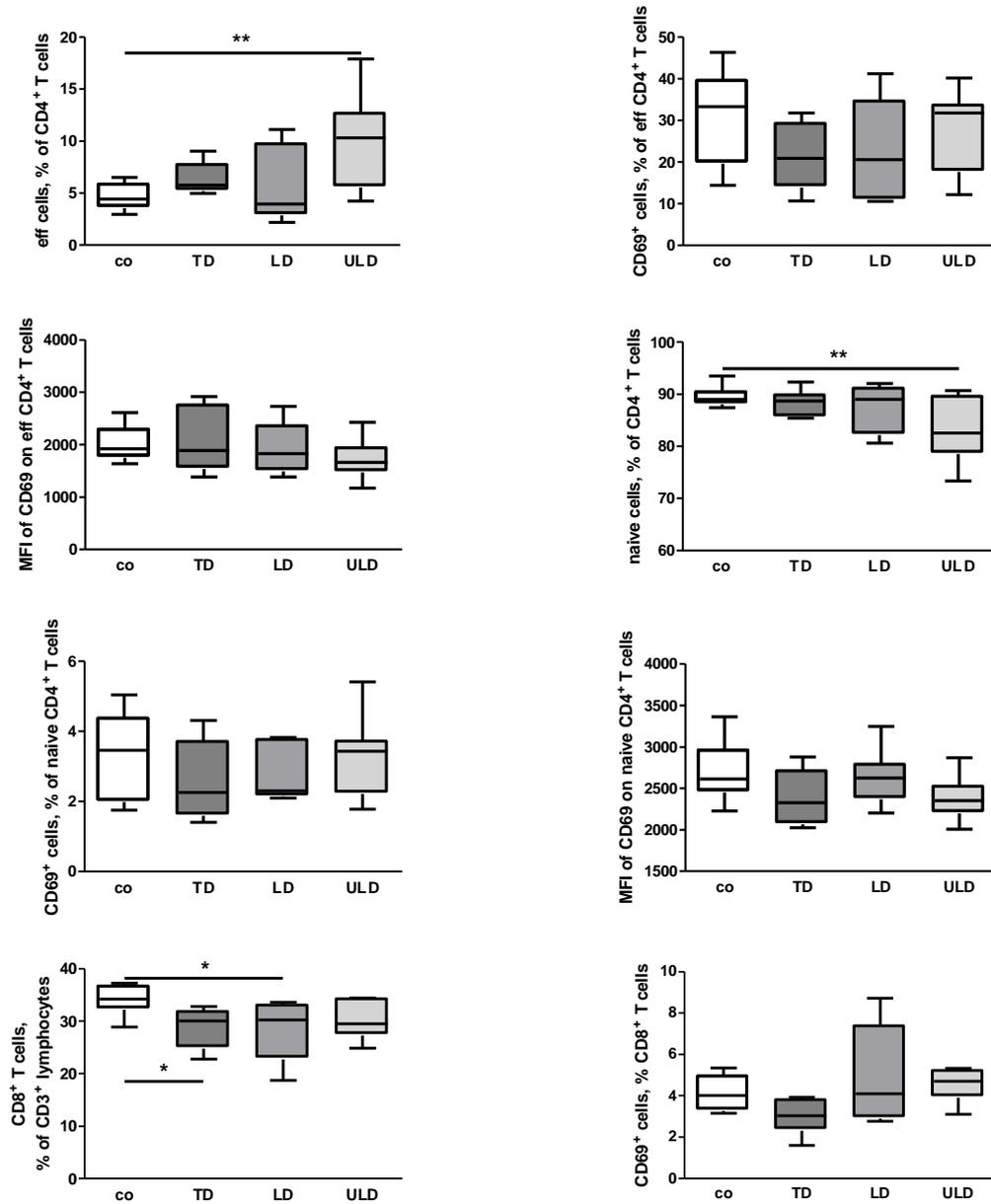


Abb. 3.4.1.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

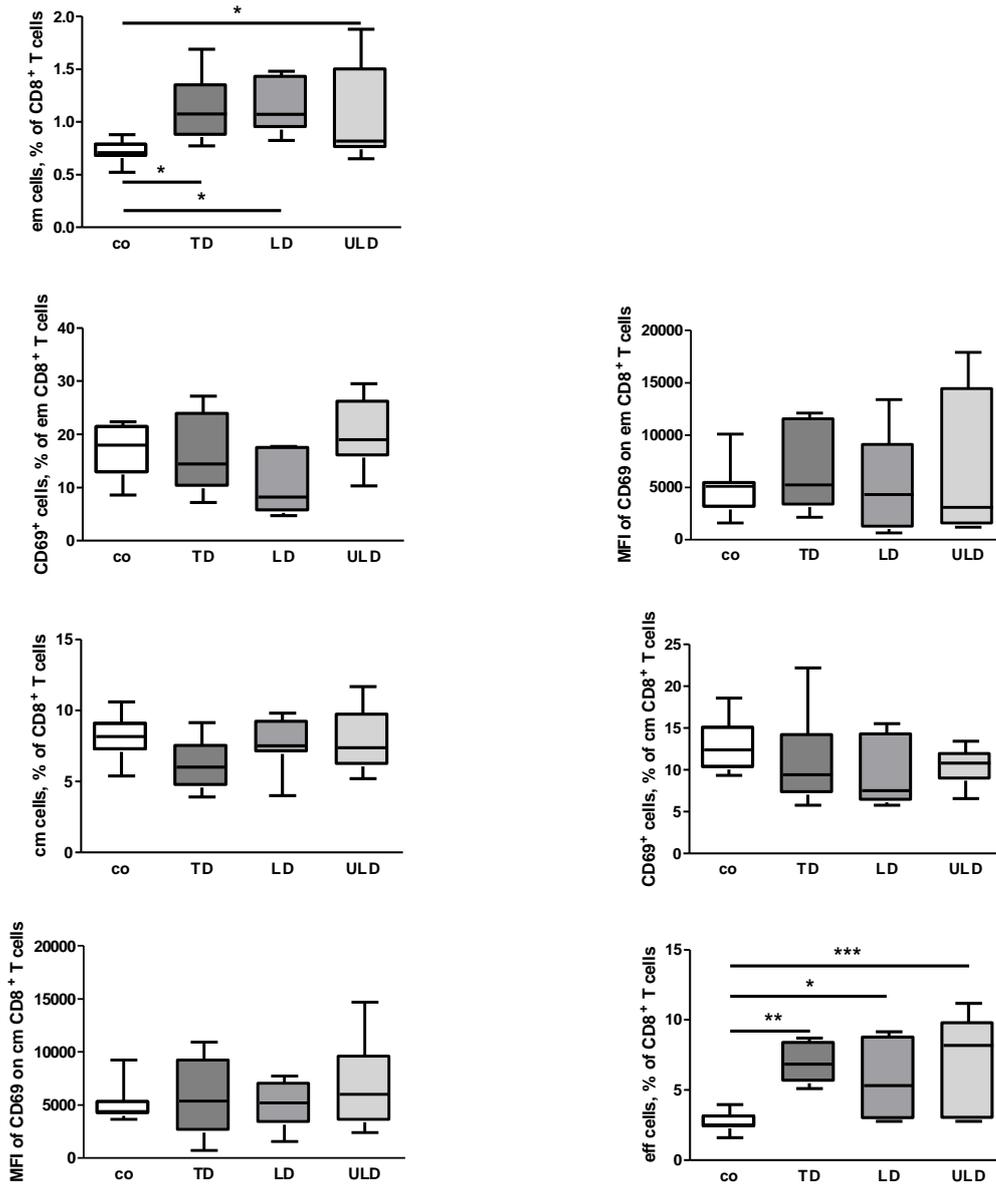


Abb. 3.4.1.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

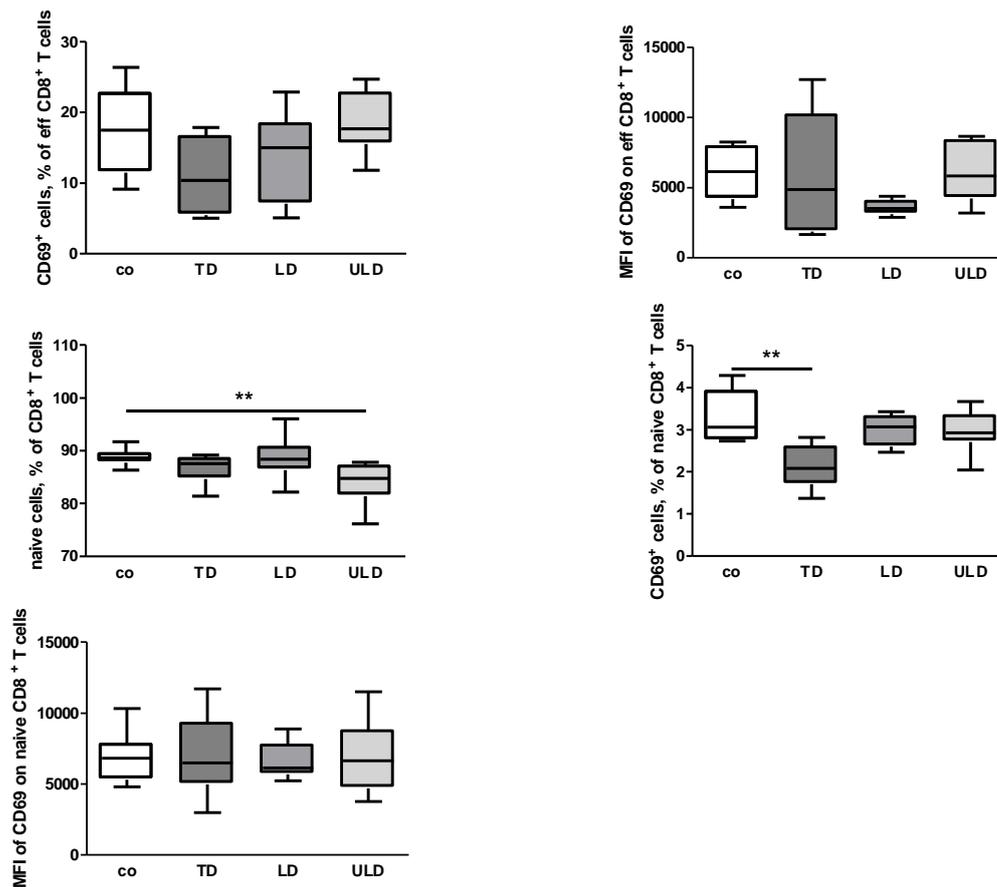


Abb. 3.4.1.1.5 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; **p<0,01).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Milzzellen gesunder Mäuse ergab eine signifikant höhere Anzahl von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) unter der Behandlung mit ULD 5 FU im Vergleich mit den Milzzellen der unbehandelten Tiere. Dagegen fiel die Zahl der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) unter der Behandlung mit TD 5 FU, verglichen mit den Kontrollen, signifikant niedriger aus (Abb. 3.4.1.1.2). Die metronomische Chemotherapie ULD 5 FU zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl der Effektor-T-Zellen (CD4) im Vergleich mit den Kontrollen. Andererseits konnten unter der Therapie mit ULD 5 FU signifikant weniger naive T-Zellen (CD4), verglichen mit den Kontrollen, gemessen werden. Die unbehandelten Proben wiesen signifikant mehr CD-8⁺-T-Zellen im Vergleich mit den TD und LD therapierten Proben auf (Abb. 3.4.1.1.3). Prozentual konnten in allen Behandlungsgruppen signifikant mehr Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8), im Vergleich mit den Kontrollen, dokumentiert werden. Ebenso wurden in allen Behandlungsgruppen mit 5 FU signifikant mehr Effektor-T-Zellen (CD8) gefunden. Unter der metronomischen Chemotherapie mit ULD 5 FU wurden signifikant weniger naive T-Zellen (CD8) identifiziert als in den Kontrollen. Die Anzahl der Aktivierungsmarker der naiven T-Zellen (CD8) war unter der Therapie mit TD signifikant niedriger als bei den unbehandelten Milzzellkulturen (Abb. 3.4.1.1.5).

3.4.1.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

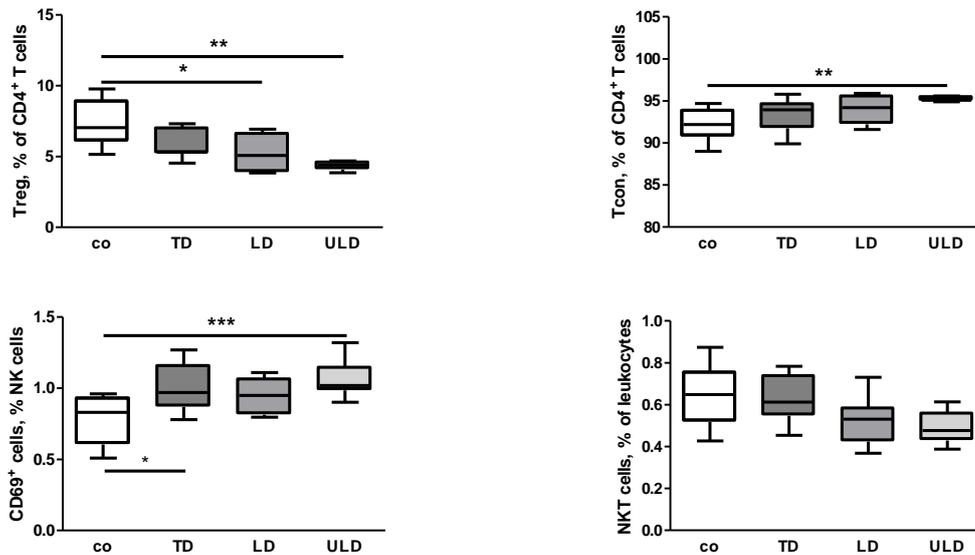


Abb. 3.4.1.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und den NKT-Zellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die metronomische Chemotherapie mit LD und ULD 5 FU hatte Auswirkungen auf die Anzahl der Treg-Zellen. Unter der Therapie mit LD und ULD wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Proben, signifikant weniger Treg nachgewiesen. Es konnten signifikant mehr Tcon-Zellen unter der Therapie mit ULD 5 FU, verglichen mit den unbehandelten Milzzellkulturen, markiert und gemessen werden. Die Anzahl der Aktivierungsmarker der NK-Zellen war unter TD und ULD signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 3.4.1.2.1).

3.4.1.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die MDSC und Makrophagen

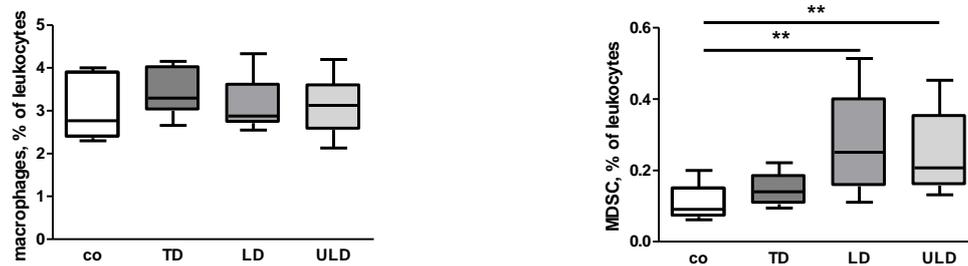


Abb. 3.4.1.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und MDSC aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test ($n=16$ pro Gruppe; $**p<0,01$).

Die metronomische Chemotherapie hatte ebenfalls Einfluss auf die Anzahl der MDSC in den Milzzellkulturen der gesunden Mäuse. Unter der Therapie mit LD und ULD 5 FU konnten, im Vergleich zu den unbehandelten Proben, signifikant mehr MDSC nachgewiesen werden (Abb. 3.4.1.3.1).

3.4.1.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die DZ

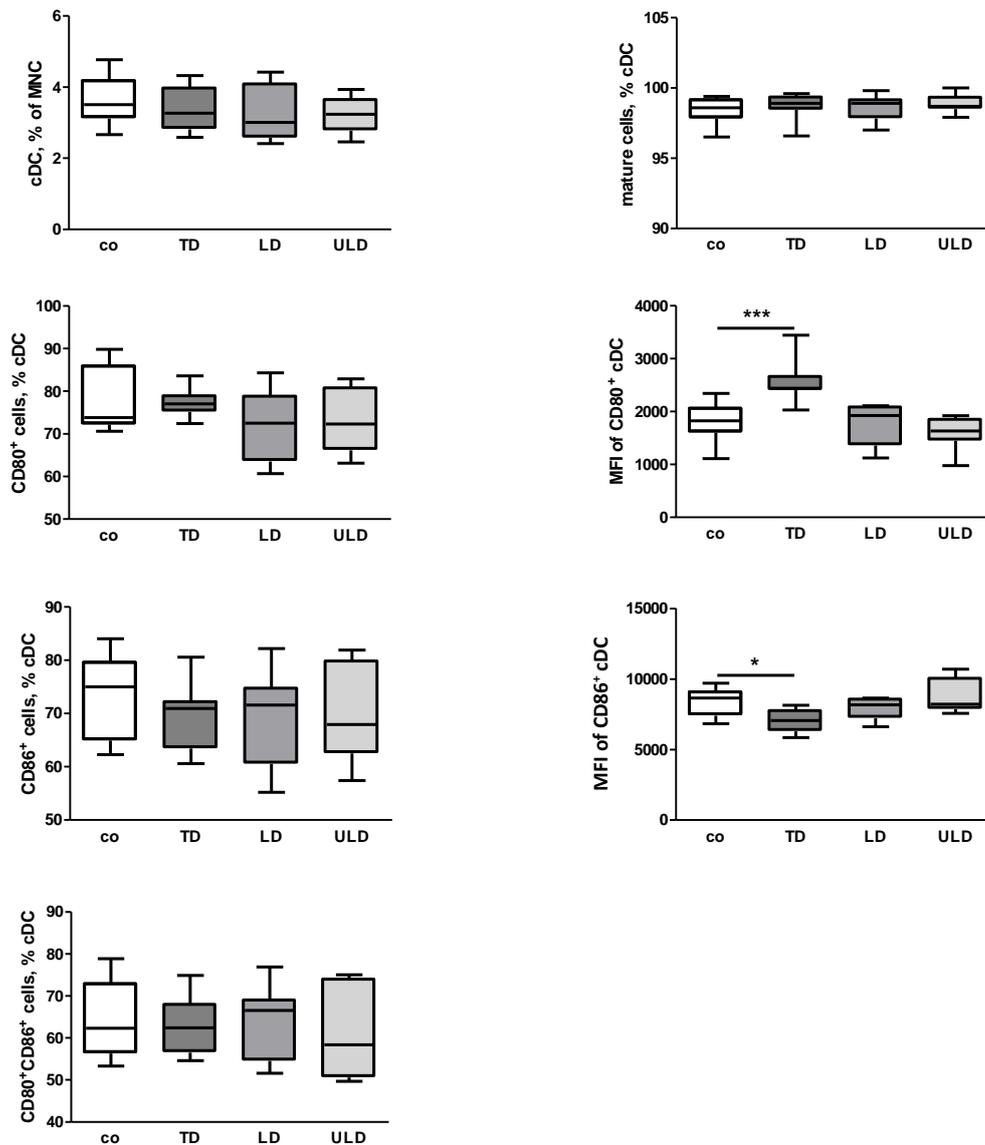


Abb. 3.4.1.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen der DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05, ***p<0,001).

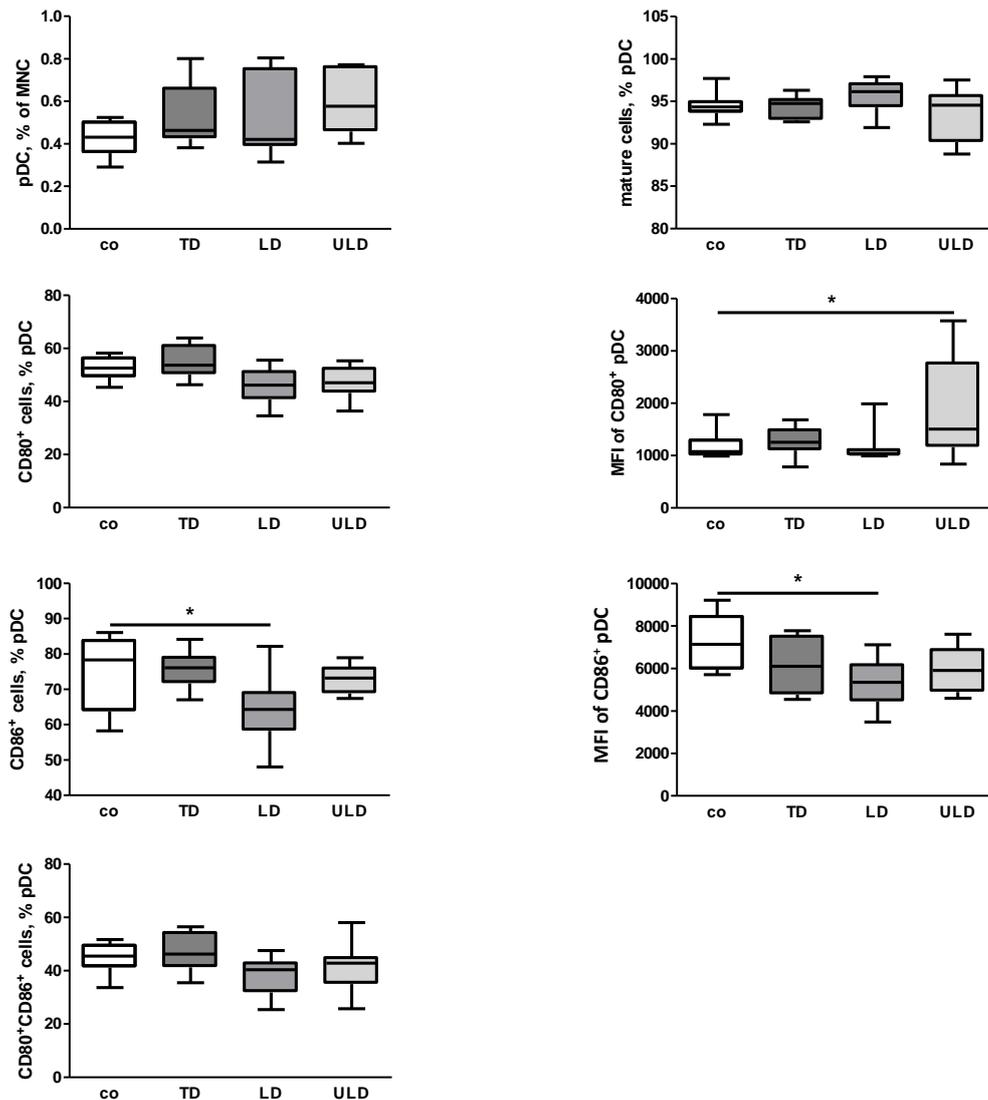


Abb. 3.4.1.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05).

Abb. 3.4.1.4.1 zeigt eine signifikant höhere MFI der CD80⁺-Zellen (cDZ) unter der Therapie mit TD 5 FU im Vergleich zu der MFI der Kontrollen. Dagegen weist die Therapie mit TD 5 FU bezüglich der MFI der CD86⁺-Zellen (cDZ) einen signifikant niedrigeren Wert auf. Abb. 3.4.1.4.2 veranschaulicht die signifikant höhere MFI der CD80⁺-Zellen (pDZ) unter der Therapie mit ULD im Vergleich zu den Kontrollen. Prozentual konnte man unter LD 5 FU signifikant weniger CD86⁺-Zellen (pDZ) in Relation zu den unbehandelten Proben nachweisen. Die MFI der CD86⁺-Zellen (pDZ) der Kontrollen war im Vergleich zu LD 5 FU signifikant höher.

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vitro Experiments (Milzzellen gesunder Mäuse) festhalten, dass die Behandlung mit 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten				
Lymphozyten				
CD19	100	75	50	50
CD8	100	75	75	75
CD4				
Effektorzellen CD4	50	75	50	100
naive Zellen CD4	100	100	100	75
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4	50	50	75	100
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4	100	50	75	100
Effektorzellen CD8	25	75	50	100
naive Zellen CD8	100	75	100	50
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8	50	100	100	75
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8				
Treg	100	75	75	50
Tcon	50	75	75	100
NK				
NKT				
Makrophagen				
MDSC	25	50	100	75
gran. MDSC				
monozyt. MDSC				
cDZ				
mature cDC				
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ				
pDZ				
mature pDC				
CD80 mature pDZ				
CD86 mature pDZ	100	100	50	75
CD80/CD86 mature pDZ				

Abb. 3.4.1.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, in vitro

In der Abb. 3.4.1.4.3 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin

3.4.2.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

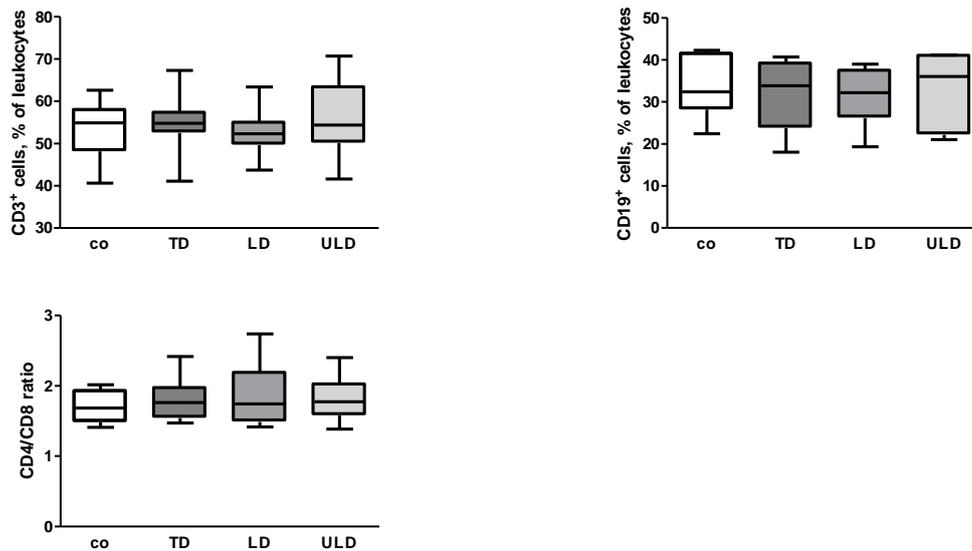


Abb. 3.4.2.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD3⁺-Zellen, B-Zellen und CD4/CD8 Ratio aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe).

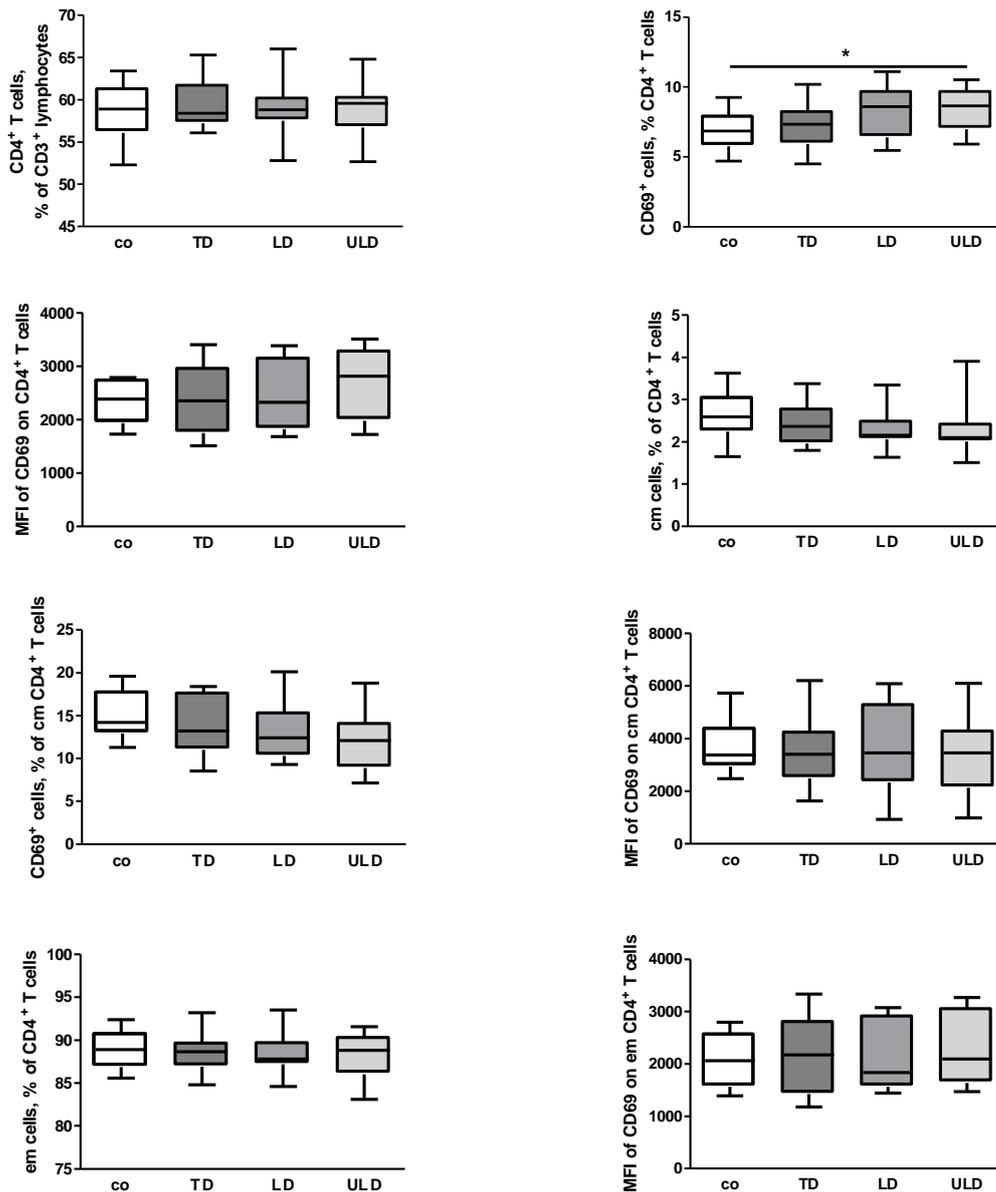


Abb. 3.4.2.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe).

Die Anzahl der Aktivierungsmarker der CD4⁺-T-Zellen fiel unter der Therapie mit ULD Gemcitabin signifikant höher aus als bei den Kontrollen (Abb. 3.4.2.1.2).

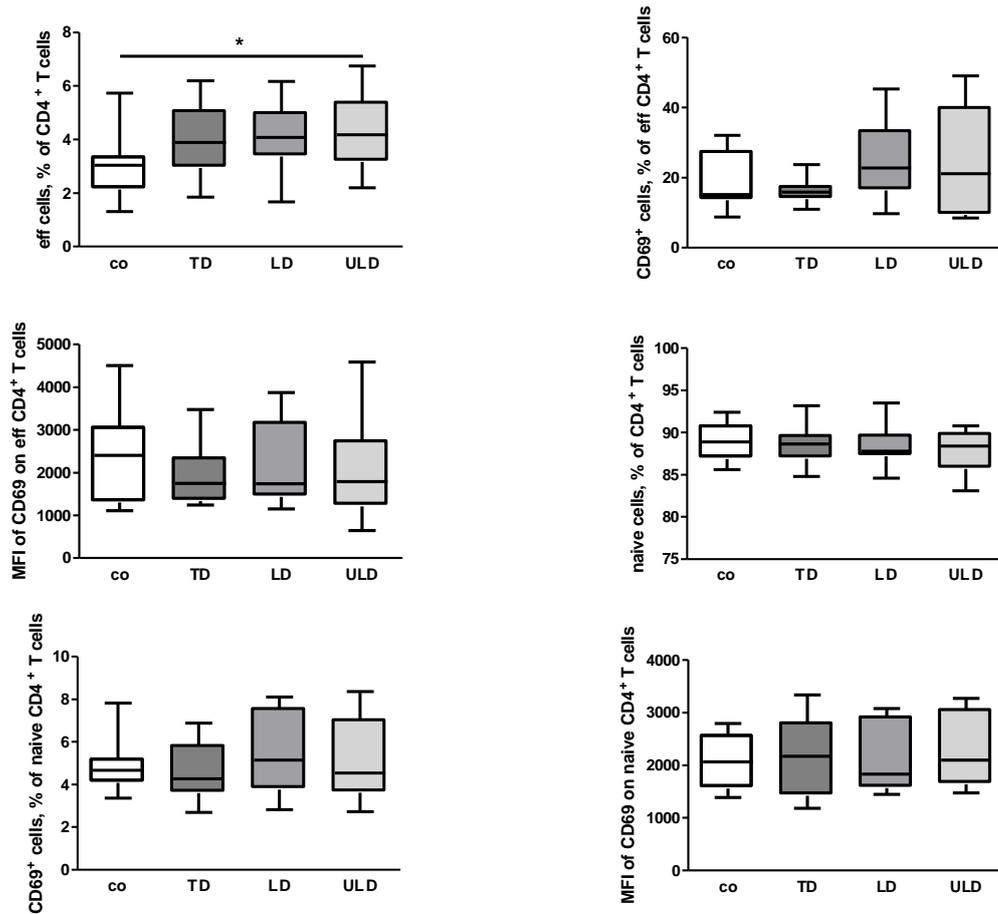


Abb. 3.4.2.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05).

Prozentual konnte unter der Therapie mit ULD Gemcitabin eine höhere Zahl an Effektor-T-Zellen (CD4) in Relation zu den unbehandelten Proben erzielt werden (Abb. 3.4.2.1.3).

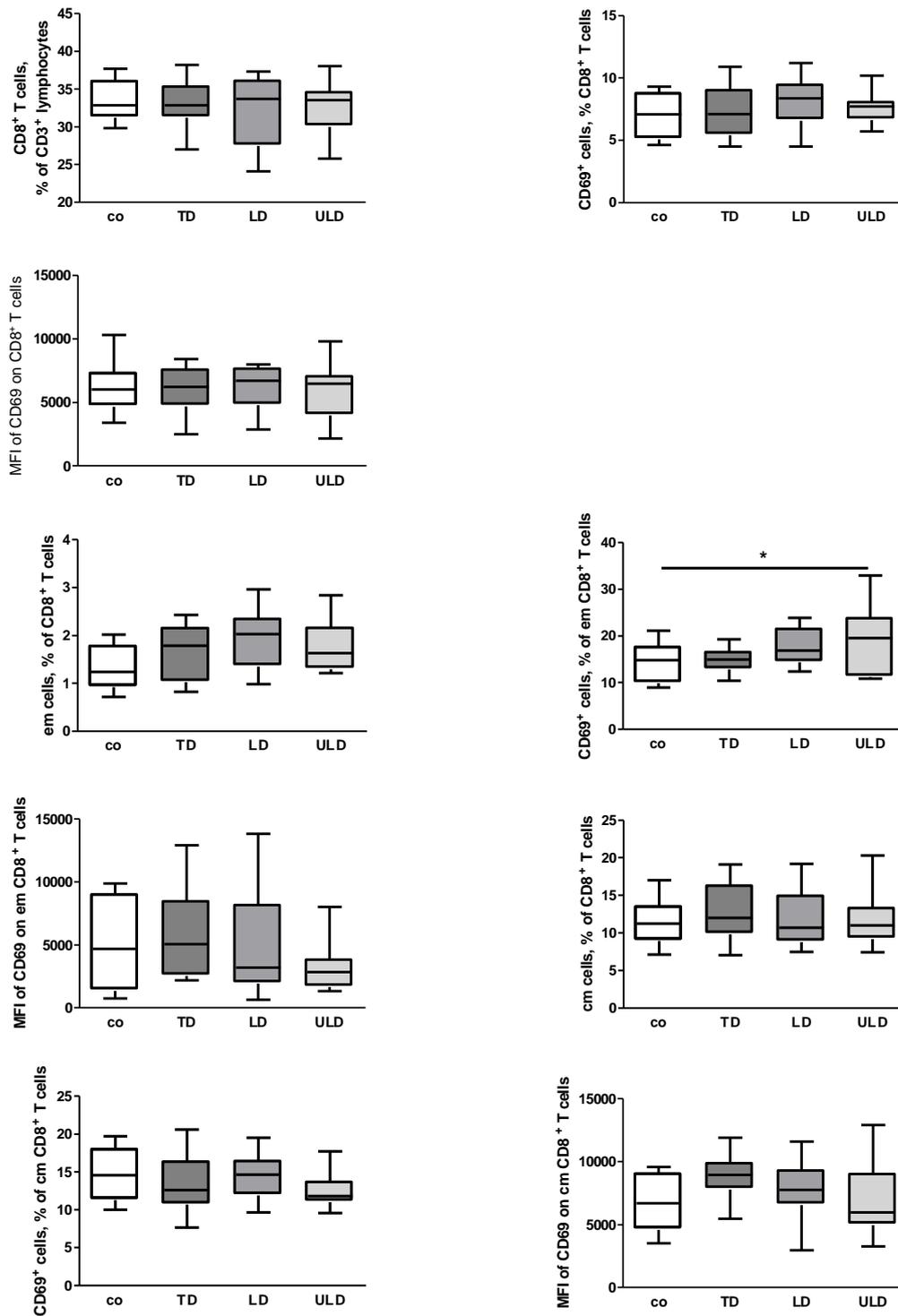


Abb. 3.4.2.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05).

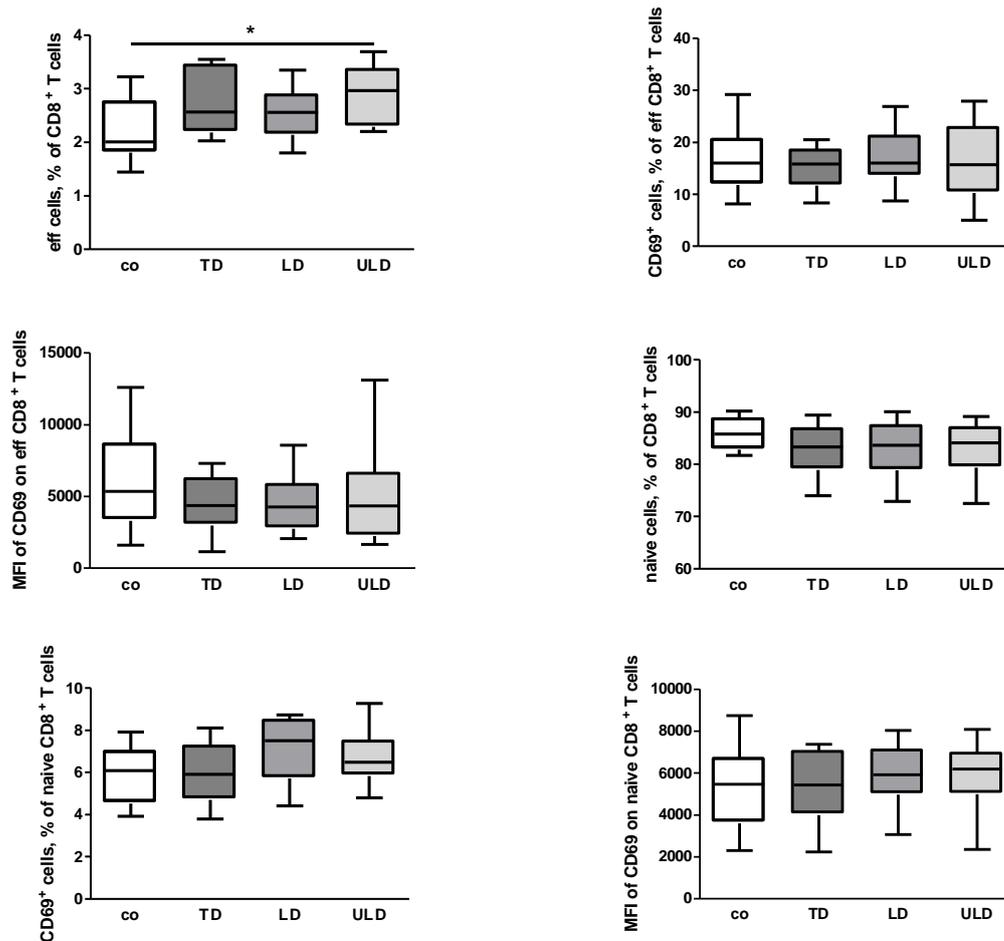


Abb. 3.4.2.1.5 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe).

Unter der Therapie mit ULD Gemcitabin wurden signifikant mehr Aktivierungsmarker der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) im Vergleich mit den Kontrollen nachgewiesen (Abb. 3.4.2.1.5). Des Weiteren konnte unter der metronomischen Chemotherapie mit ULD Gemcitabin, verglichen mit den Kontrollen, eine signifikant höhere Anzahl an Effektor-T-Zellen (CD8) verzeichnet werden (Abb. 3.4.2.1.5).

3.4.2.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

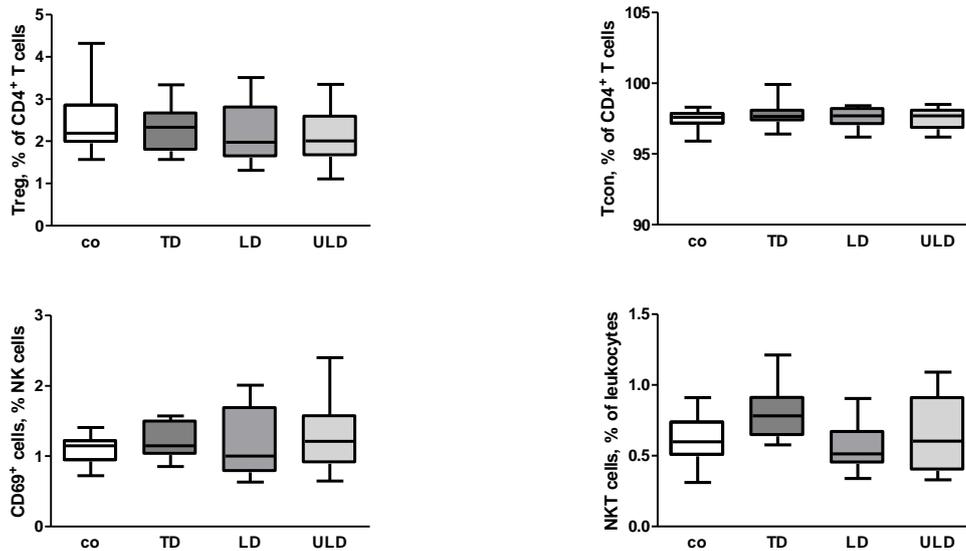


Abb. 3.4.2.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und den NKT-Zellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe).

3.4.2.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die MDSC und Makrophagen

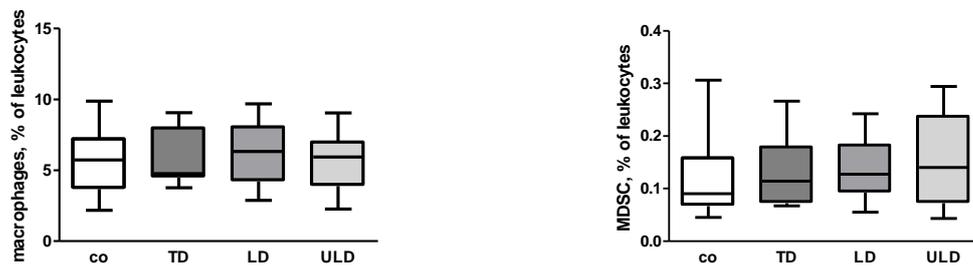


Abb. 3.4.2.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und MDSC aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe).

3.4.2.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die DZ

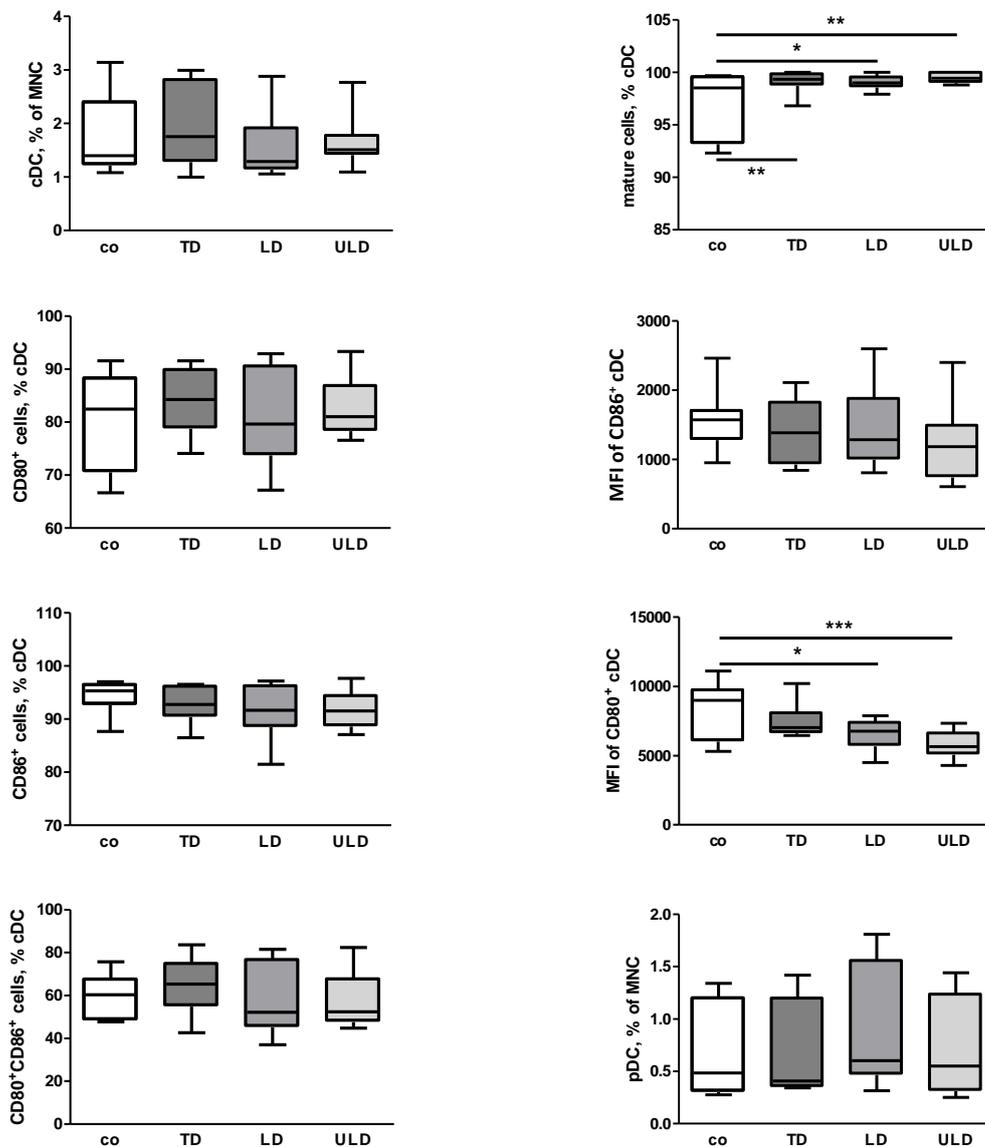


Abb. 3.4.2.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen der DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

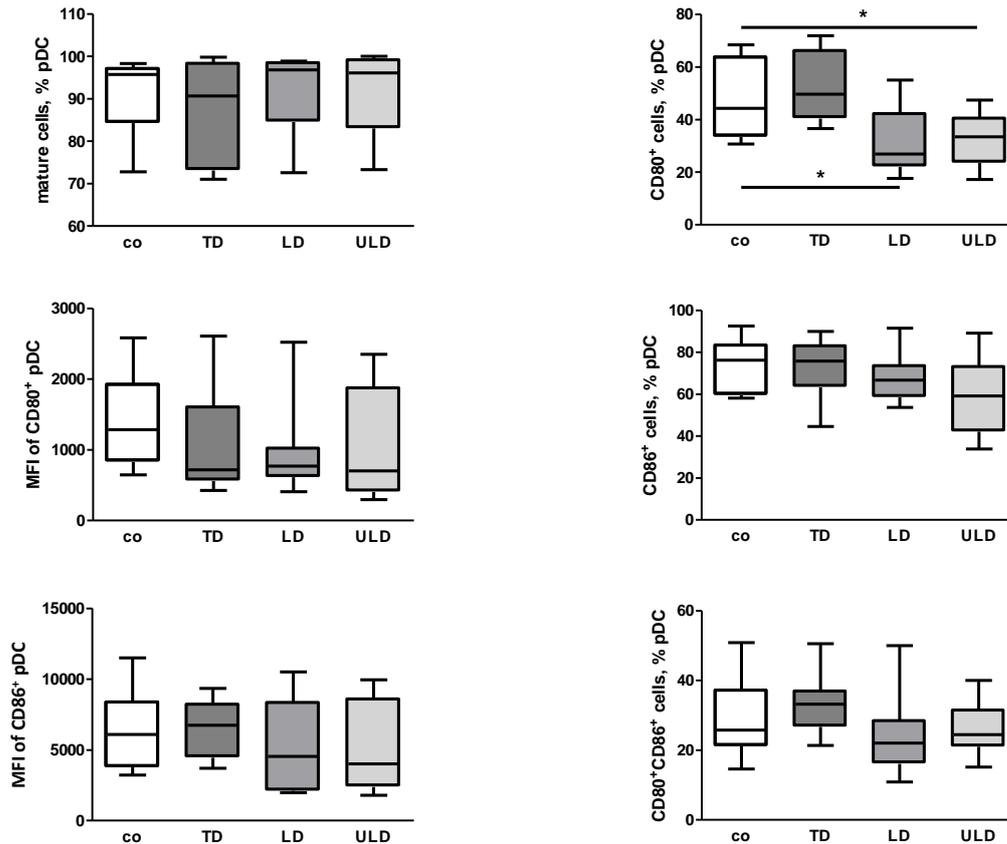


Abb. 3.4.2.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=16 pro Gruppe; *p<0,05).

Unter der Therapie mit Gemcitabin war die Anzahl der ausgereiften cDZ in allen Behandlungsgruppen signifikant höher als in der unbehandelten Vergleichsgruppe. Die MFI der CD80⁺-Zellen (cDZ) war unter der metronomischen Chemotherapie LD und ULD signifikant niedriger, verglichen mit den Kontrollen (Abb. 3.4.2.4.1). Die Anzahl der CD80⁺-Zellen (pDZ) fiel unter der Therapie mit LD und ULD Gemcitabin signifikant geringer aus als in den Kontrollen (Abb. 3.4.2.4.2).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vitro Experiments (Milzzellen gesunder Mäuse) festhalten, dass die Behandlung mit Gemcitabin in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten				
Lymphozyten				
CD19				
CD8				
CD4				
Effektorzellen CD4	75	100	100	100
naive Zellen CD4				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4				
Effektorzellen CD8	50	75	75	100
naive Zellen CD8				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8				
Treg				
Tcon				
NK				
NKT				
Makrophagen				
MDSC				
gran. MDSC				
monozyt. MDSC				
cDZ				
mature cDC	75	100	100	100
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ				
pDZ				
mature pDC				
CD80 mature pDZ	75	100	25	50
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ				

Abb. 3.4.2.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Milzen der gesunden Mäuse, in vitro

In der Abb. 3.4.2.4.3 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.5 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin (in vitro)

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Therapie der Milzzellkulturen der tumortragenden Mäuse mit den Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin auf die Immunzellen hat, wurden die nachfolgenden Experimente durchgeführt. Wichtig war hierbei der Vergleich zwischen den konventionell und metronomisch behandelten Proben. Als Referenz wurden die unbehandelten Milzzellkulturen (Kontrollen) genutzt.

Im Alter von 8 Wochen wurden den Mäusen die Pankreaskarzinomzellen der syngenen Linie Panc02 orthotop implantiert. Nach 28 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Milzen entnommen. Die Herstellung der Einzelzellsuspensionen und die Therapie der Milzzellen mit den Standard-Chemotherapeutika erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Je nach Therapiegruppe wurde in die Zellkulturen die therapeutische, niedrige oder sehr niedrige Dosierung der Chemotherapie gegeben. Nach 24h Inkubation der Zellkulturen wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert, die Zellzahl bestimmt, in Medium aufgenommen und weiter gemäß dem Protokoll zur durchflusszytometrischen Analyse fortgeföhren (Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.4). Nach der Färbung mit den Antikörpern (Kapitel 2.2.5.2 und 2.2.5.3) konnten die Proben im Durchflusszytometer analysiert werden.

Die Auswertung mit der Software FlowJo erfolgte analog der vorherigen Experimente mit Milzzellen, mit Ausnahme der ersten Zellpopulationen (CD4/CD8). Hier wurde der Prozentteil der Lymphozyten von den mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) bestimmt und statistisch ausgewertet. Auch die Prozentangabe der cDZ und pDZ bezieht sich auf die Population der mononukleären Zellen. Die Auswertungsstrategie ist in den Abschnitten 3.3.1-3.3.4 dargestellt.

3.5.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU

3.5.1.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

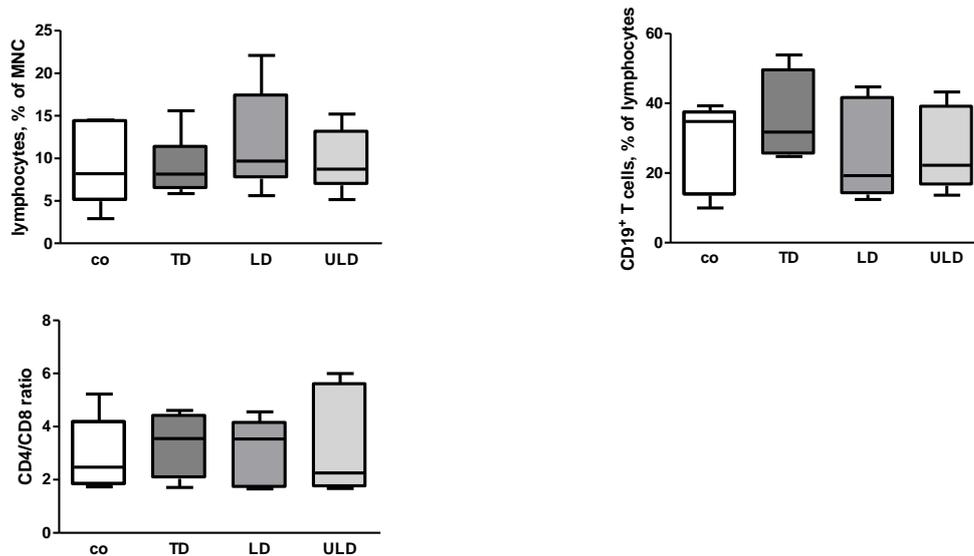


Abb. 3.5.1.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozyten, B-Zellen und der CD4/CD8 Ratio aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe).

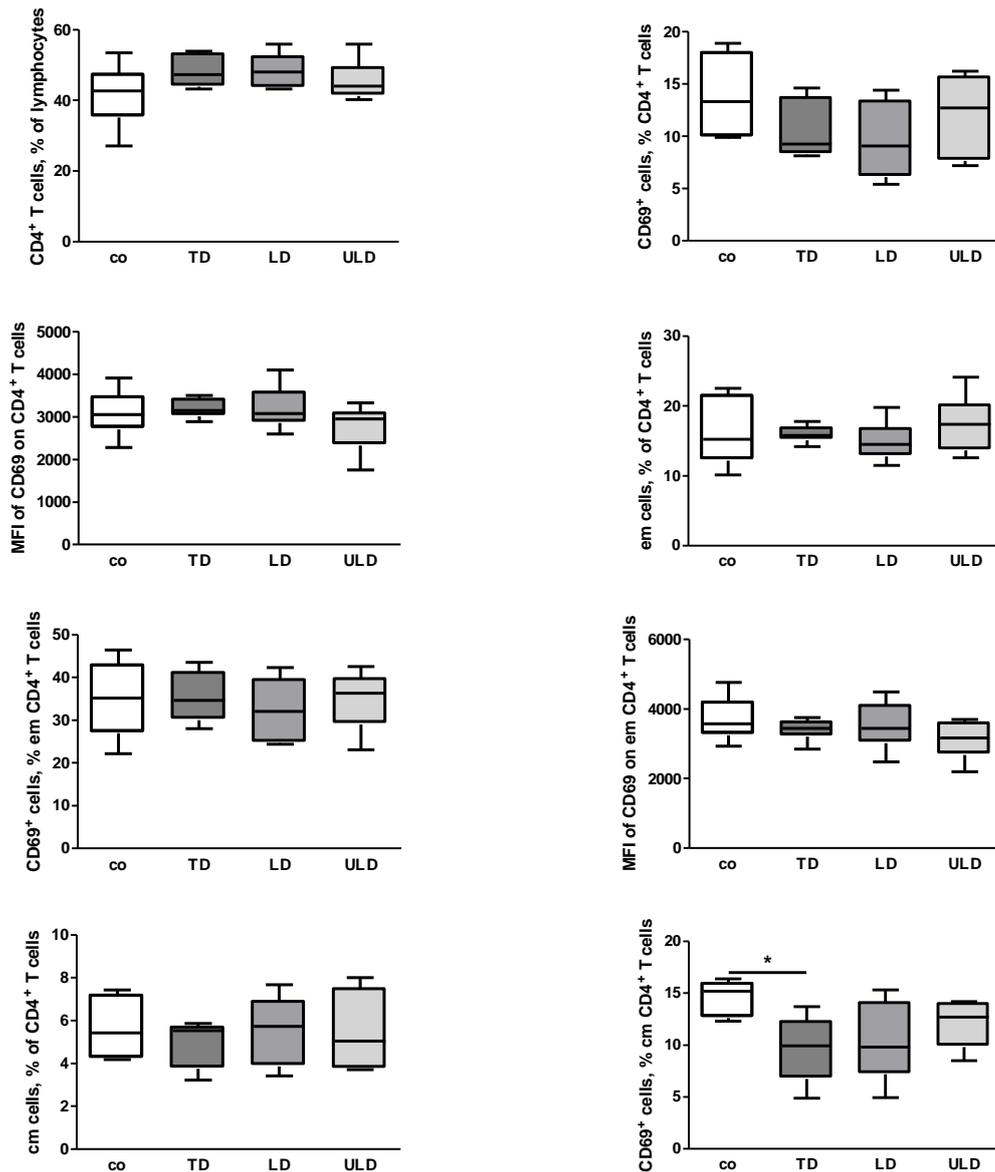


Abb. 3.5.1.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zellpopulationen, der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Die Kontrollen sind der Behandlungsgruppe TD 5 FU quantitativ hinsichtlich der Aktivierungsmarker der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD4) überlegen und weisen eine signifikant höhere Anzahl auf (Abb. 3.5.1.1.2).

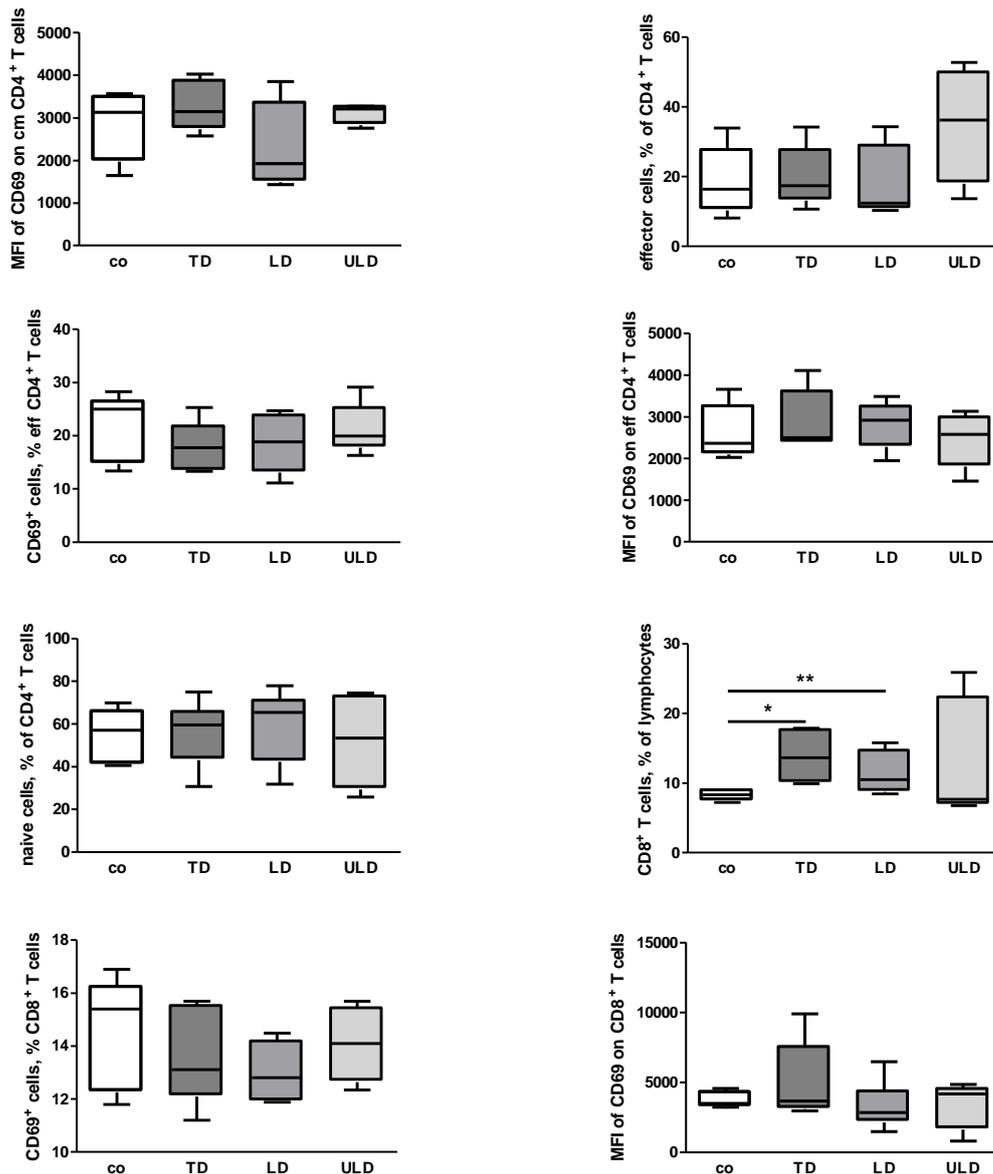


Abb. 3.5.1.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zellpopulationen, der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01).

Bei der Gegenüberstellung der unterschiedlichen CD8⁺-T-Zellpopulationen erwiesen sich die Behandlungsgruppen TD und LD 5 FU den Kontrollen gegenüber quantitativ signifikant überlegen (Abb. 3.5.1.1.3).

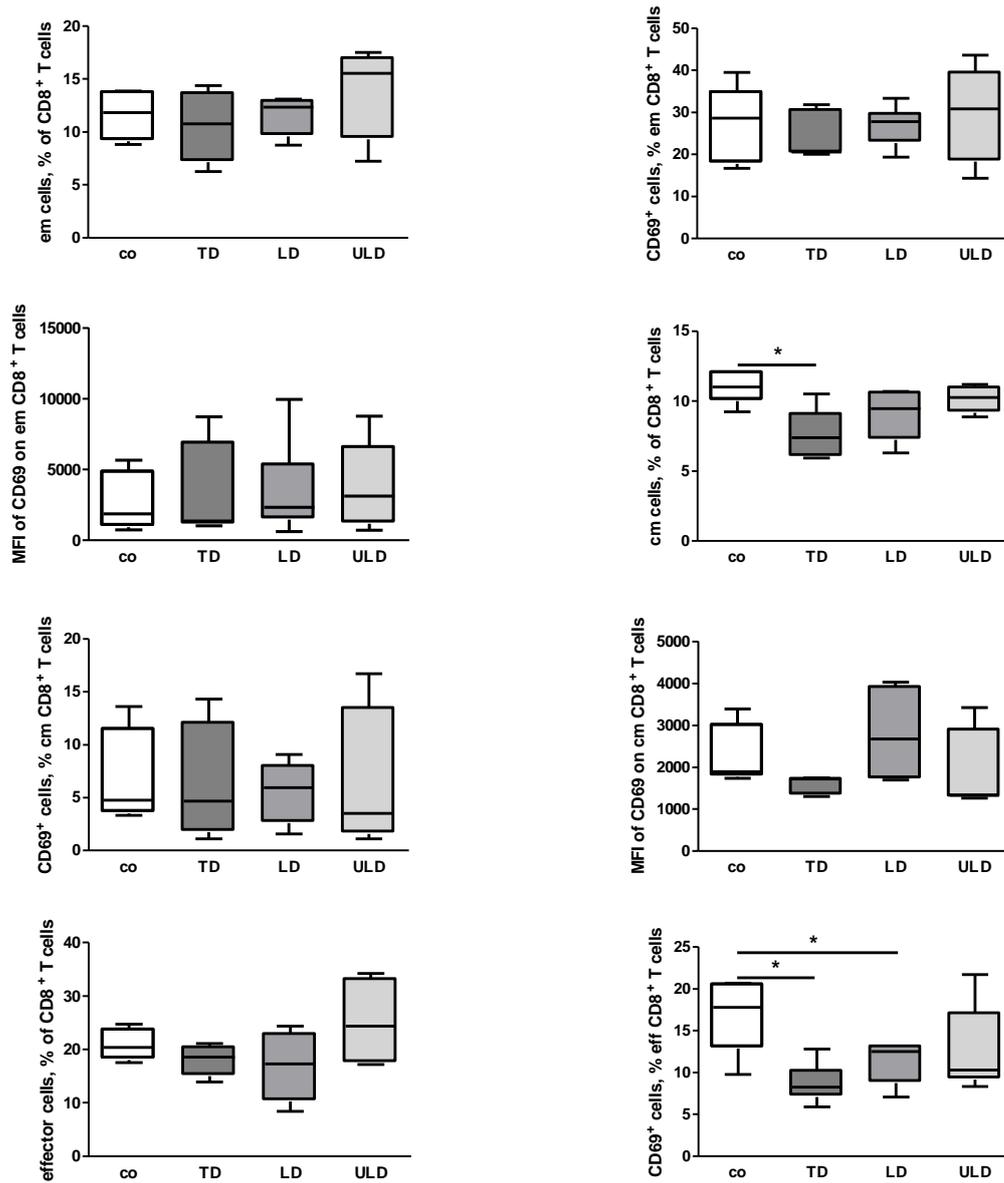


Abb. 3.5.1.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Die Kontrollen wiesen signifikant mehr Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) im Vergleich zu der Behandlungsgruppe TD 5 FU auf. Ebenfalls ergab die durchflusszytometrische Untersuchung eine signifikant höhere Anzahl an Aktivierungsmarkern der Effektor-T-Zellen (CD8) der Kontrollgruppe, verglichen mit den Behandlungsgruppen TD und LD 5 FU (Abb. 3.5.1.1.4).

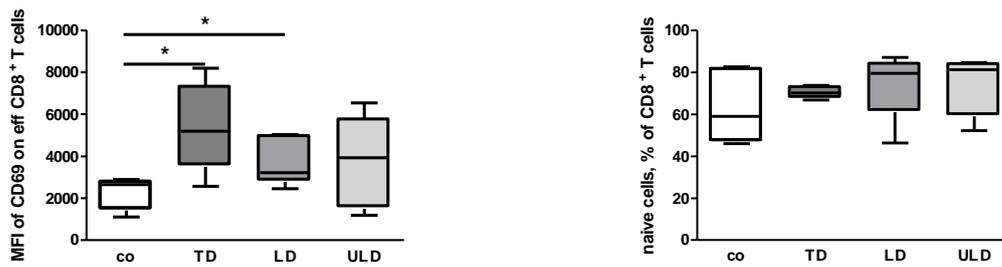


Abb. 3.5.1.1.5 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen und der MFI der CD69⁺-Zellpopulationen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Unter der therapeutisch dosierten Chemotherapie (TD) mit 5 FU konnte, im Vergleich mit der metronomischen Chemotherapie (LD) und der Kontrollgruppe, eine signifikant höhere MFI der Aktivierungsmarker der Effektor-T-Zellen (CD8) gemessen werden (Abb. 3.5.1.1.5).

3.5.1.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

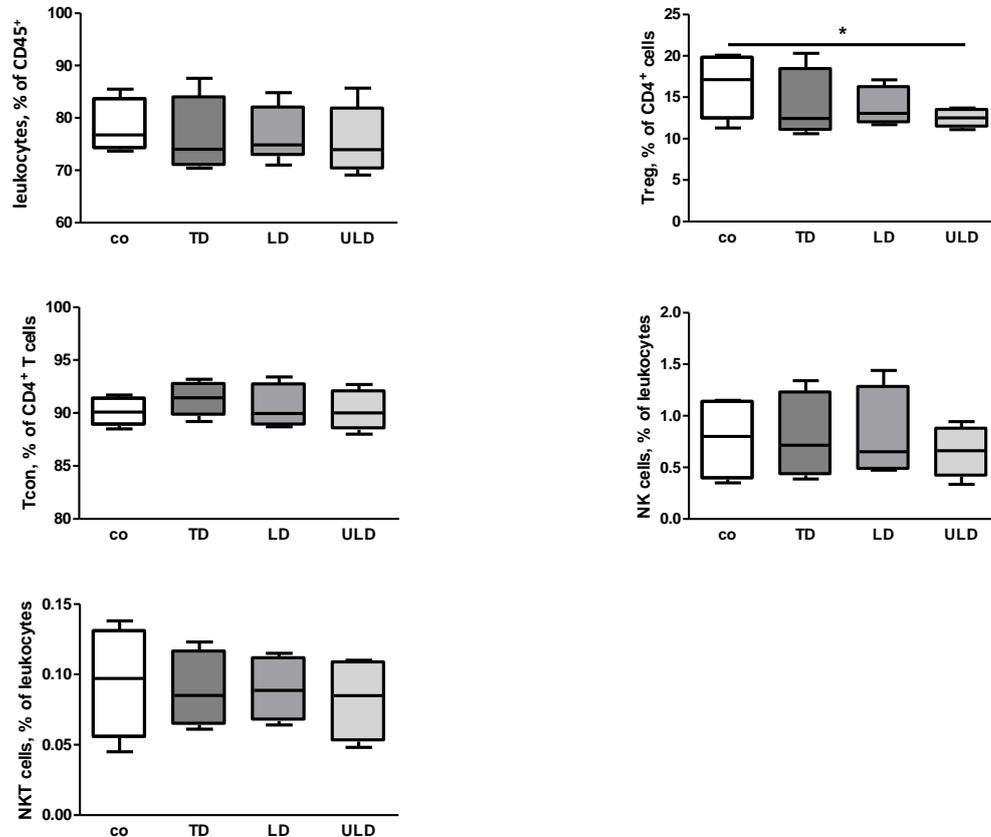


Abb. 3.5.1.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Leukozyten, der T-Zell-Subpopulationen, NK-Zellen und den NKT-Zellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Die Behandlungsgruppe mit der sehr niedrig dosierten metronomischen Chemotherapie (ULD) 5 FU wies bei der durchflusszytometrischen Untersuchung eine signifikant niedrigere Anzahl an Treg-Zellen, im Vergleich mit den Kontrollen, auf (Abb. 3.5.1.2.1).

3.5.1.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die MDSC und Makrophagen

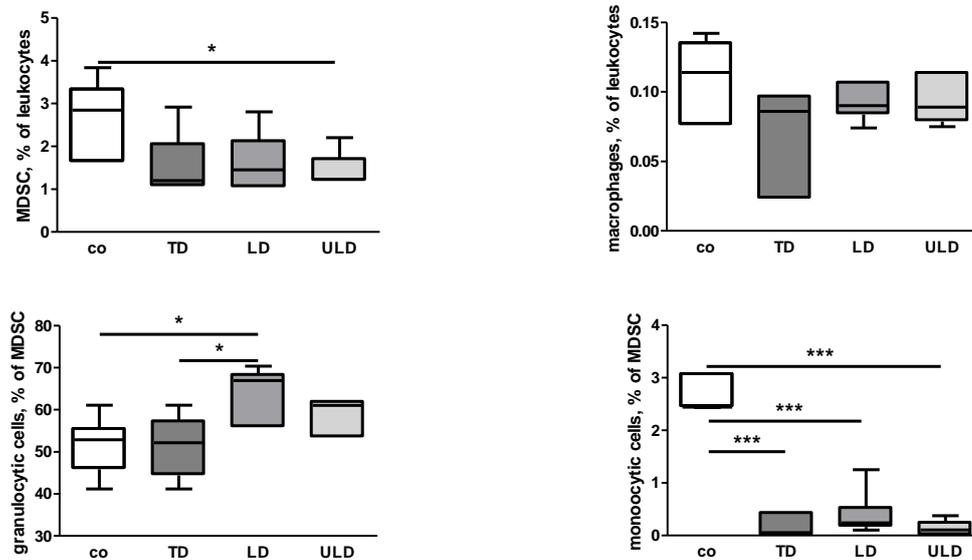


Abb. 3.5.1.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen, der MDSC und deren Subpopulationen granulozytäre und monozytäre MDSC aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05, ***p<0,001).

Die Kontrollgruppe unterscheidet sich von der Behandlungsgruppe ULD 5 FU, hinsichtlich der MDSC Population, durch den Nachweis einer signifikant höheren Anzahl dieser Zellen. Betrachtet man die Subpopulationen der MDSC, so erkennt man eine signifikant höhere Anzahl an granulozytären MDSC unter der Behandlung mit LD, im Vergleich zur Behandlung unter TD und den Kontrollen. Beim Blick auf die monozytären MDSC lässt sich eine signifikante Überlegenheit der Kontrollen gegenüber allen Behandlungsgruppen sofort erkennen (Abb. 3.5.1.3.1).

3.5.1.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die DZ

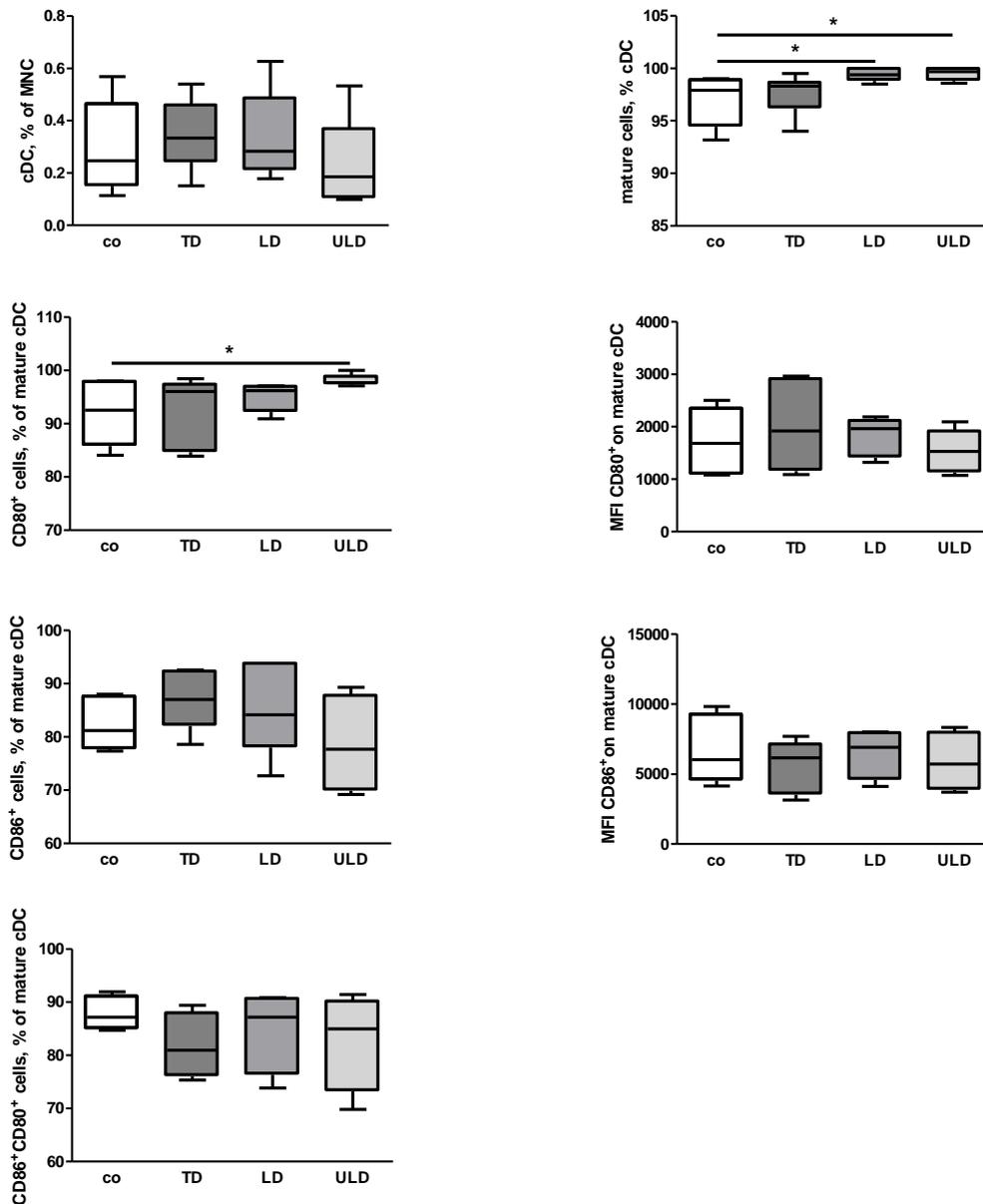


Abb. 3.5.1.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells), CD80⁺/CD86⁺- und CD80⁺CD86⁺-Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

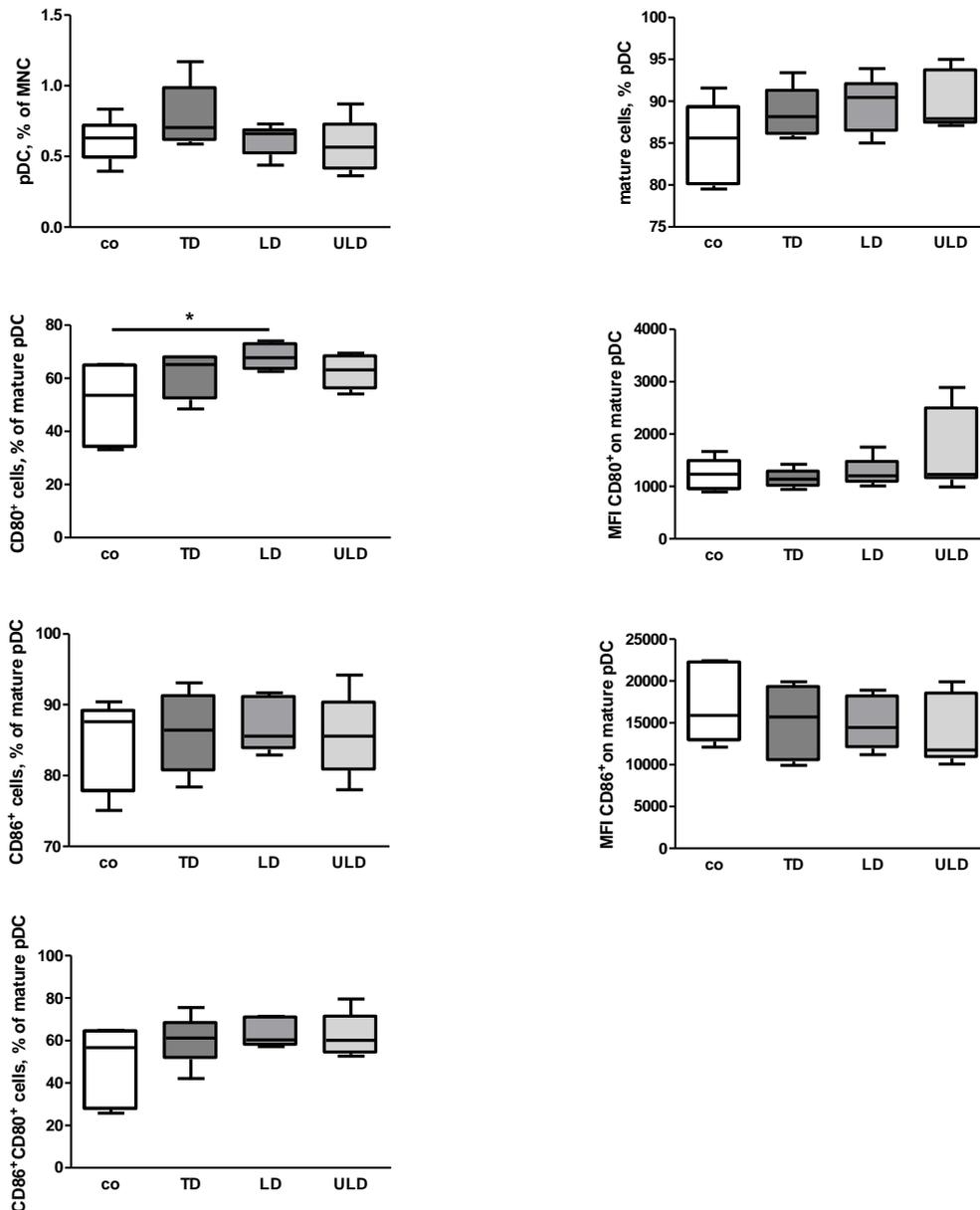


Abb. 3.5.1.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells), CD80⁺/CD86⁻- und CD80⁺CD86⁺-Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) 5 FU ist die Anzahl der ausgereiften cDZ signifikant höher als bei den Kontrollen. Ebenso konnten unter der Therapie mit ULD signifikant mehr Reifungsmarker (CD80⁺) der ausgereiften cDZ, im Vergleich mit den Kontrollen, nachgewiesen werden (Abb. 3.5.1.4.1). Die Anzahl der Reifungsmarker (CD86⁺) der pDZ war unter der LD Therapie mit 5 FU ebenso signifikant höher als bei den Kontrollen (Abb. 3.5.1.4.2).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vitro Experiments (Milzzellen tumortragender Mäuse) festhalten, dass die Behandlung mit 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten				
Lymphozyten				
CD19				
CD8	50	100	75	50
CD4				
Effektorzellen CD4				
naive Zellen CD4				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4				
Effektorzellen CD8				
naive Zellen CD8				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8	100	25	50	75
Treg	100	75	75	75
Tcon				
NK				
NKT				
Makrophagen				
MDSC	100	50	75	50
gran. MDSC	50	50	100	75
monozyt. MDSC	100	25	25	25
cDZ				
mature cDC	75	75	100	100
CD80 mature cDZ	50	75	75	100
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ				
pDZ				
mature pDC				
CD80 mature pDZ	50	75	100	75
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ				

Abb. 3.5.1.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, *in vitro*

In der Abb. 3.5.1.4.3 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.5.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin

3.5.2.1 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

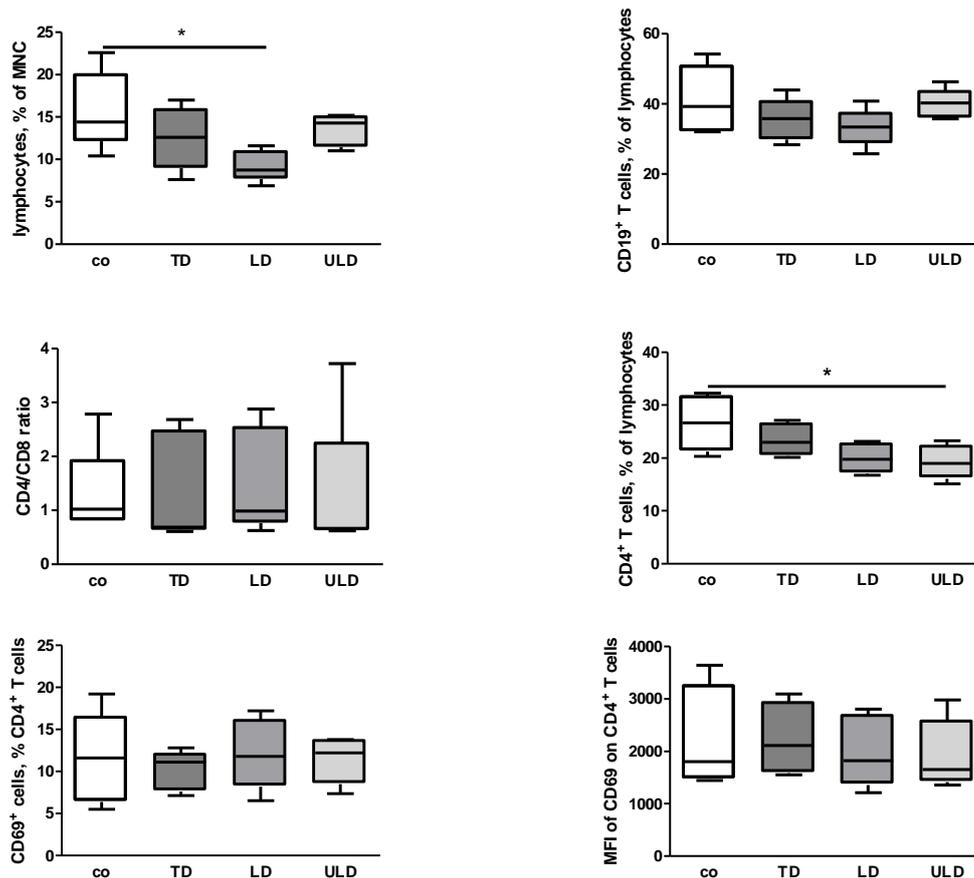


Abb. 3.5.2.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozyten, der B-Zellen, CD4/CD8 Ratio, CD4⁺-T-Zellpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Betrachtet man die Lymphozytenpopulationen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe nebeneinander, sticht die signifikant höhere Anzahl der Lymphozyten der Kontrollen im Vergleich zu der LD Behandlungsgruppe ins Auge. Auch die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen fällt für die Kontrollgruppe quantitativ am besten aus. Hierbei wiesen die Kontrollen im Vergleich mit der ULD Behandlungsgruppe signifikant mehr CD4⁺-T-Zellen auf (Abb. 3.5.2.1.1).

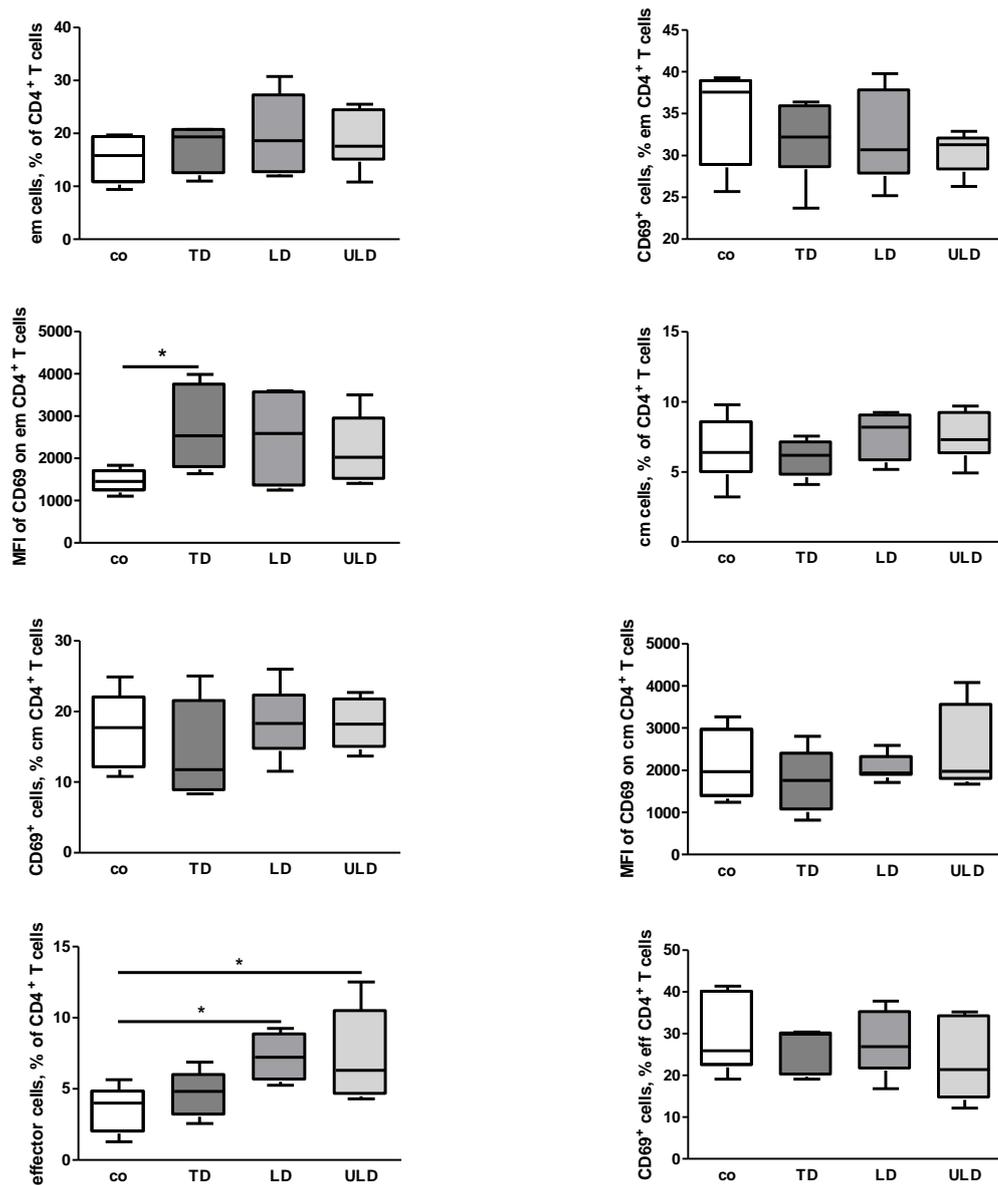


Abb. 3.5.2.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

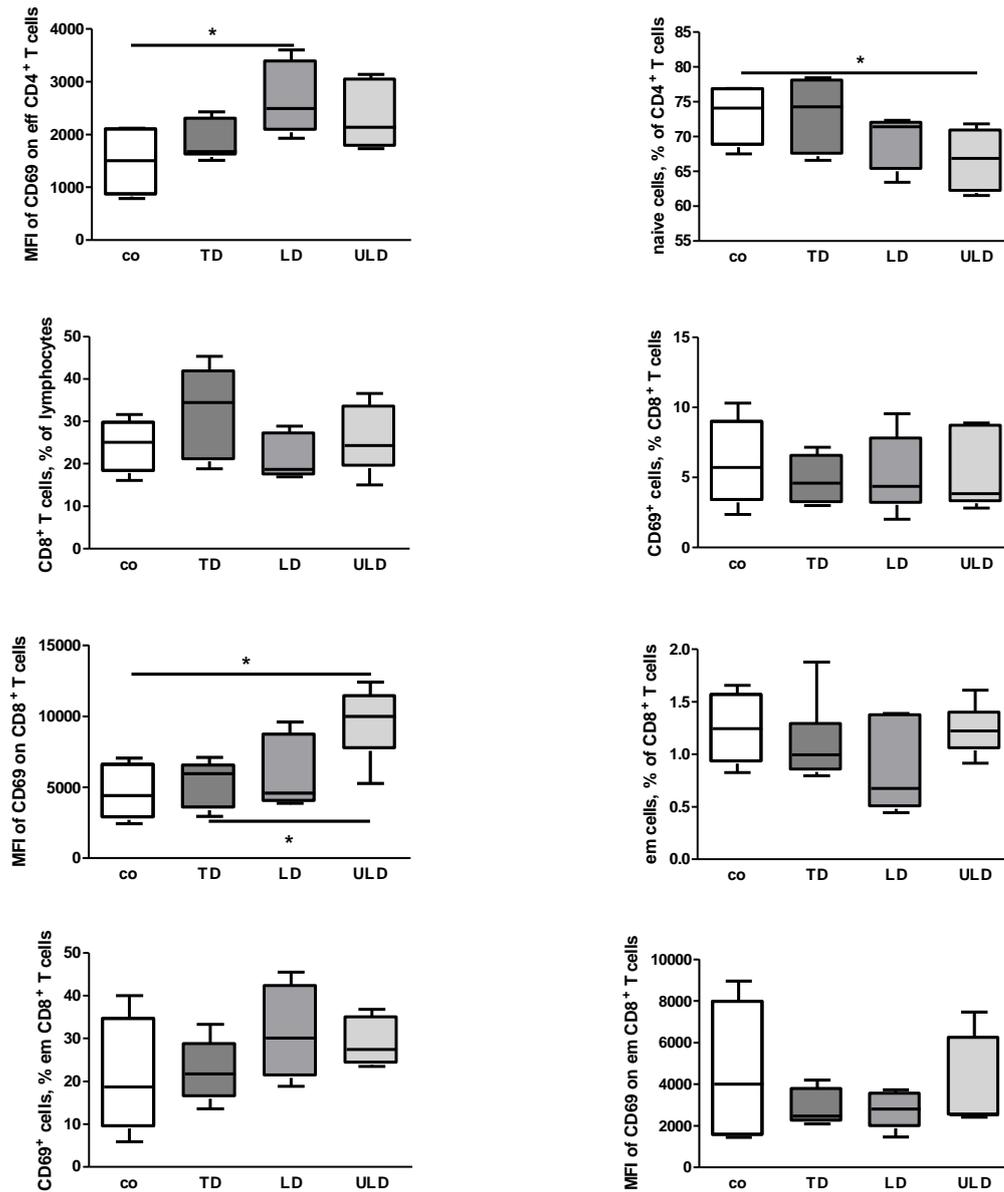


Abb. 3.5.2.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zellpopulationen, der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

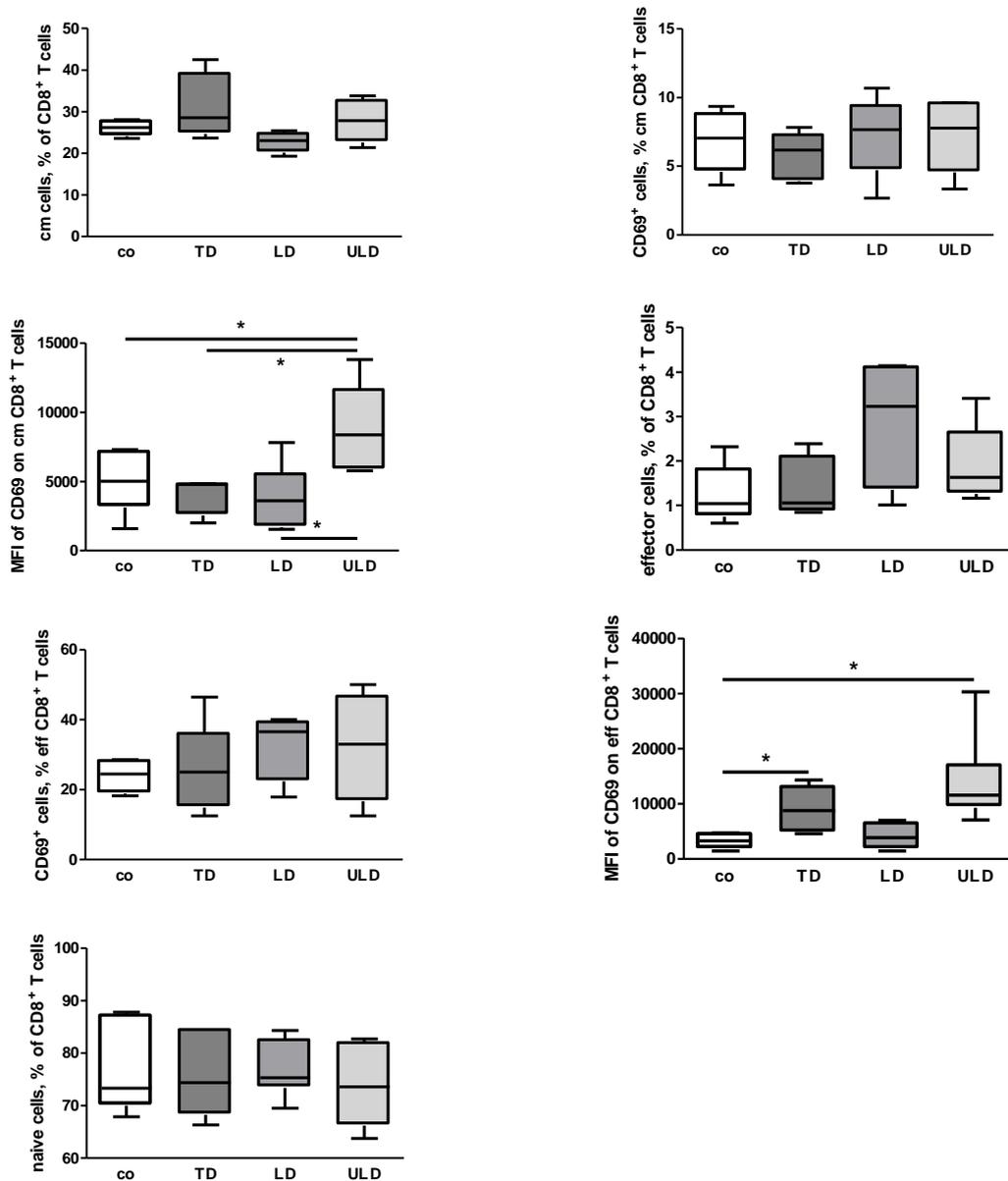


Abb. 3.5.2.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen, CD69⁺-Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8⁺-T-Zell-Subpopulationen präsentierte sich die TD Behandlungsgruppe mit Gemcitabin, im direkten Vergleich mit den Kontrollen, hinsichtlich der MFI der Aktivierungsmarker der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CD69) quantitativ deutlich überlegen. Des Weiteren war die Anzahl der Effektor-T-Zellen unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) signifikant höher als bei den unbehandelten Proben (Abb. 3.5.2.1.2). Die MFI der Aktivierungsmarker der Effektor-T-Zellen (CD69) war unter LD Gemcitabin signifikant höher als bei den Kontrollen. Der prozentuale Anteil der naiven T-Zellen (CD69⁻) war bei den Kontrollen

signifikant höher als unter der Therapie mit ULD Gemcitabin. Die MFI der Aktivierungsmarker der CD8⁺-T-Zellen war jedoch unter der sehr niedrig dosierten Chemotherapie (ULD) signifikant höher als unter der therapeutischen Dosierung (TD) und der Kontrollgruppe (Abb. 3.5.2.1.3). Dasselbe Ergebnis lieferte die Untersuchung auf die MFI der Aktivierungsmarker der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD8). Hierbei lag die MFI der Aktivierungsmarker der Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen (CD8) unter ULD signifikant höher als unter LD, TD und den Kontrollen. Darüber hinaus konnten die Behandlungsgruppen TD und ULD Gemcitabin hinsichtlich der MFI der Aktivierungsmarker der Effektor-T-Zellen (CD8) eine signifikante Überlegenheit im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen (Abb. 3.5.2.1.4).

3.5.2.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

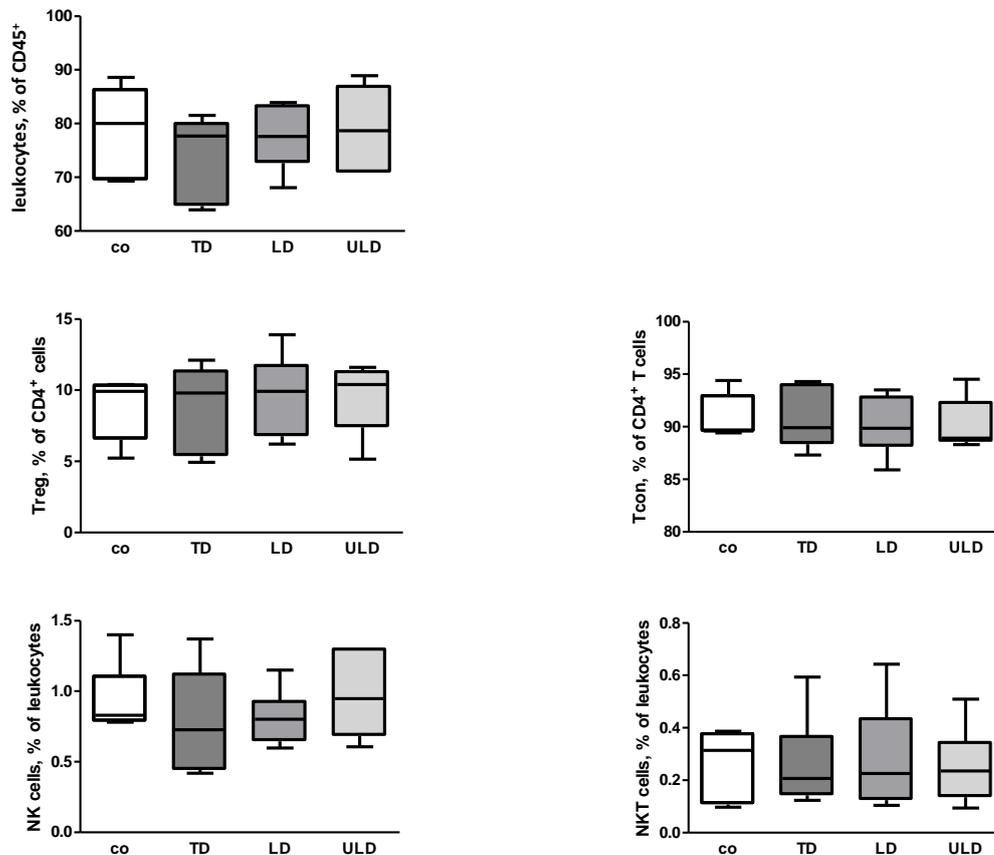


Abb. 3.5.2.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Leukozyten, der T-Zell-Subpopulationen, NK-Zellen und den NKT-Zellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe).

3.5.2.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die MDSC und Makrophagen

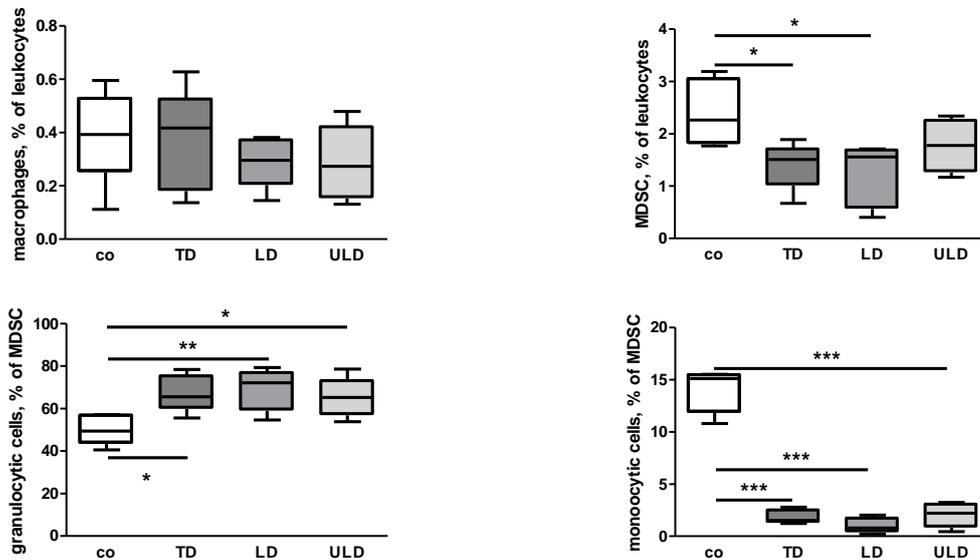


Abb. 3.5.2.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen, der MDSC und deren Subpopulationen granulocytäre und monozytäre MDSC aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Unter der Behandlung mit TD und LD Gemcitabin wurden signifikant weniger MDSC in Relation zur Anzahl der MDSC der Kontrollen nachgewiesen. Betrachtet man die granulocytären MDSC, so lässt sich auf einen Blick erkennen, dass alle Behandlungsgruppen signifikant mehr granulocytäre MDSC aufwiesen, im Vergleich zu den Kontrollen. Genau umgekehrt verhält es sich mit der Population der monozytären MDSC. Hier konnten durchflusszytometrisch signifikant weniger MDSC unter der Behandlung mit TD, LD und ULD Gemcitabin, verglichen mit den Kontrollen, identifiziert werden (Abb. 3.5.2.3.1).

3.5.2.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die DZ

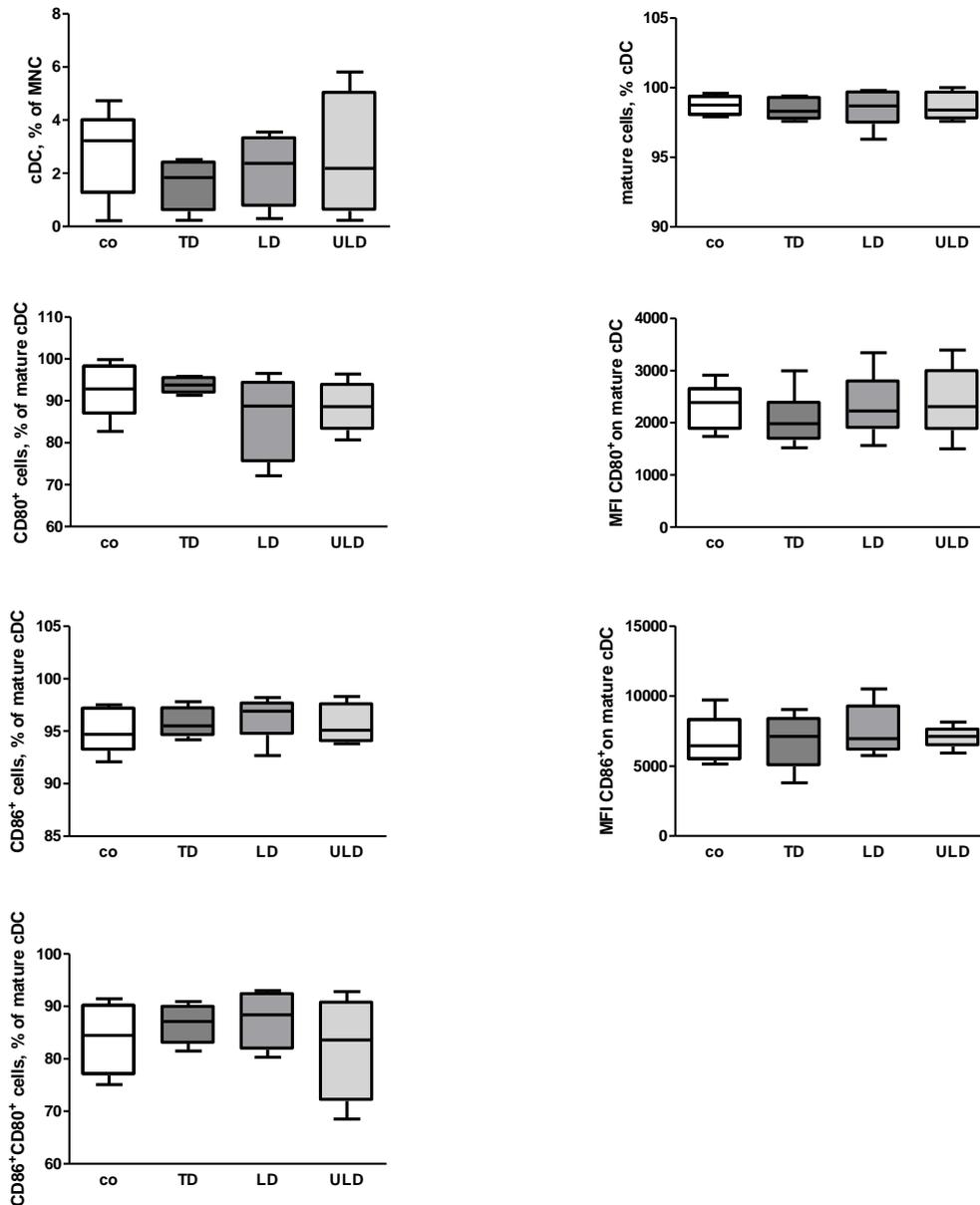


Abb. 3.5.2.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells), CD80⁺/CD86⁻- und CD80⁺CD86⁺-Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe).

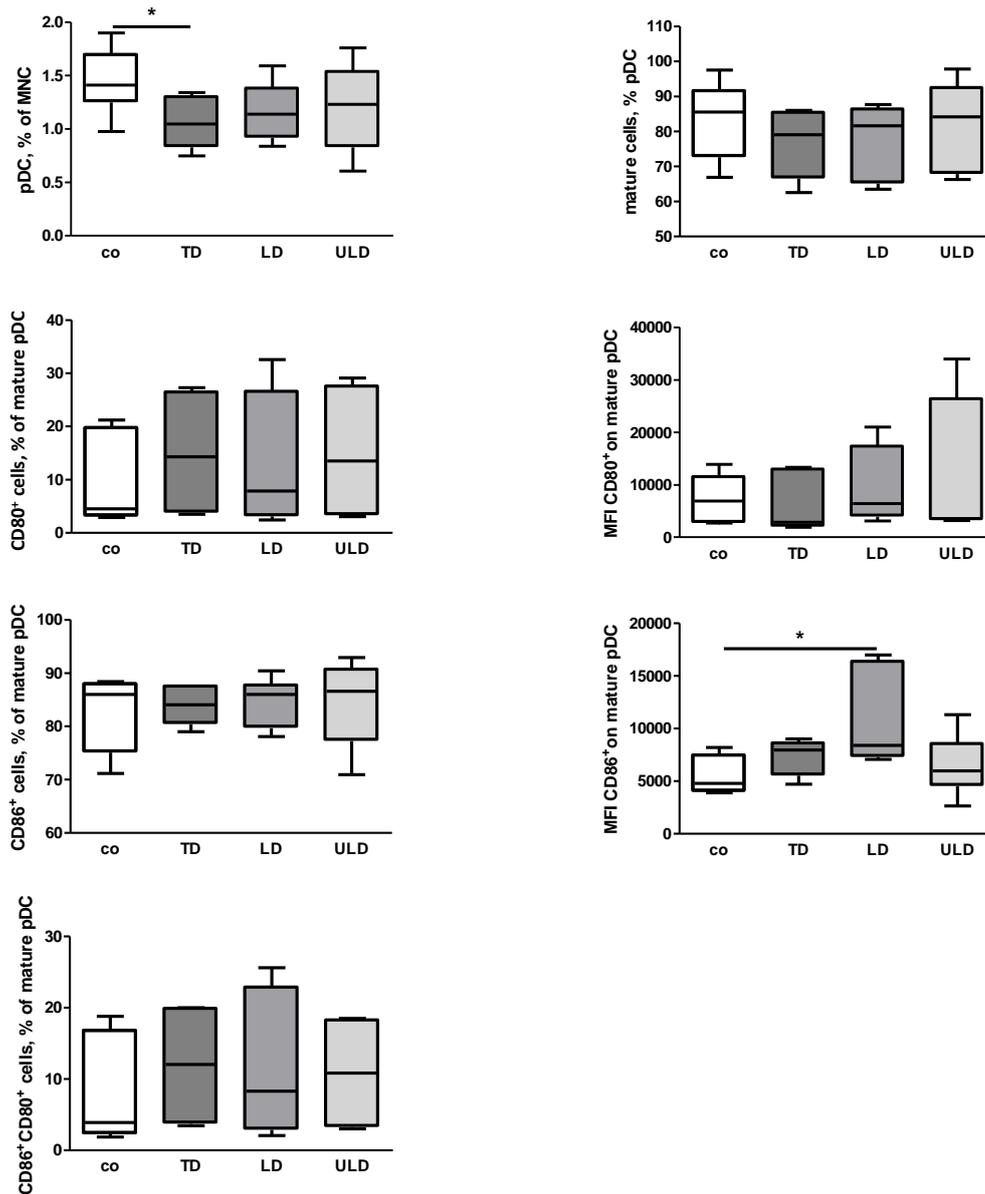


Abb. 3.5.2.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDC (mature cells), CD80⁺/CD86⁻ und CD80⁺CD86⁺-Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n=6 pro Gruppe; *p<0,05).

Unter der Behandlung mit TD Gemcitabin konnten signifikant weniger pDC im Vergleich mit den Kontrollen markiert und gemessen werden. Die MFI der Reifungsmarker (CD86⁺) der ausgereiften pDC war unter der Therapie mit LD Gemcitabin signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (Abb. 3.5.2.4.2).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vitro Experiments (Milzzellen tumortragender Mäuse) festhalten, dass die Behandlung mit Gemcitabin in unterschiedlichen Dosierungen immunmodulatorische Auswirkungen hat:

Zellen:	Kontrollen	TD	LD	ULD
Leukozyten				
Lymphozyten	100	75	50	100
CD19				
CD8				
CD4	100	75	50	50
Effektorzellen CD4	25	50	100	75
naive Zellen CD4	100	100	75	50
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD4				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD4				
Effektorzellen CD8				
naive Zellen CD8				
Effektor-Gedächtnis-Zellen CD8				
Zentrale-Gedächtnis-Zellen CD8				
Treg				
Tcon				
NK				
NKT				
Makrophagen				
MDSC	100	50	50	75
gran. MDSC	50	75	100	75
monozyt. MDSC	100	25	25	25
cDZ				
mature cDC				
CD80 mature cDZ				
CD86 mature cDZ				
CD80/CD86 mature cDZ				
pDZ	100	50	50	75
mature pDC				
CD80 mature pDZ				
CD86 mature pDZ				
CD80/CD86 mature pDZ				

Abb. 3.5.2.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, in vitro

In der Abb. 3.5.2.4.3 sind die signifikanten Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.6 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen (in vitro)

Die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen galt es in folgenden Experimenten genauer zu untersuchen. Ziel dieser Versuche war, den Einfluss der konventionellen, im Vergleich zur metronomischen Chemotherapie, auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen zu prüfen. Dafür wurden die Mäuse im Alter von 8 Wochen operiert und Panc02-Zellen implantiert. Nach 28 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Primärtumoren entnommen.

Die CD45⁺-Zellen (Tils) wurden magnetisch markiert, von den CD45⁻-Zellen separiert und danach kultiviert (Kapitel 2.2.6 MACS). Je nach Behandlungsgruppe wurden die Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen (therapeutische, niedrige und sehr niedrige Konzentration) zu den Zellkulturen pipettiert. Zur Kontrolle wurden nicht therapierte Zellkulturen angelegt. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl bestimmt und auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml gebracht.

Parallel wurden separat gezüchtete Panc02-Zellen, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben geerntet und auf eine Konzentration von 10^5 gebracht. Im folgenden Schritt wurden die Proben, je nach gewünschtem Konzentrationsverhältnis der Zielzellen zu den Effektorzellen (Panc02:Tils), pipettiert und in Medium aufgenommen. Untersucht wurden folgende Verhältnisse der Zielzellen zu den Effektorzellen: 1:5, 1:10, 1:20. Das Pipettierschema und die Kultivierung der Zellen sind im Kapitel 2.2.6.2.3 genauer beschrieben.

Nach weiteren 12h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Das weitere Vorgehen folgte dem Protokoll der Durchflusszytometrie (Kapitel 2.2.5.2).

Nachdem die Proben vom Durchflusszytometer analysiert wurden, erfolgte die Auswertung der Zellpopulationen mittels FlowJo-Software. Die dabei verwendete Auswertungsstrategie ist in Abb. 3.6.1.1 dargestellt.

3.6.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der lebenden und toten CD45⁻-Zellen und der CD45⁺-Zellen im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T- und NK-Zellen

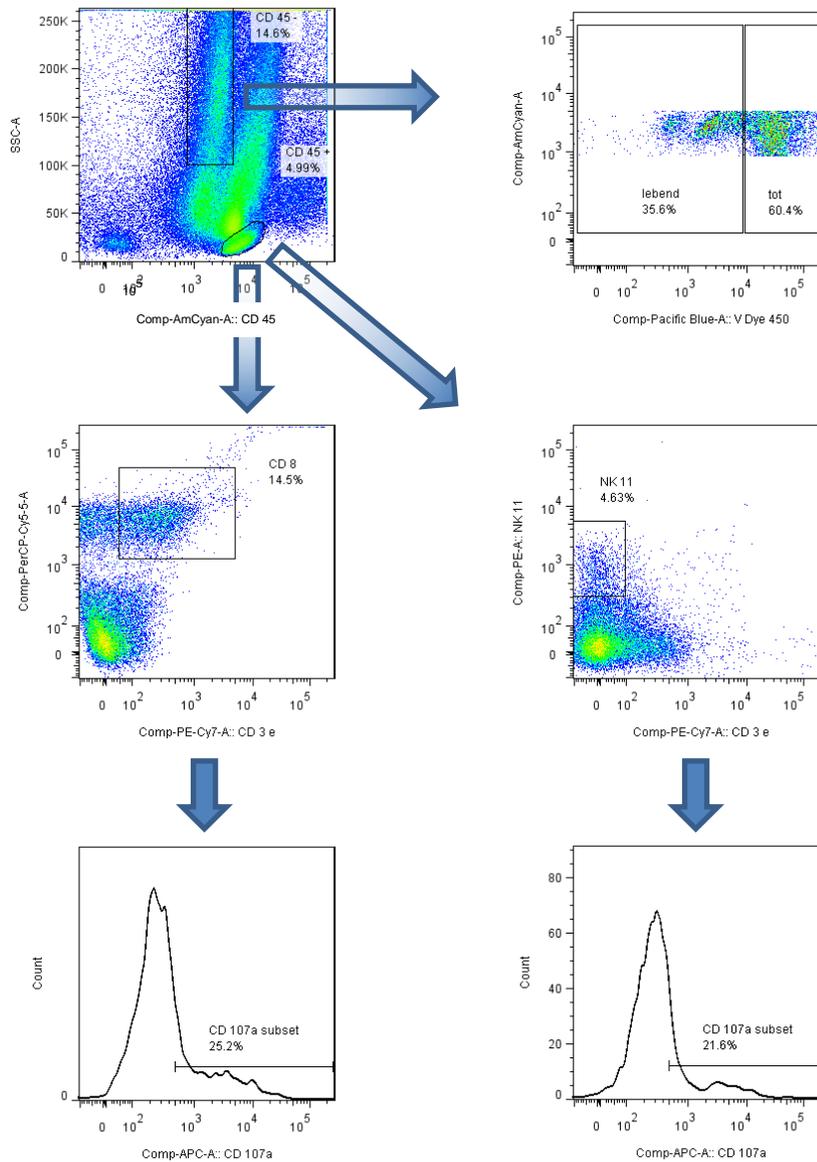


Abb. 3.6.1.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der lebenden und toten CD45⁻-Zellen und der CD45⁺-Zellen im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T- und NK-Zellen mittels FlowJo-Software. Aus der gesamten Zellpopulation wurden anhand des „side scatter“ (SSC) und CD45⁺, die CD45⁺-Zellen von den CD45⁻-Zellen selektiert. Mit Hilfe des Antikörpers V Dye wurden aus der CD45⁺ Zellpopulation (Panc02-Zellen) die lebenden von den toten Zellen abgegrenzt. Die CD45⁺-Zellen konnten durch die Markierung mit CD3 und CD8 bzw. NK11 weiter differenziert werden. Das Histogramm von CD107a zeigt den Anteil der degranulierten Zellen.

3.6.2 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T- und NK-Zellen

3.6.2.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen

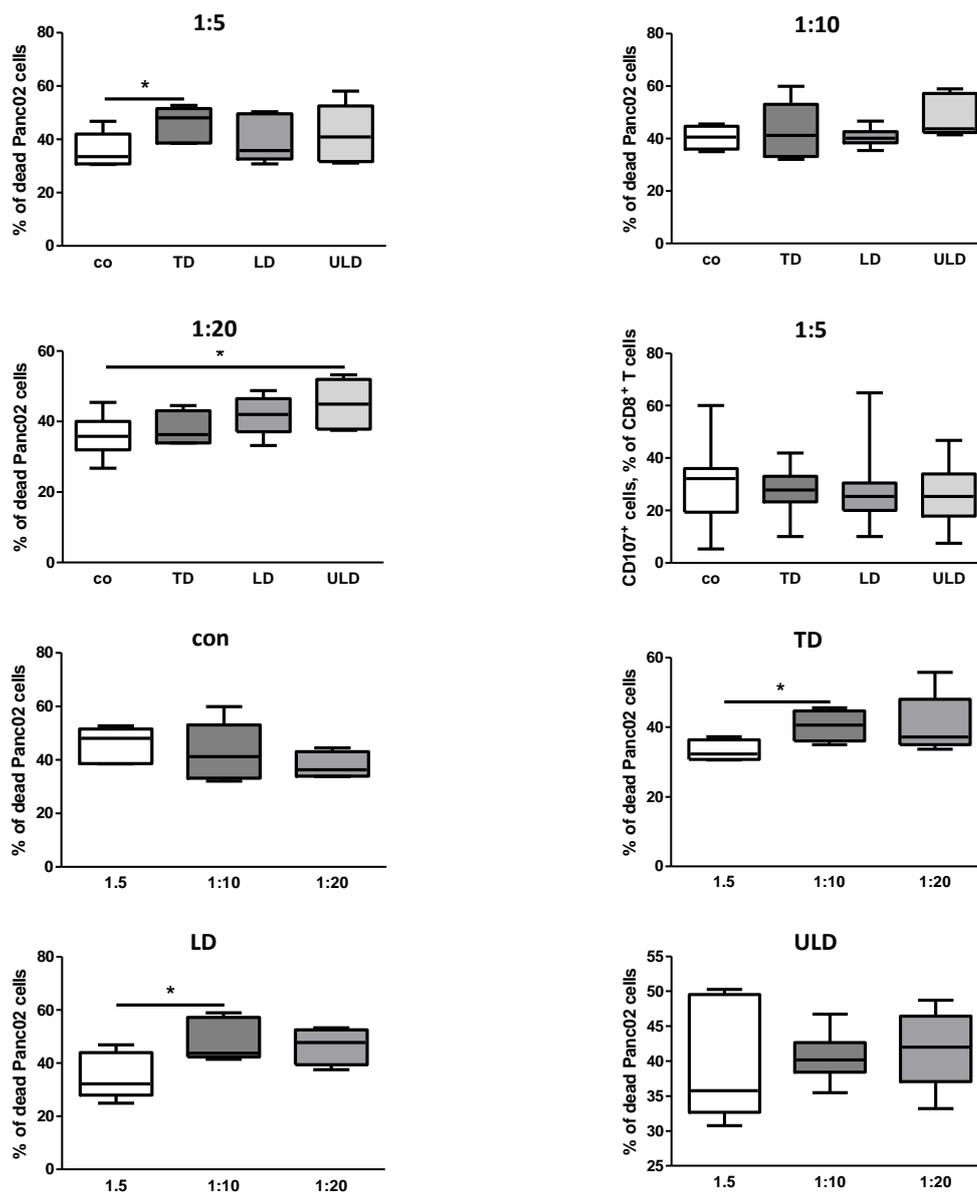


Abb. 3.6.2.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der toten Panc02-Zellen, der CD107⁺-Zellen (Marker für Degranulation) und der CD8⁺-T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen. 1:5, 1:10 und 1:20 kennzeichnen die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse zwischen den Zielzellen (Panc02-Zellen) und den Effektorzellen (Tils), Zielzelle:Effektorzelle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 6 pro Gruppe, n= 6 pro Konzentrationsverhältnis 1:5, 1:10, 1:20; *p<0,05).

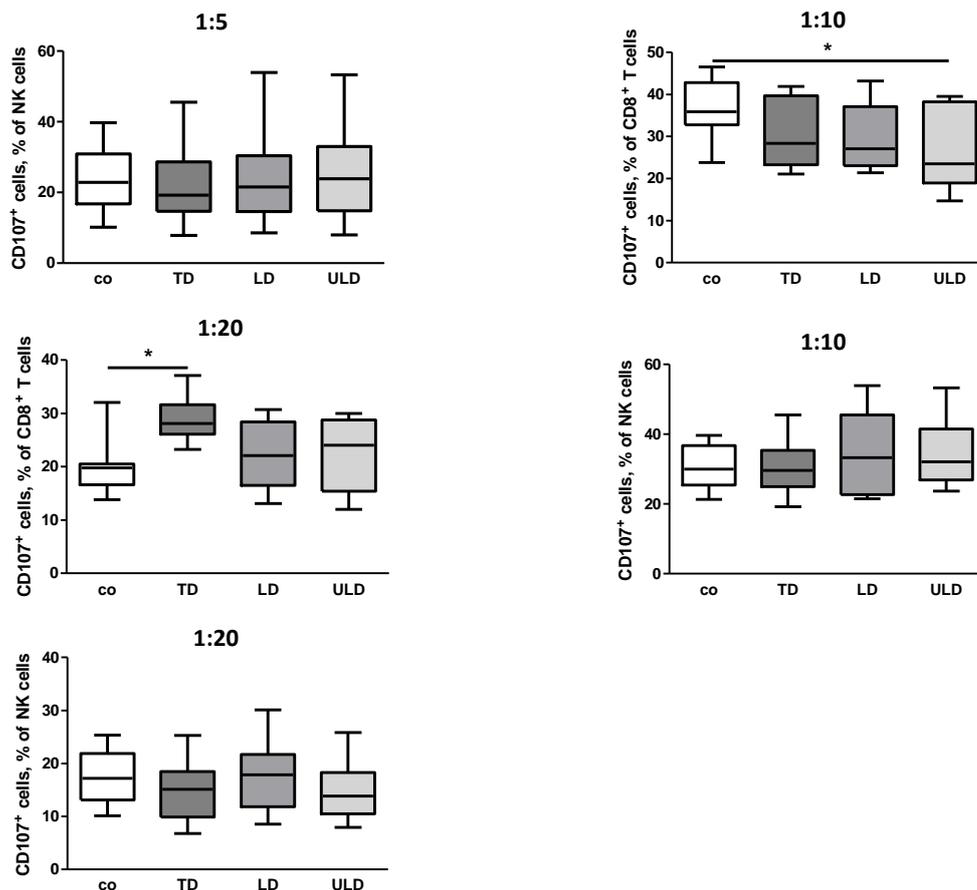


Abb. 3.6.2.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107⁺-Zellen der NK- und CD8⁺-T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 6 pro Gruppe; *p<0,05).

Betrachtet man die Anzahl der toten Panc02-Zellen der unterschiedlichen Therapiegruppen, so kann eine signifikant höhere Menge unter TD (1:5), im Vergleich zu den Kontrollen, festgestellt werden. Ebenso wurde unter ULD (1:20), in Relation zu den unbehandelten Proben, eine signifikant höhere Anzahl der toten Panc02-Zellen nachgewiesen (Abb. 3.6.2.1.1). Um die Relevanz der Konzentrationsverhältnisse zwischen den Zielzellen (Panc02) und den Effektorzellen (Tils) auf die Anzahl der toten Panc02-Zellen zu analysieren, wurden die Therapiegruppen in Abb. 3.6.2.1.1 nebeneinander dargestellt. Beim Vorliegen des Verhältnisses von 1:10 (TD und LD) der Panc02-Zellen zu den Tils, konnten signifikant mehr tote Panc02-Zellen ermittelt werden als unter dem Verhältnis von 1:5 (TD und LD). Unter der Therapie mit ULD (1:10) 5 FU konnten signifikant weniger CD107⁺-Zellen und damit weniger Degranulation der CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Eine weitere Untersuchung ergab unter der Therapie mit TD (1:20) eine signifikante Erhöhung des Degranulationsmarkers CD107 der CD8⁺-T-Zellen verglichen mit den Kontrollen. Die NK-Zellen wiesen keine bedeutenden Unterschiede hinsichtlich der Degranulation in den unterschiedlichen Therapiegruppen auf (Abb. 3.6.2.1.2).

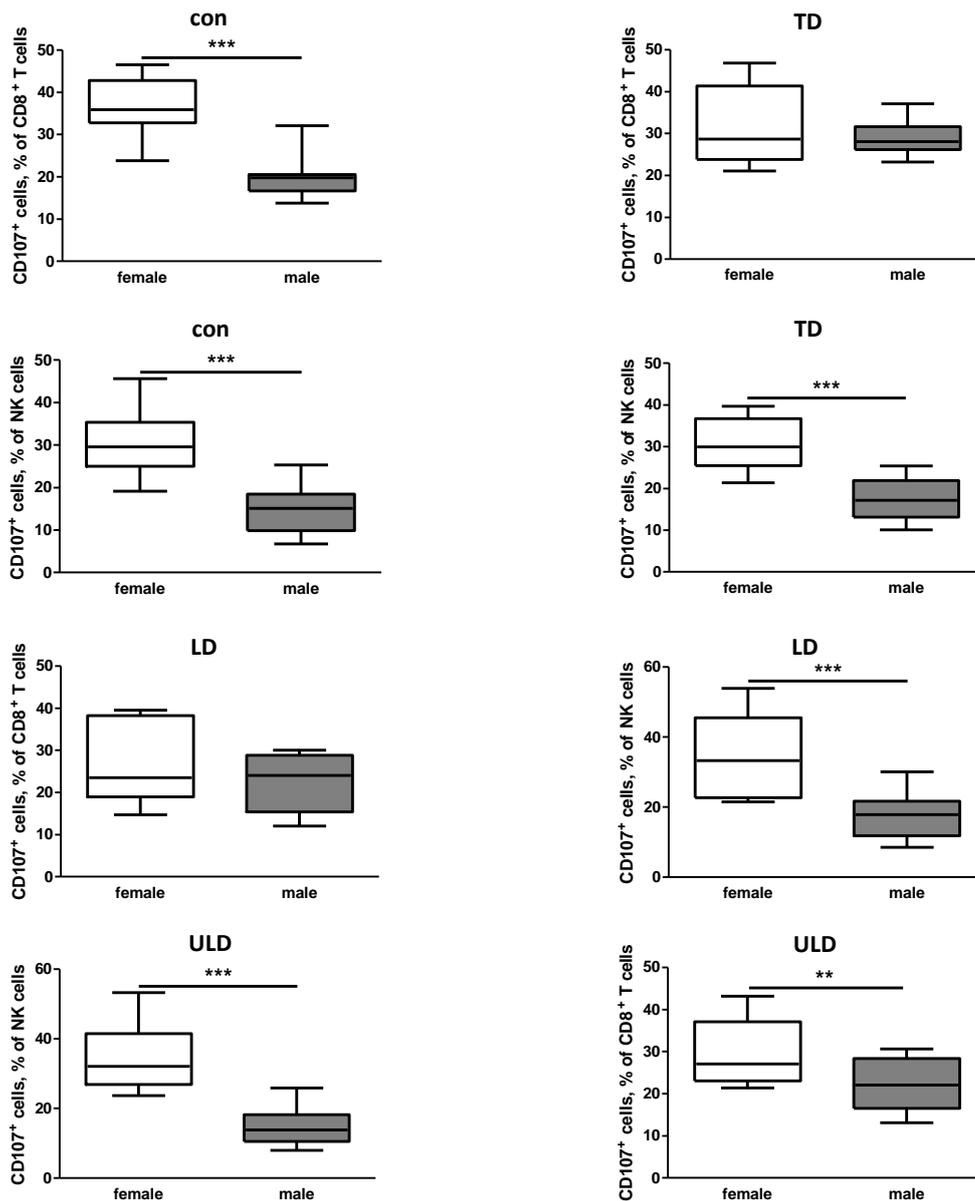


Abb. 3.6.2.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107⁺-Zellen der NK- und CD8⁺-T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen und des Geschlechts. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaired T-test (SE, n= 9 weiblich, 9 männlich; **p<0,01, ***p<0,001).

Abb. 3.6.2.1.3 zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Degranulation unter der Therapie mit 5 FU. Hierbei liegt bei der Gegenüberstellung beider Geschlechter eine signifikante Erhöhung des Degranulationsmarkers CD107 der CD8⁺-T-Zellen ebenso wie der NK-Zellen bei den weiblichen Probanden vor.

3.6.2.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen

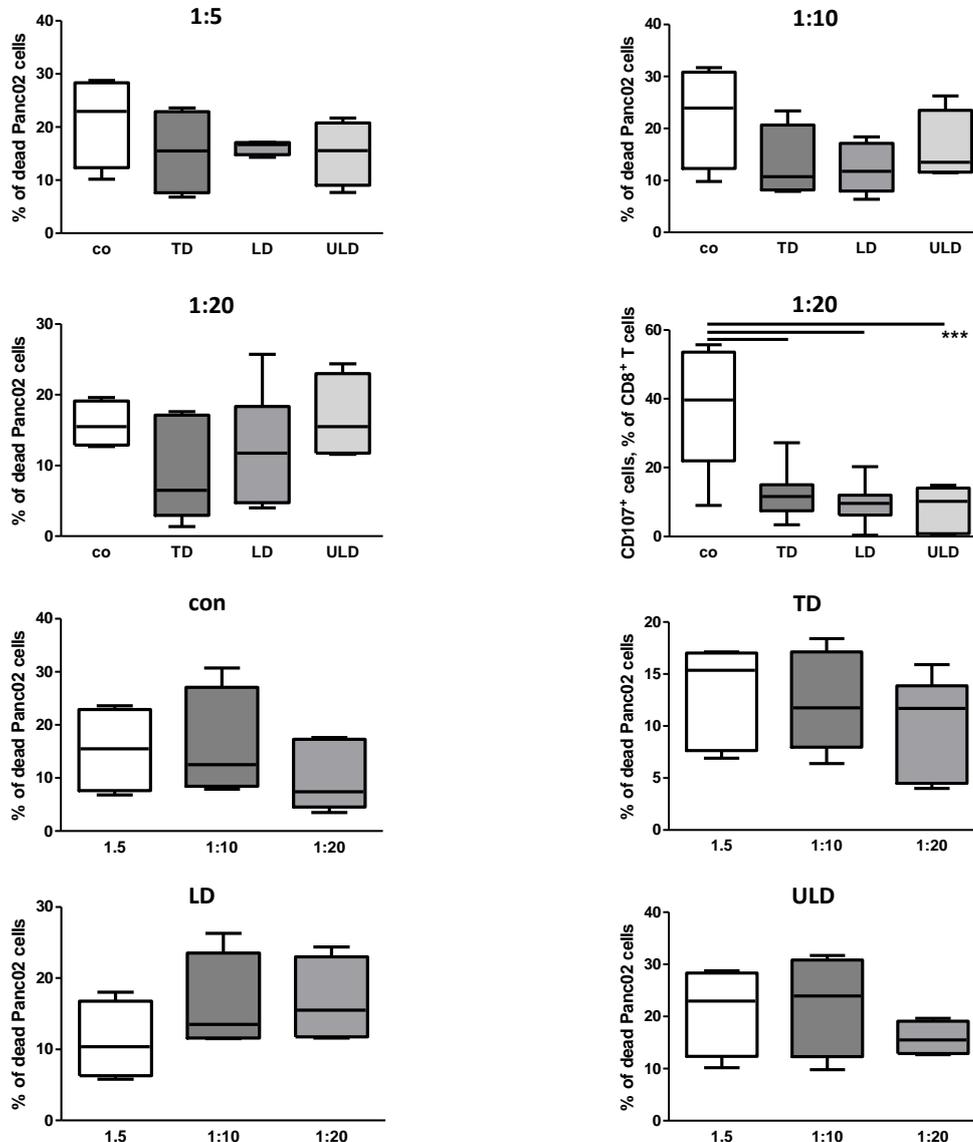


Abb. 3.6.2.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der toten Panc02-Zellen und der CD107⁺-Zellen der CD8⁺-T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen. 1:5, 1:10 und 1:20 kennzeichnen die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse zwischen den Zielzellen (Panc02-Zellen) und den Effektorzellen (Tils), Zielzelle:Effektorzelle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 6 pro Gruppe, n= 6 pro Konzentrationsverhältnis 1:5, 1:10, 1:20; ***p<0,001).

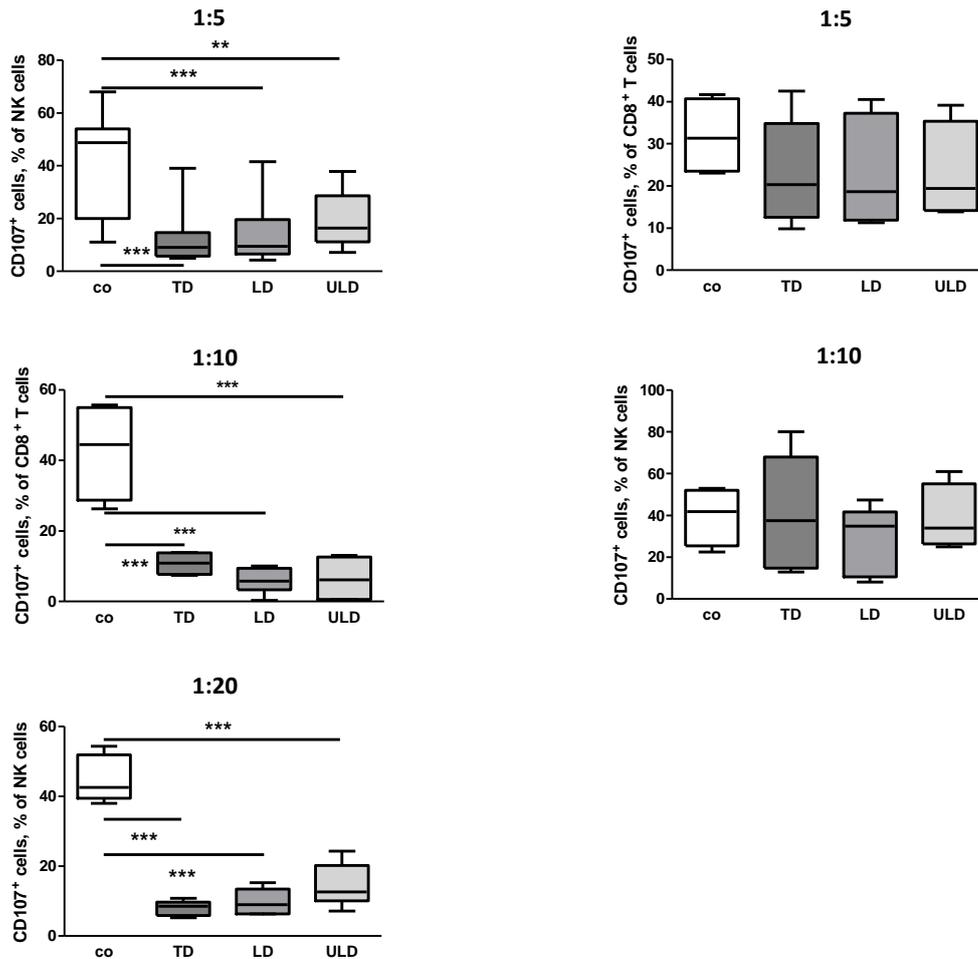
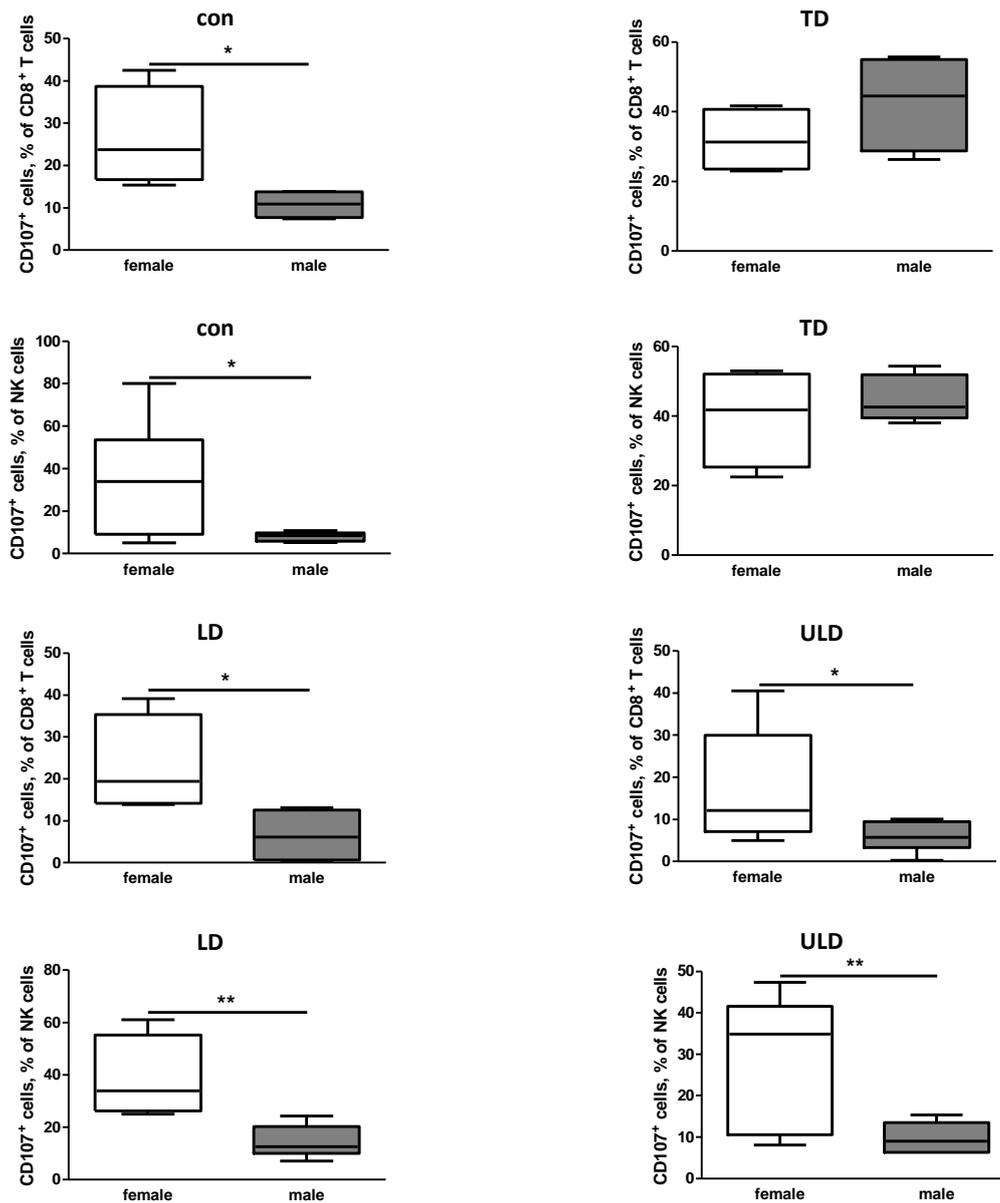


Abb. 3.6.2.2.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107⁺-Zellen der NK- und CD8⁺-T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 6 pro Gruppe; **p<0,01, ***p<0,001).

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Immunzellen aus den Mediumüberständen der Tumoren konnten nach der Therapie mit Gemcitabin größtenteils weniger tote Panc02-Zellen im Vergleich mit den Kontrollen nachgewiesen werden. Die Konzentrationsverhältnisse der Zielzellen zu den Effektorzellen hatten tendenziell keinen Einfluss auf die Anzahl der toten Panc02-Zellen (Abb. 3.6.2.2.1). Die Kontrollen wiesen signifikant mehr CD107⁺-Zellen auf als unter der Therapie mit TD, LD und ULD. Dieses Ergebnis wurde für den Anteil der CD107⁺-Zellen der NK-Zellen ebenso wie der CD8⁺-T-Zellen erzielt (Abb. 3.6.2.2.2).



Die Behandlung mit Gemcitabin zeigte dieselbe geschlechtsspezifische Wirkung wie 5 FU. Bei den weiblichen Probanden konnte im Gegensatz zu den männlichen Probanden ein signifikant höherer Anteil der Degranulationsmarker der NK- und CD8⁺-T-Zellen dokumentiert werden (Abb. 3.6.2.2.3).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des *in vitro* Experiments nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika festhalten, dass die Therapie mit 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der NK- und

CD8⁺-T-Zellen keinen bedeutenden Einfluss hat. Besonders aufgefallen sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Untersuchung auf den Degranulationsmarker. Der Anteil der CD107⁺-Zellen der NK- ebenso wie der CD8⁺-T-Zellen der weiblichen Probanden war unter 5 FU und Gemcitabin signifikant höher als bei den männlichen Tieren (Abb. 3.6.2.1.3, Abb. 3.6.2.2.3).

3.7 Bestimmung der Zytokine des Blutserums der tumortragenden Mäuse und der Mediumüberstände von den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vivo und in vitro (Luminex)

Ziel dieses Experiments war es herauszufinden, ob die Behandlung der Mäuse in vivo oder die Therapie in vitro mit den Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin einen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung hat. Dafür wurden die Serum- und Mediumüberstände der Tiere untersucht. Wichtig war hierbei der Vergleich zwischen den konventionell und metronomisch behandelten Tieren/Proben. Als Referenz wurden die Seren und Mediumüberstände der unbehandelten Tiere/Proben (Kontrollen) gemessen und statistisch ausgewertet.

Im Alter von 8 Wochen wurden den Mäusen die Pankreaskarzinomzellen der syngenen Linie Panc02 orthotop implantiert. Die Tiere der in vivo Experimente wurden je nach Behandlungsgruppe mit therapeutisch (TD), niedrig (LD) oder sehr niedrig dosierter (ULD) Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin therapiert. Nach 28 Tagen wurden die Mäuse anästhesiert und Blut aus dem Herzen entnommen. Die Blutproben wurden nach der Entnahme zentrifugiert und der Serumüberstand für die Zytokinbestimmung verwendet. Bei den in vitro Experimenten erfolgte die Implantation der Panc02-Zellen wie oben beschrieben. Nach 28 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Milzen und Primärtumoren entnommen. Die Herstellung der Einzelzellsuspensionen und die Behandlung mit den jeweiligen Konzentrationen der Standard-Chemotherapeutika der Milz- und Tumorzellen (Tils) erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben. Nach 24h Inkubation der Zellkulturen wurden die Zellen geerntet, zentrifugiert und der Mediumüberstand zur Zytokinbestimmung gewonnen.

Um die jeweiligen Zytokinkonzentrationen zu bestimmen, wurden die Seren und Mediumüberstände der Milzen und Tumoren (Tils) gemäß dem Milliplex MAP Kit-Protokoll (Kapitel 2.2.7) bearbeitet, inkubiert und mit dem Gerät Luminex 200°™ analysiert und danach ausgewertet.

3.7.1 Ergebnisse der Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU, in vivo (Luminex)

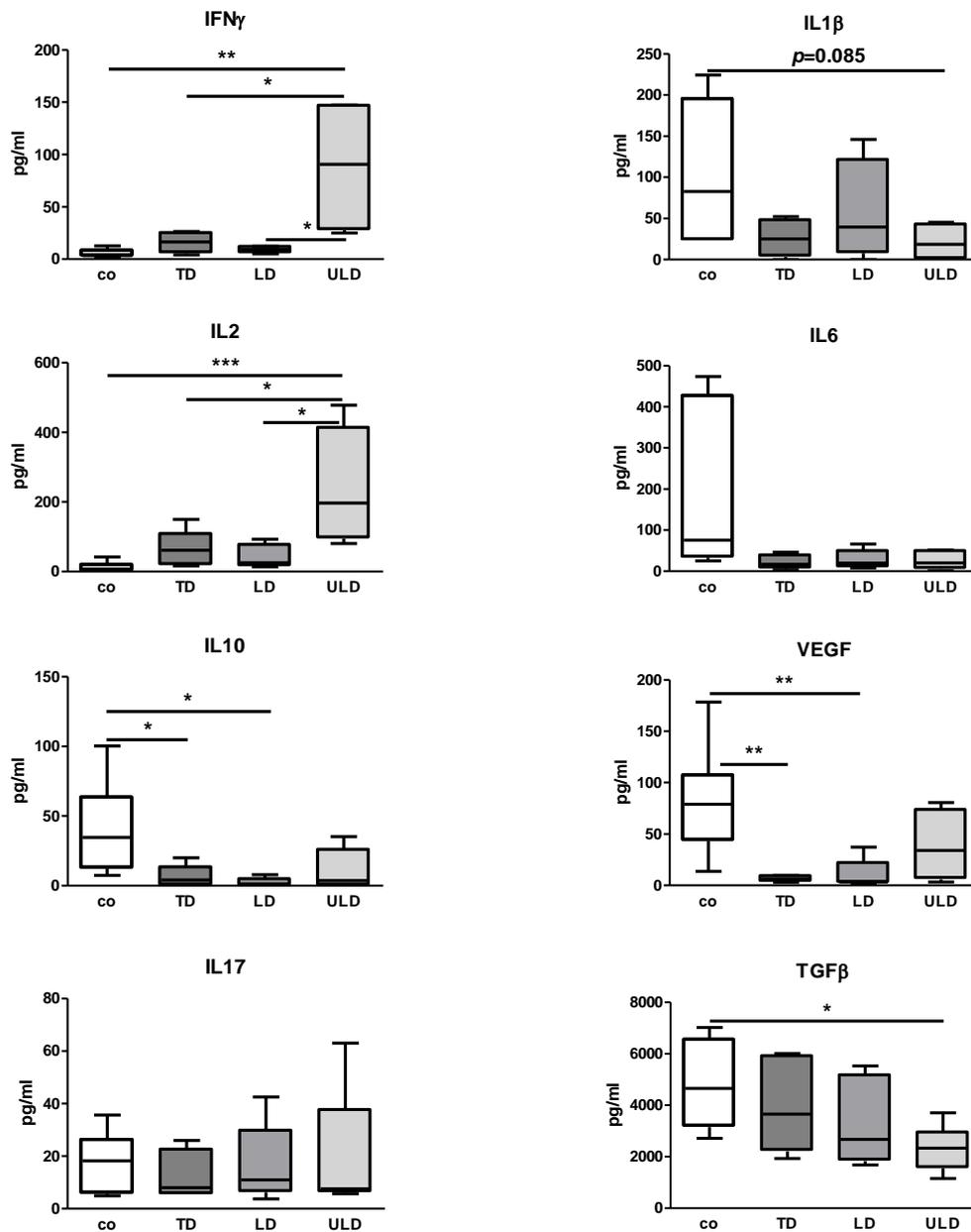


Abb. 3.7.1.1 Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU, in vivo. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 6-8 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

3.7.2 Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin, in vivo (Luminex)

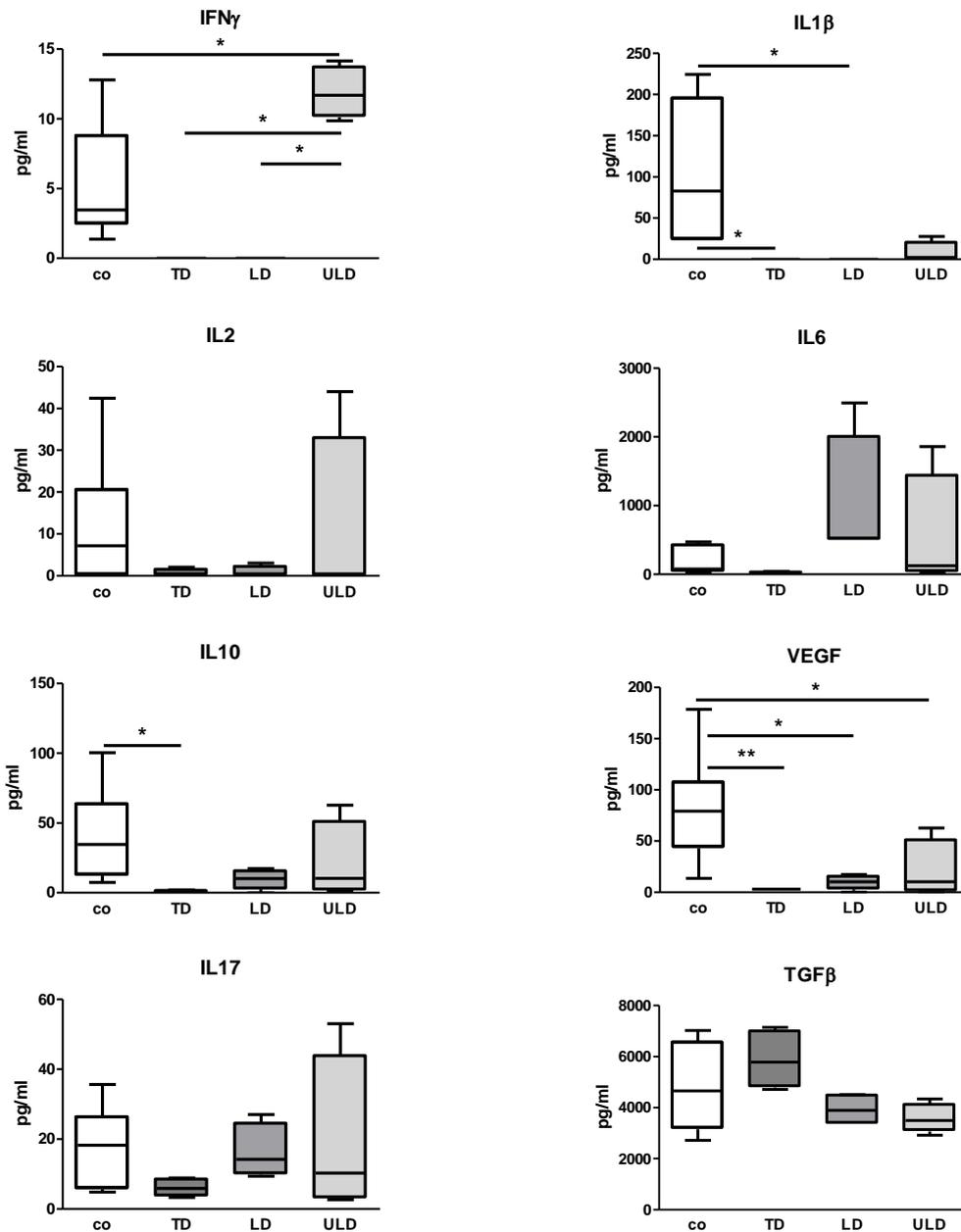


Abb. 3.7.2.1 Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin, in vivo. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 6-8 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Betrachtet man die Zytokinkonzentrationen im Blut der Tiere, so fällt auf, dass unter der Behandlung mit ULD 5 FU und Gemcitabin im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, TD und LD ein signifikant höherer IFN- γ Spiegel gemessen wurde (Abb. 3.7.1.1, Abb. 3.7.2.1). Während unter der Behandlung

mit Gemcitabin in TD und LD kein IL-1 β nachzuweisen war, konnte bei den Kontrollen eine signifikant höhere Konzentration ermittelt werden. Die Behandlung der Tiere mit 5 FU zeigte unter TD, LD und ULD im Vergleich zu den unbehandelten Tieren eine niedrigere Konzentration des Zytokins IL-1 β , jedoch waren hierbei die Unterschiede zu den Kontrollen aussagekräftig, aber nicht signifikant. Des Weiteren konnte unter ULD 5 FU im Vergleich zu den Kontrollen, TD und LD ein signifikant höherer Wert IL-2 nachgewiesen werden. Einen weiteren nennenswerten Unterschied wies die Konzentration von IL-10 auf. Sie war bei den unbehandelten Tieren signifikant höher als unter der Behandlung mit TD und LD 5 FU (Abb. 3.7.1.1). Bei der Behandlung mit Gemcitabin wiesen die unbehandelten Tiere einen signifikant höheren Wert des Zytokins IL-10, verglichen mit der therapeutischen Dosierung auf (Abb. 3.7.2.1). Stellt man die VEGF-Werte der beiden Behandlungsgruppen Gemcitabin und 5 FU gegenüber, fällt das Ergebnis ähnlich aus. Die unbehandelten Tiere wiesen im Vergleich mit TD, LD und ULD Gemcitabin eine signifikant höhere Konzentration VEGF auf (Abb. 3.7.2.1). Bei der Behandlung mit 5 FU waren die VEGF-Werte der Kontrollen im Vergleich mit LD und TD ebenso signifikant erhöht. Der TGF- β -Spiegel war unter der Behandlung mit ULD 5 FU, verglichen mit den Kontrollen, signifikant erniedrigt (Abb. 3.7.1.1). Die Behandlung mit Gemcitabin zeigte einen niedrigeren TGF- β -Spiegel unter LD und ULD im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.7.2.1).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Zytokinkonzentrationen im Blutserum der tumortragenden Mäuse festhalten, dass die Behandlung mit Gemcitabin und 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen Auswirkungen auf den Zytokinspiegel hat:

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IFN- γ	25	25	25	100
IL- β	100	50	75	50
IL-2	25	25	25	100
IL-6	100	50	50	50
IL-10	100	25	25	25
VEGF	100	25	25	50
IL-17	100	50	75	50
TGF- β	100	75	50	50

Abb. 3.7.2.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Zytokinkonzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IFN- γ	25			100
IL- β	100			25
IL-2	100	25	25	25
IL-6	25		100	50
IL-10	100	25	50	50
VEGF	100	25	25	25
IL-17	100	25	75	50
TGF- β	75	100	50	50

Abb. 3.7.2.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Zytokinkonzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse

In der Abb. 3.7.2.2 und Abb. 3.7.2.3 sind die Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.7.3 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vitro (Luminex)

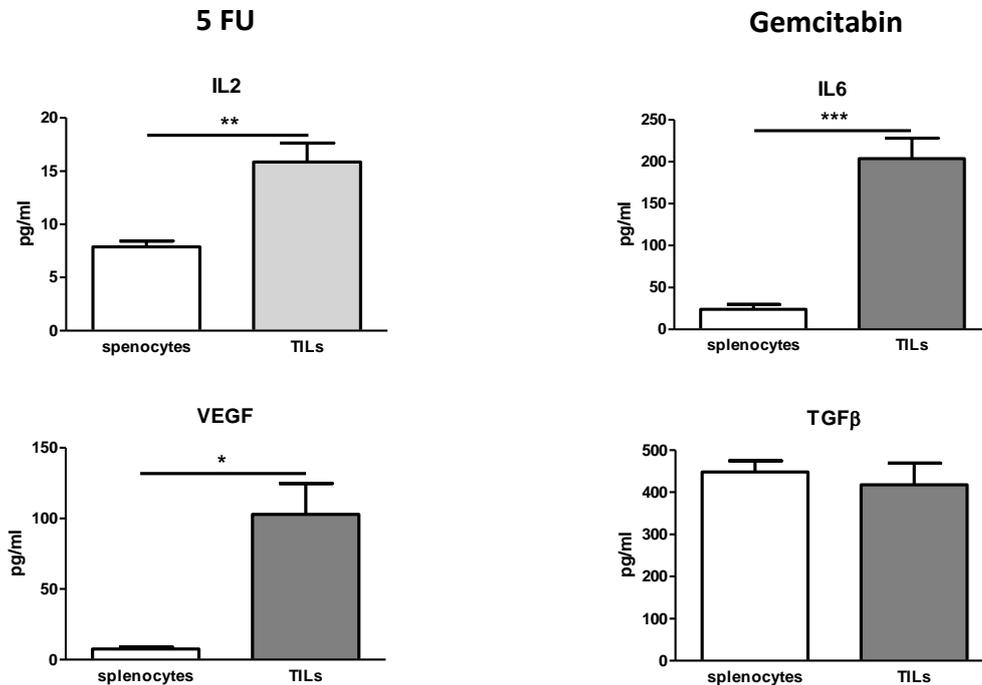


Abb. 3.7.3.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaired *T*-test ($n = 31-38$ pro Gruppe; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die Gegenüberstellung der Mediumüberstände der Milzzellen und den Tils hinsichtlich der Zytokine zeigt ein eindeutiges Ergebnis. Im Speziellen konnte ein signifikant höherer Spiegel der Zytokine IL-2, IL-6 und VEGF in den Proben der Tils im Vergleich zu den Mediumüberständen der Milzzellen gemessen werden. Bei der Bestimmung des TGF- β Spiegels gab es kaum einen Unterschied zwischen den Proben der Tils im Vergleich mit den Proben der Mediumüberstände der Milzzellen (Abb. 3.7.3.1).

3.7.3.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin (Luminex)

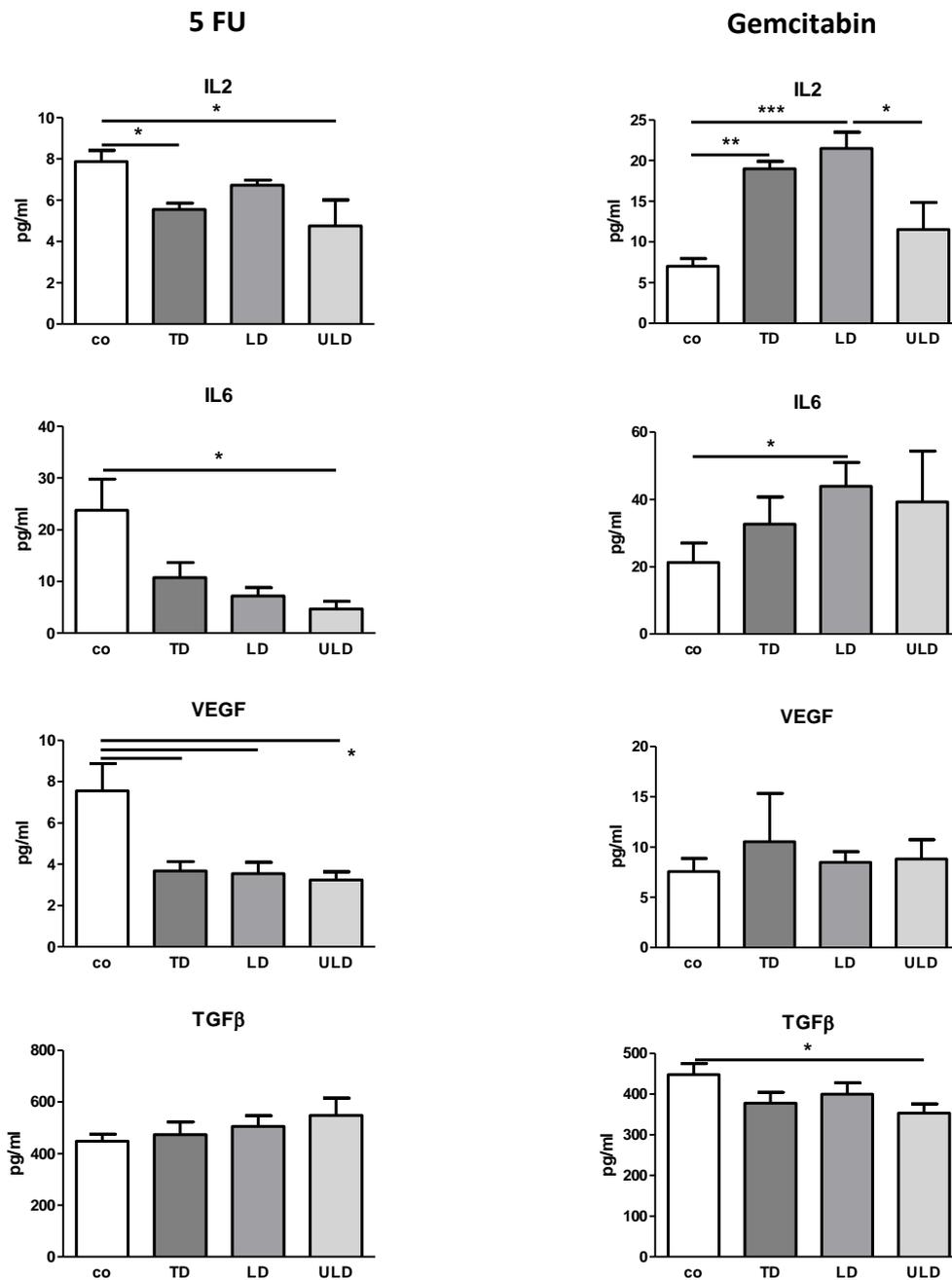


Abb. 3.7.3.1.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 4-6 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Bei der Untersuchung der Mediumüberstände aus den Milzen der tumortragenden Mäuse auf die Zytokine wurde signifikant weniger IL-2 unter der Behandlung mit TD und ULD 5 FU nachgewiesen als in den unbehandelten Proben. Bei der Behandlung mit Gemcitabin hingegen konnte eine signifikant höhere Konzentration IL-2 unter der Behandlung mit LD und TD im Vergleich mit den unbehandelten Proben gemessen werden. Außerdem waren die IL-2 Konzentrationen der LD Proben signifikant höher als unter der Behandlung mit ULD Gemcitabin. Die Proben mit der Behandlung ULD 5 FU wiesen eine signifikant geringere Konzentration IL-6 im Vergleich mit den unbehandelten Proben auf. Dagegen konnte unter LD Gemcitabin ein signifikant höherer IL-6 Spiegel im Vergleich mit den Kontrollen dokumentiert werden. Der VEGF-Wert der Kontrollen war im Vergleich zu allen Behandlungsgruppen unter der Therapie mit 5 FU signifikant erhöht. Die unbehandelten Proben lieferten im Vergleich mit ULD Gemcitabin einen signifikant höheren TGF- β Spiegel (Abb. 3.7.3.1.1).

3.7.3.2 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Tumoren der Mäuse (Tils der tumortragenden Mäuse), nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin (Luminex)

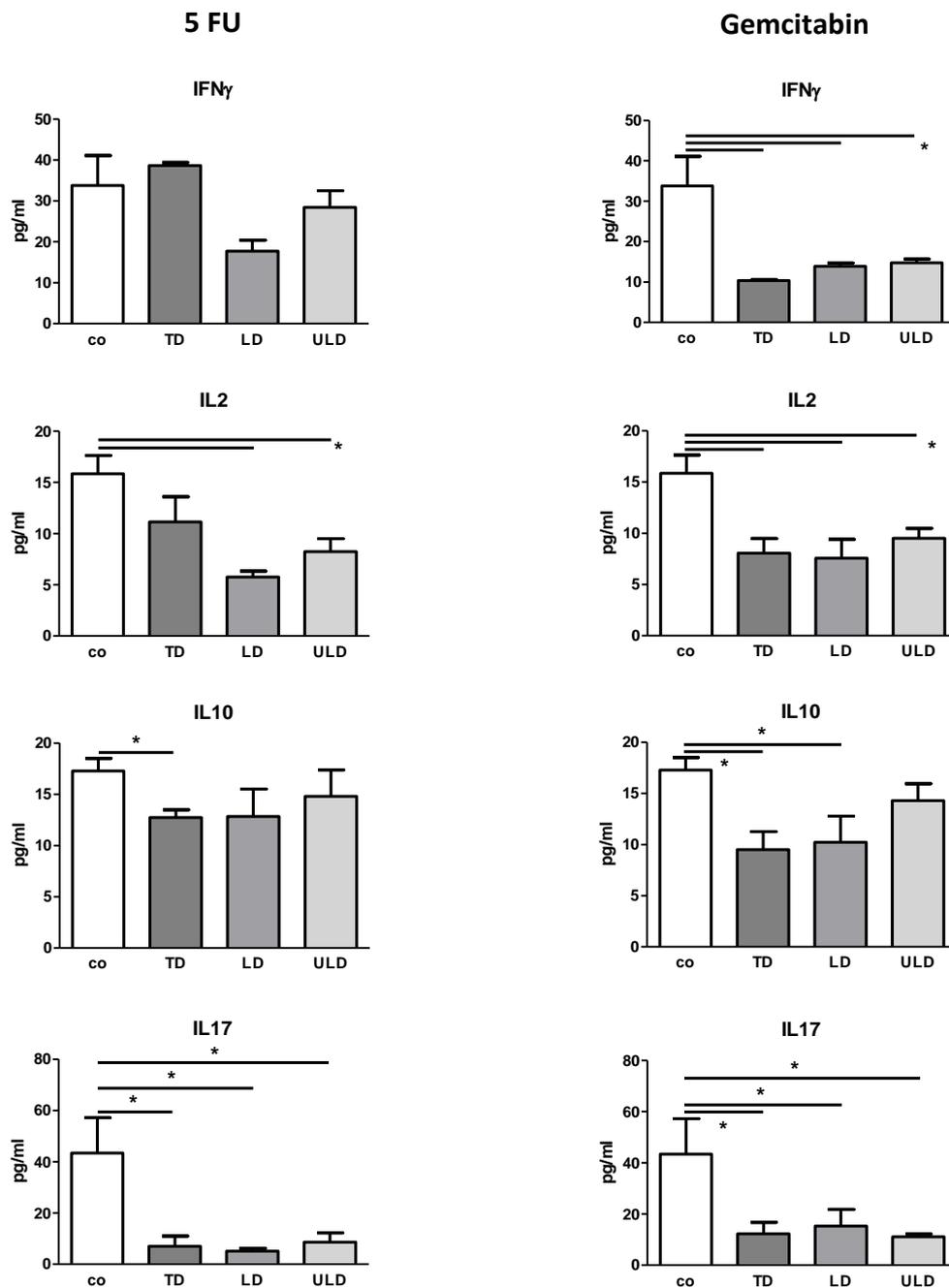


Abb. 3.7.3.2.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Tumoren der Mäuse (Tils der tumortragenden Mäuse), nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 4-6 pro Gruppe; *p<0,05).

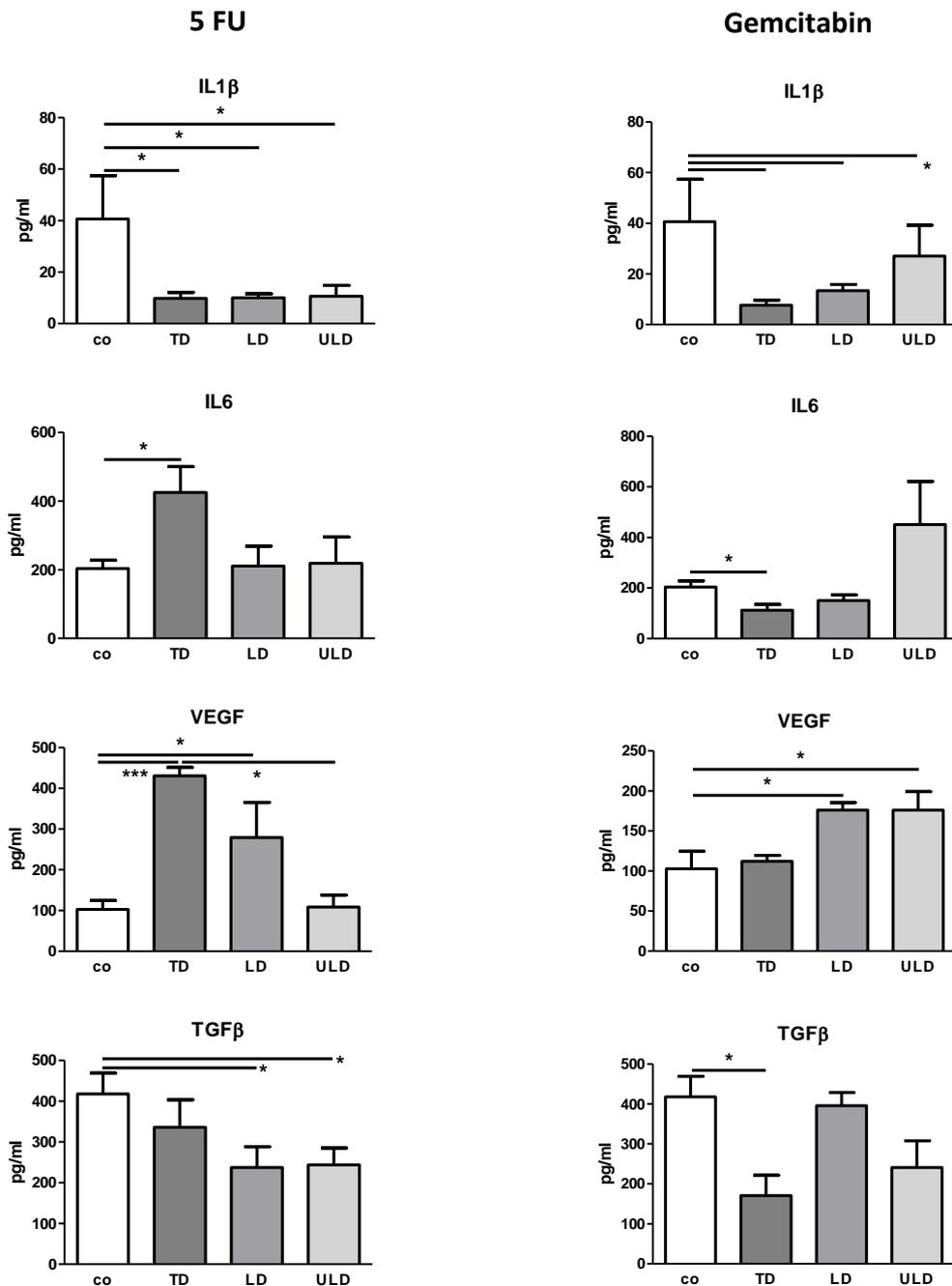


Abb. 3.7.3.2.2 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Tumoren der Mäuse (Tils der tumortragenden Mäuse), nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 4-6 pro Gruppe; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Die Gegenüberstellung der Zytokinkonzentrationen der beiden Standard-Chemotherapeutika zeigte unter der Therapie mit Gemcitabin in allen Behandlungsgruppen einen signifikant niedrigeren IFN- γ Wert im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Dasselbe Ergebnis ergab die Untersuchung auf das Zytokin IL-2. Der IL-2 Spiegel fiel hier ebenso zugunsten der Kontrollen aus, die einen signifikant höheren Wert des Zytokins im Vergleich zu allen Behandlungsgruppen mit Gemcitabin aufwiesen.

Unter der Therapie mit 5 FU konnte nur unter LD und ULD ein signifikant niedrigerer Wert im Vergleich mit den Kontrollen gemessen werden. Der Zytokinspiegel war auch bei der Untersuchung auf IL-10 unter TD 5 FU im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. Unter der Therapie mit Gemcitabin war der Spiegel von IL-10 unter TD sowie unter LD signifikant erniedrigt verglichen mit den unbehandelten Proben. Aus den Mediumüberständen der Tumorzellen konnten in allen Behandlungsgruppen unter der Therapie mit 5 FU und Gemcitabin, im Vergleich mit den Kontrollen, signifikant weniger IL-17 nachgewiesen werden (Abb. 3.7.3.2.1). Die Untersuchung der Tils auf das Zytokin IL-1 β ergab für die therapeutische und metronomische Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin ein ähnliches Ergebnis. Alle Behandlungsgruppen wiesen im Vergleich mit den unbehandelten Proben signifikant weniger IL-1 β auf. Unter der Therapie mit TD 5 FU konnte im Vergleich mit den Kontrollen eine signifikant höhere Konzentration IL-6 nachgewiesen werden. Dagegen ergab die Therapie mit TD Gemcitabin einen signifikant niedrigeren Wert des Zytokins im Vergleich mit den Kontrollen. Unter der Therapie mit Gemcitabin konnte ein signifikant höherer Wert VEGF unter der metronomischen Chemotherapie mit LD und ULD gemessen werden. Die Therapie mit TD 5 FU ergab eine signifikant höhere Konzentration VEGF im Vergleich mit ULD und den Kontrollen. Jedoch konnte unter LD Gemcitabin, im Vergleich mit den Kontrollen, signifikant mehr VEGF dokumentiert werden. Die Tils, die mit LD und ULD 5 FU therapiert wurden, wiesen signifikant weniger TGF- β auf als die unbehandelten Proben. Die TD Gemcitabin ergab ebenso einen signifikant niedrigeren TGF- β Spiegel als die Kontrollen (Abb. 3.7.3.2.2).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Zytokinkonzentrationen aus den Mediumüberständen der Tumoren (Tils) und Milzen der tumortragenden Mäuse festhalten, dass die Behandlung mit Gemcitabin und 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen Auswirkungen auf den Zytokinspiegel hat:

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IL-2	100	50	75	50
IL-6	100	50	25	25
VEGF	100	50	50	50
TGF- β	75	75	100	100

Abb. 3.7.3.2.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Milzen der tumortragenden Mäuse

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IL-2	50	75	100	50
IL-6	50	75	100	75
VEGF	75	100	75	75
TGF- β	100	75	75	75

Abb. 3.7.3.2.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Milzen der tumortragenden Mäuse

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IFN- γ	75	100	50	75
IL- β	100	25	25	25
IL-2	100	75	50	75
IL-6	50	100	50	50
IL-10	100	75	75	75
VEGF	25	100	50	25
IL-17	100	25	25	25
TGF- β	100	75	50	50

Abb. 3.7.3.2.5 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IFN- γ	100	25	50	50
IL- β	100	25	25	50
IL-2	100	50	50	50
IL-6	50	25	25	100
IL-10	100	50	50	75
VEGF	50	50	100	100
IL-17	100	25	25	25
TGF- β	100	50	100	50

Abb. 3.7.3.2.6 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse

In der Abb. 3.7.3.2.3-3.7.3.2.6 sind die Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

3.8 Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin, in vitro (ELISA)

Mit Hilfe des ELISA war es möglich, die Mediumüberstände der unterschiedlich behandelten Zellkulturen gezielt auf mögliche Veränderungen bzgl. der IFN- γ Freisetzung zu untersuchen. Verwendet wurden hierfür die Mediumüberstände der Tumorzellen (Panc02 und Tils) 24h nach Behandlung (Kapitel 2.2.6.2.3). Die Platten enthielten neben den Standards die Proben mit der metronomischen Chemotherapie der beiden Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin in therapeutischer (TD), niedriger (LD) und sehr niedriger Dosierung (ULD). Zusätzlich wurden die Mediumüberstände der behandelten und unbehandelten Tumorzellkulturen (Panc02 und Tils) in unterschiedlichen Verdünnungen der Ziel- zu Effektorzellen (Panc02:Tils) auf das Zytokin untersucht (1:5, 1:10). Am ersten Tag wurden die spezifischen Antikörper zu den Proben pipettiert und über Nacht inkubiert. Danach wurde das Protokoll den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt und die Platten am Ende bei 450nm gemessen. Um eine Referenz zu haben, wurden nicht behandelte Zellkulturen (Panc02 und Tils) als Kontrollen untersucht und die IFN- γ Konzentration bestimmt. Die Durchführung und das Wirkungsprinzip des ELISA werden im Kapitel 2.2.8 näher beschrieben.

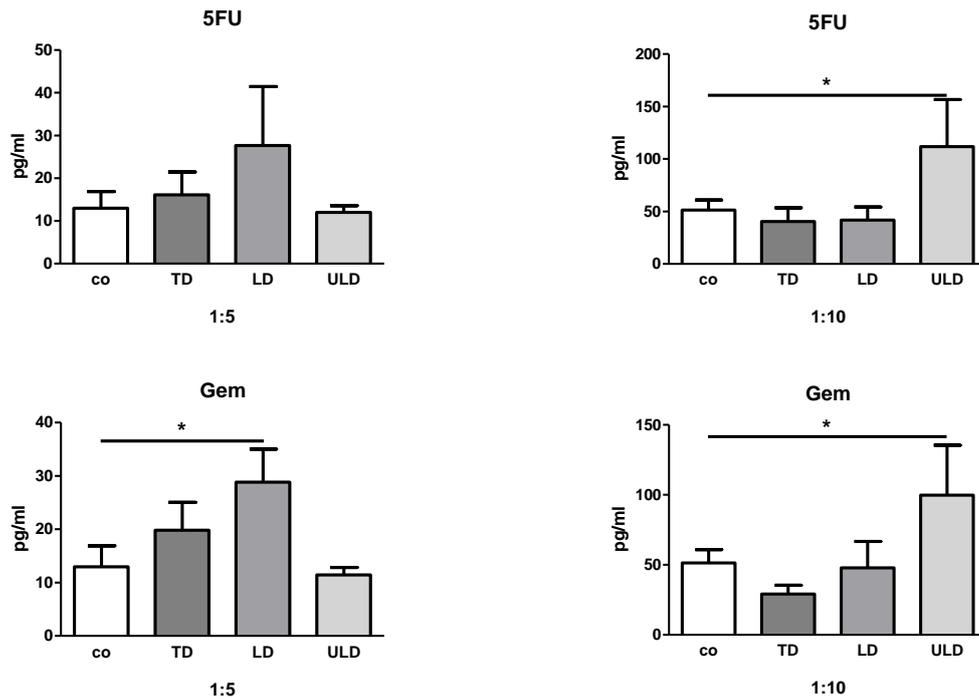


Abb. 3.8.1 Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf die jeweilige Konzentration von IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. 1:5 und 1:10 kennzeichnen die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse zwischen den Zielzellen (Panc02-Zellen) und den Effektorzellen (Tils), Zielzelle:Effektorzelle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) mit Bonferroni post test (n= 8-12 pro Gruppe).

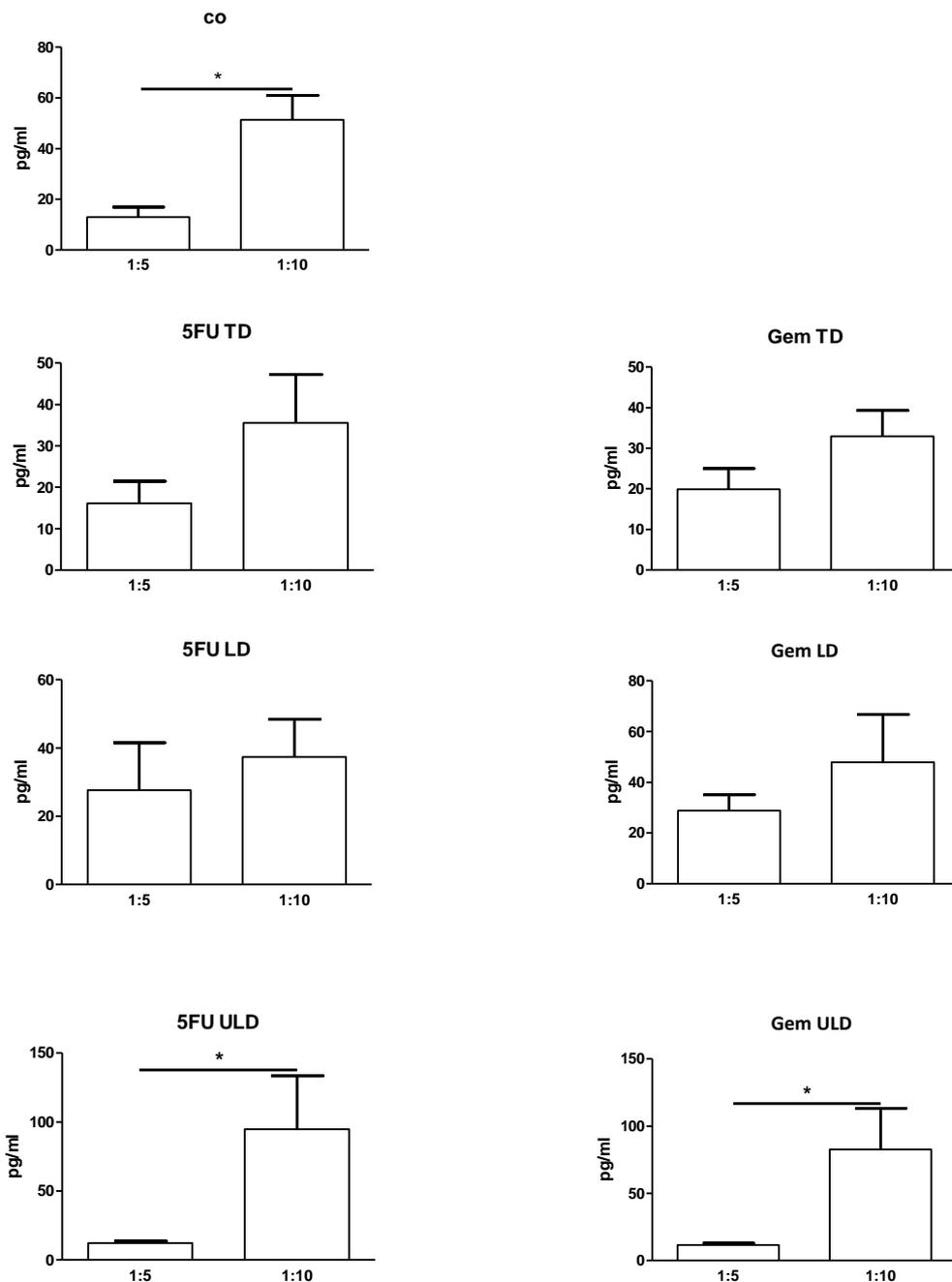


Abb. 3.8.2 Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf die jeweilige Konzentration von IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin. 1:5 und 1:10 kennzeichnen die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse zwischen den Zielzellen (Panc02-Zellen) und den Effektorzellen (Tils), Zielzelle:Effektorzelle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels unpaired T-test (SE, n= 8-12 pro Gruppe).

Betrachtet man die Freisetzung von IFN- γ der unterschiedlichen Behandlungsgruppen nebeneinander (Abb. 3.8.1), lässt sich feststellen, dass der IFN- γ - Spiegel bei niedrig dosierter „low dose“ Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin in der Verdünnung 1:5 der Panc02 zu den Tils im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen höher ist. Unter der Behandlung mit LD Gemcitabin ist hierbei der IFN- γ -Wert signifikant höher als bei den Kontrollen. Interessanterweise ist in der 1:10 Verdünnung ebenso eine signifikante Erhöhung des IFN- γ -Spiegels zu erkennen, in diesem Fall jedoch unter der sehr niedrig dosierten „ultra low dose“ Behandlung, im Vergleich mit den Kontrollen. Dieses Ergebnis konnte jeweils nach der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin nachgewiesen werden (Abb. 3.8.1).

Wird die IFN- γ Freisetzung innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe in den Verdünnungen 1:5 und 1:10 direkt gegenübergestellt, sieht man einen höheren IFN- γ Spiegel bei der 1:10 Verdünnung. Einen signifikant höheren IFN- γ Spiegel in der 1:10 Verdünnung wiesen hierbei die Kontrollen und die ULD Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin auf (Abb. 3.8.2).

Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Mediumüberstände der Tumoren (Tils) auf IFN- γ festhalten, dass die Therapie mit Gemcitabin und 5 FU in unterschiedlichen Dosierungen Auswirkungen auf den Zytokinspiegel hat:

Zytokine:	Kontrollen	TD	LD	ULD
IFN- γ (1:5) 5 FU	50	75	100	50
IFN- γ (1:10) 5 FU	50	50	50	100
IFN- γ (1:5) Gemcitabin	50	75	100	50
IFN- γ (1:10) Gemcitabin	75	50	75	100

Abb. 3.8.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf IFN- γ in den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse

In der Abb. 3.8.3 sind die Ergebnisse des Experiments dargestellt. Um auf einen Blick die Größe der Zellpopulationen miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse mit Hilfe eines eingefärbten Balkens dargestellt. Die Zahl **100** steht dabei für **sehr viele** Zellen, die Zahl **75** für **viele** Zellen, die Zahl **50** für **einige** Zellen und die Zahl **25** für **wenige** Zellen.

4 Diskussion

4.1 Ungünstige Prognose bei Bauchspeicheldrüsenkrebs

Im Jahr 2011 erkrankten rund 16.700 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs. Aufgrund der **ungünstigen Prognose** verstarben auch fast ebenso viele Personen an diesem Tumor. Bösartige Neubildungen der Bauchspeicheldrüse verursachen in frühen Stadien oft keine oder nur unspezifische Symptome. Daher wird der Tumor häufig erst spät, in einem bereits fortgeschrittenen Stadium, erkannt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist aus diesem Grund ausgesprochen ungünstig. Sie liegt in Deutschland für Männer bei 8 und für Frauen bei 9 Prozent. Damit weist das Pankreaskarzinom die niedrigsten Überlebensraten unter allen Krebserkrankungen auf und ist aufgrund der schlechten Prognose bei beiden Geschlechtern die vierthäufigste Krebstodesursache (URL: <http://www.krebsdaten.de> (Stand: 12.08.2016)). Die radikale chirurgische Resektion ist die einzige kurative Option. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wird eine resektable Erkrankung nur bei einer Minderheit der Patienten gefunden (Seufferlein et al., 2013). Nach R0 Resektion des Primärtumors ist eine adjuvante Systemtherapie indiziert. Die **Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin** wird als **etablierter Therapiestandard** in der Behandlung der Patienten mit Pankreaskarzinom betrachtet. Die Wirksamkeit von Gemcitabin und von 5-Fluorouracil/Folinsäure ist dabei vergleichbar (Neoptolemos et al., 2009; Oettle et al., 2007; van der Gaag et al., 2010). Die Therapie in fortgeschrittenen Stadien ist palliativ. Sie sollte bei Feststellung der Inoperabilität oder beim Nachweis von Metastasen begonnen werden (Burris et al., 1997). Dies gilt für die lokal fortgeschrittene Erkrankung ebenso wie für die primär metastasierte Erkrankung. Chemotherapie führt zu einer Verlängerung der Überlebenszeit und zur Verbesserung der Lebensqualität (Glimelius et al., 1996). Trotz der positiven Wirkung von 5 FU/Gemcitabin, ist der Erfolg der Standardtherapie unzureichend und die mittlere Überlebenszeit relativ kurz. Hierbei spielt die **Zytotoxizität** von 5 FU/Gemcitabin und die **Resistenz** der Tumorzellen gegen die Chemotherapie eine große Rolle (Hahnfeldt et al., 2003; Neoptolemos et al., 2010).

Außerdem ist die Aktivität des Immunsystems gegenüber Krebszellen ein wichtiger Faktor für die Prognose bei Krebspatienten (Solomayer et al., 2003). Um das Wachstum des Tumors unter Kontrolle zu halten, ist die Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems von großer Bedeutung. Die Immunantwort kann jedoch durch die hoch dosierte konventionelle Chemotherapie beeinträchtigt werden. Grund dafür sind Entzündungsreaktionen und eine gestörte Immunüberwachung. Durch **Änderung der Dosierung und der regelmäßigen Verabreichung der Chemotherapie**, kann die schädigende Wirkung auf das Immunsystem minimiert werden, die Anti-

Tumor-Immunität stimuliert und die Pro-Tumor-Antwort gehemmt werden (Galluzzi, Senovilla, Zitvogel, & Kroemer, 2012; Zitvogel et al., 2008). Dies ist wichtig, denn charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist die **tumorinduzierte Immunsuppression**. Man findet im Tumor und der Tumorumgebung Immunzellen, die das Wachstum des Tumors fördern (Inman et al., 2014). Daher ist es dringend notwendig, die Interaktion zwischen Tumor und dem Immunsystem besser zu verstehen um neue, effizientere Behandlungsmethoden zu entwickeln oder bestehende zu optimieren. Die **metronomische Chemotherapie** richtet sich nicht nur gegen den Tumor selbst, sondern vor allem gegen die Wechselwirkung zwischen Tumor und dem umgebenden Gewebe, in dem durch entzündliche Reaktionen und Förderung der Angiogenese das Tumorwachstum aufrechterhalten wird.

Wie neuste, wissenschaftliche Erkenntnisse und Studien zeigen, erweist sich die metronomische Chemotherapie als vielversprechender, erfolgreicher Therapieansatz, der folgende Aspekte berücksichtigt (Hao et al., 2014; Sarmiento & Gasparini, 2008; Torimura et al., 2013):

- 1) **Minimierung der zytotoxischen Nebenwirkungen** durch niedrige Dosierung des Chemotherapeutikums
- 2) **Reduzierung von Resistenzen** der Tumoren gegen Chemotherapeutika
- 3) **Effiziente Immunantwort, Verhinderung von Immunsuppression**
- 4) **Mechanismen der Tumoren durchbrechen** (Angiogenese, Tumorummunogenität)

In Anbetracht dieser Tatsachen ist die Notwendigkeit der Entwicklung neuartiger, therapeutischer Ansätze und verbesserter Behandlungsstrategien im Kampf gegen den Tumor essentiell. Aus diesem Grund verfolgte die vorliegende Arbeit das Ziel, die immunmodulatorische Wirkung von 5 FU und Gemcitabin im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Untersuchung der **immunologischen Parameter in Bezug auf die therapeutisch (TD) verabreichte Chemotherapie (konventionelle Chemotherapie) im Vergleich zu der niedrig (LD) und sehr niedrig (ULD) dosierten Chemotherapie (metronomische Chemotherapie)**.

Parameter	Konventionelle Chemotherapie	Metronomische Chemotherapie
Ziel	Kurzfristige Tumoreradikation	Mittelfristige Tumorkontrolle
Dosierung	Maximal tolerierte Dosis	Vergleichsweise niedrige Dosierung
Nebenwirkungen	Hohe Toxizität	Geringe Toxizität
Regime	Periodische Gabe alle (2-)3 Wochen	Keine Therapiepausen, tägliche Gabe
Zielstrukturen	Proliferierende Tumorzellen	„aktivierte“ Endothelzellen, Tumormikroumgebung
Wirkmechanismus	Tumorzellnekrose/-apoptose	Antiangiogenese, Immunmodulation, verbesserte Immunogenität der Tumorzellen, verbesserte Anti-Tumor-Immunantwort, Hemmung der Immunsuppression
Chemoresistenzentwicklung	Hohe Wahrscheinlichkeit (Hauptursache für Therapieversagen)	Geringe Wahrscheinlichkeit (genetisch stabile Endothelzellen als zentrale Zielstruktur)
Inhärente Vorteile	Etablierte Endpunkte in klinischen Studien	Möglichkeit einer langfristigen Therapie
Strategien zur Optimierung	Dosisdichte Regimes, Kombination mit molekular ausgerichteten Therapeutika	Kombination mit Angiogeneseinhibitoren und/oder anderen molekular ausgerichteten Therapeutika

Abb. 4.1.1 Eigenschaften der konventionellen und metronomischen Chemotherapie (Gille, Spieth, & Kaufmann, 2005)

Um die **immunmodulierenden Eigenschaften von 5 FU und Gemcitabin** zu analysieren, wurden in vivo und in vitro Experimente mit tumortragenden Mäusen durchgeführt. Die Behandlung der Tiere erfolgte mit TD, LD, ULD 5 FU und Gemcitabin. Danach konnte das Tumolvolumen sowie die Metastasierung bestimmt und die Immunzellen durchflusszytometrisch charakterisiert werden. Die Zellen wurden aus den Milzen und Tumoren der Tiere gewonnen. Unbehandelte Tiere/Zellkulturen standen als Kontrollen bei jedem Versuch zur Verfügung. Die Milzzellen der gesunden Mäuse dienten nach Behandlung in vitro als Referenz. Kurz zusammengefasst konnte in der vorliegenden Dissertation nachgewiesen werden, dass 5 FU und Gemcitabin im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms, immunmodulatorische Wirkung hat. Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass die metronomische Chemotherapie, als regelmäßig und geringer dosierte Chemotherapie, im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie, teilweise/größtenteils bessere oder genauso gute Ergebnisse bezüglich des Tumolvolumens, der Metastasierungsrate und den relevanten Immunzellpopulationen lieferte.

4.2 Einfluss der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf das Tumorwachstum und die Metastasierung

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse zeigen, dass die therapeutische Wirksamkeit der Chemotherapeutika zu einem gewissen Teil auf der Interaktion zwischen dem Medikament und dem Immunsystem beruht (M. R. Shurin, Naiditch, Gutkin, Umansky, & Shurin, 2012). In einer aktuellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass 5 FU und Gemcitabin immunregulatorische Zellen aktiviert, die wiederum die Produktion von tumorfördernden Zytokinen über Entzündungsreaktionen stimulieren und somit die Anti-Tumor-Wirkung der Chemotherapeutika limitiert (M. R. Shurin, 2013). In der Literatur wurden die direkten und indirekten Effekte der konventionellen Chemotherapie auf das Immunsystem bereits gut beschrieben. Die Forschung zeigt ein wachsendes Interesse an der Anwendung traditioneller Chemotherapeutika mit dem Ziel das Immunsystem so zu „manipulieren“, dass es zu einer erfolgreichen Anti-Tumor-Antwort kommt. Die *low-dose* Chemotherapie, auch als *immunogene Chemotherapie* bezeichnet, ebenso wie die *ultra low-dose* Chemotherapie, die mit dem Begriff *Chemoimmunmodulation* beschrieben wird, birgt viel Potential und stellt damit eine vielversprechende Therapiemöglichkeit in der Behandlung von Krebs dar (Galluzzi et al., 2012; M. R. Shurin et al., 2012). Die unterschiedlichen Effekte des jeweiligen Chemotherapeutikums auf die Immunzellen basiert zum großen Teil auf der Dosierung und den Zeitintervallen der Verabreichung. Während die hoch dosierte konventionelle Chemotherapie oft zum Abbau von Subpopulationen der Immunzellen führt, hat die low dose Chemotherapie antiangiogenetische und immunmodulatorische Wirkung (Kerbel & Kamen, 2004; Kersten, Salvagno, & de Visser, 2015; Nars & Kaneno, 2013).

Eine umfassende Analyse der Immunmodulation der Chemotherapeutika in unterschiedlichen Dosierungen ist daher dringend notwendig.

In dieser Arbeit wurde erstmals die immunmodulierende Wirkung von 5 FU und Gemcitabin in drei unterschiedlichen Dosierungen im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms in Bezug auf das Tumolvolumen analysiert. Wie erwartet war das Tumolvolumen unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin geringer, im Vergleich mit den unbehandelten Tieren. Die geringste Tumorgröße konnte unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin mit der hoch dosierten konventionellen Chemotherapie nachgewiesen werden. Die Behandlung mit der sehr gering dosierten Chemotherapie konnte unter der Behandlung mit Gemcitabin eine fast identische Tumorgröße wie die TD Gemcitabin erzielen. Zwar war die Tumorgröße unter ULD 5 FU minimal größer als unter der TD 5 FU Behandlung, aber trotzdem war auch dieses Ergebnis sehr gut. Damit konnte gezeigt werden, dass unter der metronomischen Behandlung mit ULD Gemcitabin und 5 FU vergleichbare Ergebnisse mit

der hoch dosierten konventionellen Chemotherapie in Bezug auf Tumolvolumen erreicht werden. Erstaunlicherweise zeigte die Behandlung mit der metronomischen low-dose Chemotherapie 5 FU und Gemcitabin kaum positive Auswirkung auf die Tumorgröße. Die Tumoren waren zwar kleiner im Vergleich zu den Kontrollen aber deutlich größer im Vergleich mit den Tieren unter TD und ULD beider Chemotherapeutika. Es stellt sich nun die Frage wie man dieses Ergebnis erklären kann. Die LD ist um den Faktor 10, die ULD Behandlung um den Faktor 100 geringer dosiert als die TD. Dies galt für beide Chemotherapeutika. Theoretisch hätte man erwarten können, dass die LD ein ähnliches Ergebnis wie die TD Behandlung erzielt, da sie nur um den Faktor 10 geringer konzentriert ist. Da beide Chemotherapeutika ähnliche Ergebnisse aufzeigten, kann man schlussfolgern, dass die Wirkstoffe von 5 FU und Gemcitabin wahrscheinlich nicht für dieses Ergebnis verantwortlich sind. In Anbetracht der Tatsache, dass alle Tiere in den gleichen Zeitintervallen behandelt wurden, liegt der Grund wahrscheinlich in den immunmodulierenden Wirkungen der beiden Chemotherapeutika unter der ULD Behandlung. In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels werden die immunmodulierenden Wirkungen von 5 FU und Gemcitabin auf die einzelnen Immunzellen in den unterschiedlichen Dosierungen verglichen und in Bezug auf die Tumorgröße analysiert.

Die Metastasierungsrate nahm unter der Behandlung mit Chemotherapie ab und entsprach unter der metronomischen Chemotherapie (LD, ULD) der therapeutischen Dosierung (TD) oder war sogar geringer (ULD Gemcitabin). Dies traf für die Behandlung mit 5 FU (Colon- und Peritonealmetastasen) und die Peritonealmetastasen unter der Behandlung mit Gemcitabin zu. Nur unter der Gabe von LD Gemcitabin konnten geringfügig mehr Peritonealmetastasen als unter TD nachgewiesen werden. Die Metastasierungsrate der Colonmetastasen, unter der Behandlung mit Gemcitabin, nahm mit sinkender Dosierung des Chemotherapeutikums ab. Die wenigsten Metastasen wurden bei den Tieren, die mit ULD Gemcitabin behandelt wurden, gefunden. Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls deutlich, dass die metronomische Chemotherapie sich nicht nur auf den Primärtumor, sondern auch auf die Metastasenbildung positiv auswirkt. Die wenigsten Metastasen wurden unter ULD Gemcitabin dokumentiert und stehen damit in engem Zusammenhang mit der geringen Tumorgröße des Primärtumors. Eine detaillierte Analyse der Immunmodulation, im Speziellen der metronomischen Chemotherapie, wird mögliche Erklärungen liefern.

Tongu et al. konnten in vivo im CT26 colon carcinoma Mausmodell zeigen, dass die niedriger dosierte Injektion von Gemcitabin (50 mg/kg) der höher dosierten Behandlung mit Gemcitabin (100 mg/kg) therapeutisch hinsichtlich der Suppression des Tumorwachstums signifikant überlegen war. Außerdem konnten sie nachweisen, dass die Injektion von low-dose Gemcitabin den Anteil der Tumor infiltrierenden Immunzellen signifikant reduziert. Da viele Chemotherapeutika

immunmodulatorische Effekte aufweisen, haben sie die Auswirkung der metronomischen Chemotherapie mit low-dose Cyclophosphamid und Gemcitabin im CT26 Mausmodell getestet. Cyclophosphamid (CP) und Gemcitabin können die Immunsuppression verringern, die durch die Treg-Zellen und die MDSC hervorgerufen wird. Sie konnten zeigen, dass die metronomische Chemotherapie mit low-dose CP und Gemcitabin die Anti-Tumor-T-Zell-vermittelte Immunität induziert (Tongu et al., 2013).

Tran Cao et al. konnten nachweisen, dass die metronomische Chemotherapie das Wachstum von Primärtumoren und bestehenden Metastasen supprimiert. Ob sich die metronomische Chemotherapie auch auf die Entwicklung der Metastasen auswirkt, wurde in ihren Studien nicht nachgewiesen. Die an Pankreaskarzinom erkrankten Mäuse wurden mit Gemcitabin behandelt (1 mg/kg täglich, metronomische Chemotherapie und 150 mg/kg zweimal in der Woche, konventionelle Chemotherapie). Vergleicht man die Tumorgrößen unter konventioneller Chemotherapie mit der metronomischen Chemotherapie, waren die Tumoren unter der konventionellen Therapie kleiner (Tran Cao et al., 2010). Dies bestätigen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Yapp et al. haben mit Hilfe der Xenograftmodelle des Pankreaskarzinoms bewiesen, dass Tumoren, die mit metronomischer Chemotherapie mit Gemcitabin behandelt wurden, kleiner waren als die Kontrollen. Sie konnten u.a. zeigen, dass metronomische Chemotherapie Auswirkungen auf die Blutversorgung und die Tumorzellen hat, die Tumorperfusion vorübergehend verbessert, die Hypoxie verringert und somit zu einem langsameren Tumorwachstum führt (Yapp et al., 2016).

Cham et al. haben die Anti-Tumor-Wirksamkeit der metronomischen und konventionellen Chemotherapie mit Gemcitabin ebenso wie ihre Effekte auf die Tumormikroumgebung in zwei Xenograftmodellen des Pankreaskarzinoms untersucht. Beide Dosierungen konnten das Tumolvolumen signifikant reduzieren. Jedoch konnte, wie bereits von Yapp et al. beschrieben, eine bessere Perfusion des Gewebes unter der metronomischen Chemotherapie festgestellt werden. Des Weiteren konnte unter der metronomischen Chemotherapie eine erhöhte Apoptose der Tumor-assoziierten Fibroblasten und eine größere Reduktion der pro-angiogenen Faktoren, wie beispielsweise EGF, IL-1 α , IL-8, ICAM-1 und VCAM-1 (Cham et al., 2010) dokumentiert werden. Die ausgeprägte Veränderung in der Tumormikroumgebung unter der metronomischen Chemotherapie scheint ein weiterer wichtiger Faktor zu sein, der die Tumorgröße mit beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde die Tumormikroumgebung nach konventioneller und metronomischer Chemotherapie ebenso untersucht und in den folgenden Abschnitten zu den immunmodulierenden Effekten der Chemotherapeutika analysiert.

Konventionelle Chemotherapie kann in Tumorpatienten Immunsuppression auslösen. Im Gegensatz dazu stimuliert die low-dose Chemotherapie die Anti-Tumor-Immunität. Die Tumorentwicklung wird bedingt durch die chronische Entzündungsreaktion, die in der Tumormikroumgebung stattfindet und durch infiltrierende Leukozyten und Zytokine charakterisiert wird. Die Zytokine unterstützen das Tumorwachstum, indem sie Pro-Tumor Mutationen, Resistenzen gegen Apoptose und Angiogenese auslösen. Einige dieser Faktoren induzieren die Ausbreitung und Aktivierung immunsuppressiver Zellen, wie die MDSC, M2 Makrophagen im Tumor und der Peripherie (A. Sevko, Sade-Feldman, et al., 2013). Die ausgelöste Anti-Tumor-Immunität der metronomischen Chemotherapie stellt somit einen weiteren wichtigen Faktor dar, der den Erfolg der Chemotherapie beeinflusst.

Shevchenko, Bazhin, Karakhanova et al. konnten unter low-dose Gemcitabin eine verminderte Anzahl Treg-Zellen und eine verlängerte Überlebenszeit der Mäuse feststellen. Jedoch konnte unter der low-dose Chemotherapie mit Gemcitabin im Panc02 murinen Modell kein signifikanter Einfluss auf das Tumorwachstum und die Metastasierungsrate (Peritoneum, Leber) nachgewiesen werden. Demzufolge zeigte die metronomische Behandlung mit Gemcitabin keine direkte Toxizität gegenüber Tumorzellen. Dieses Ergebnis weist daher auf die große Bedeutung der nicht-toxischen Effekte der low-dose Behandlung mit Gemcitabin hin (Shevchenko et al., 2013).

Über einen weiteren interessanten Aspekt bezüglich der Tumorgröße berichtet Kareva, Waxman und Klement. Sie weisen darauf hin, dass das große, langfristige Ziel der konventionellen Chemotherapie die direkte Minimierung der Tumorgröße darstellt. Jedoch kommt es trotz der sofortigen Anti-Tumor-Antwort zu Rezidiven. Sie verweisen auf die Tatsache, dass die Anti-Tumor-Antwort unter metronomischer Chemotherapie zeitversetzt eintritt. Die Verzögerung kann beispielsweise durch den Abbau der den Tumor versorgenden Blutgefäße und der Aktivierung der Anti-Tumor-Antwort, die Zeit benötigt, bedingt sein. Die Anti-Tumor-Antwort ist dafür aber anhaltend. Dies ist Folge der abnehmenden Zahl resistenter Tumorzellklone und der Unterdrückung der Anti-Tumor-Immunität und damit einhergehender sinkender Wahrscheinlichkeit einer Rezidiventwicklung. Abb. 4.2.1 zeigt anschaulich die Entwicklung der Tumorgröße der metronomischen Chemotherapie im Vergleich mit der konventionellen Chemotherapie auf eine längere Zeitspanne gesehen. Zu diesem Aspekt lässt sich in der vorliegenden Arbeit keine Aussage treffen, da alle Tumoren zur selben Zeit gemessen wurden. Eventuell wäre die Tumorgröße unter LD auf einen längeren Zeitraum betrachtet auch geringer ausgefallen. Weitere Untersuchungen mit längeren Behandlungsintervallen könnten neue Erkenntnisse liefern (Kareva, Waxman, & Klement, 2015).

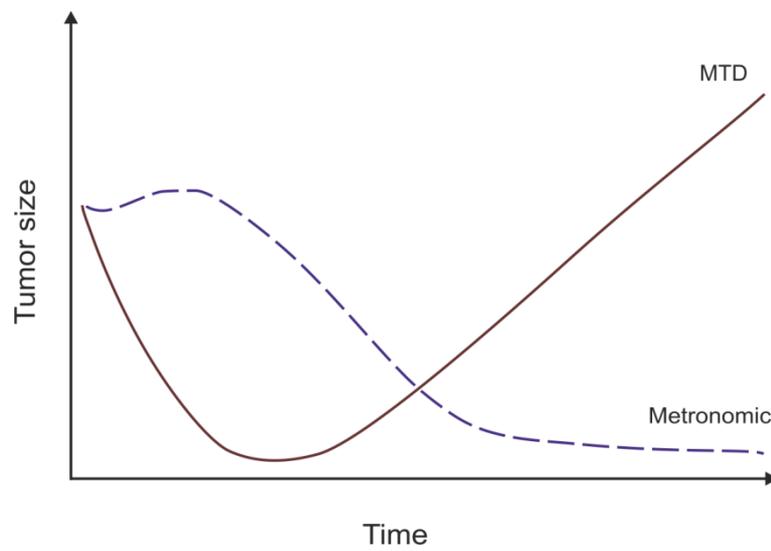


Abb. 4.2.1 Entwicklung der TumorgroÙe der konventionellen Chemotherapie (MTD) im Vergleich zur metronomischen Chemotherapie auf längere Zeit betrachtet (Kareva et al., 2015)

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666022/figure/F4/> (Stand: 12.08.2016). Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen

An der Immunantwort gegen den Tumor ist sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beteiligt. Eine wirksame Anti-Tumor-Antwort erkennt die Tumor-assoziierten Antigene (TAA), erzeugt T- und B-Zell-Antworten, die die Tumorzellen töten und gesundes Gewebe dabei nicht beschädigen. Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺-T-Zellen) können die Tumorzellen direkt töten. Paradoxerweise produzieren zytotoxische T-Zellen und CD4⁺-T-Helferzellen (Th) nicht nur Zytokine die das Tumorwachstum hemmen sondern auch welche, die das Tumorwachstum weiter vorantreiben. Außerdem helfen sie B-Zellen (CD19), sich in Gedächtnis- oder Plasmazellen zu differenzieren, die Antikörper gegen den Tumor entwickeln. Diese Antikörper können Tumorzellen töten, opsonisieren, das Wachstum der Tumorzellen stimulieren oder hemmen und zytotoxische T-Zellen beim Töten der Tumorzellen blockieren. Ebenso wie in anderen Tumormodellen scheint das Immunsystem bei Patienten mit Pankreaskarzinom mehrere Rollen zu haben (Megan B. Wachsmann, Laurentiu M. Pop, & Ellen S. Vitetta, 2012). Die konventionelle Chemotherapie (TD) wirkt zudem auch immunsuppressiv. Aus diesem Grund ist es umso wichtiger die immunmodulatorischen Effekte der metronomischen Chemotherapie auf die Immunzellen genauer zu untersuchen, mit dem Ziel, eine starke und erfolgreiche Immunantwort gegen den Tumor und minimalen Nebenwirkungen zu erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der Lymphozytenpopulationen in unterschiedlichen Behandlungsgruppen daher genauer analysiert.

Lymphozyten sind die wichtigsten Effektorzellen der Anti-Tumor-Antwort. Die lymphatischen Zellpopulationen werden überwiegend im Stroma rund um die Tumormasse gefunden, während im Tumor selbst nur wenige Lymphozyten nachzuweisen sind. Im Stroma befinden sich viele CD4⁺-T-Zellen und Makrophagen sowie einige B- und Plasmazellen. Bei Patienten mit Pankreaskarzinom konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (Tils) und der Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten gefunden werden. Allerdings ist die Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten der Patienten oft geringer im Vergleich zu den gesunden Personen (Emmrich et al., 1999; Fogar et al., 2006). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, sind in vivo in der Milz unter der metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin (LD und ULD) am meisten Lymphozyten, im Vergleich zu TD und den Kontrollen zu finden. In der Tumormikroumgebung konnten in vivo unter ULD 5 FU ebenfalls die meisten Lymphozyten im Vergleich mit den anderen Behandlungsgruppen und den Kontrollen nachgewiesen werden. Für ULD Gemcitabin konnte in vitro dasselbe Ergebnis dokumentiert werden. Damit scheint sich die metronomische Chemotherapie insbesondere in der sehr gering dosierten Verabreichung (ULD) positiv auf die Lymphozytenpopulation auszuwirken. Außerdem konnten in vivo in den Milzen unter

der Behandlung mit LD und ULD 5 FU, im Vergleich mit TD und den Kontrollen, die meisten B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Betrachtet man *in vitro* die Auswirkung der Chemotherapie auf die Anzahl der B-Zellen in den Milzen der gesunden Mäuse, so können erstaunlicherweise unter der metronomischen Chemotherapie mit 5 FU (LD und ULD) die wenigsten B-Zellen nachgewiesen werden. TD und die Kontrollen wiesen deutlich mehr B-Zellen auf. Damit scheint die positive immunmodulatorische Auswirkung der metronomischen Chemotherapie hinsichtlich der B-Zellpopulation an das Tumorgeschehen im Körper gekoppelt zu sein.

Im Thymus werden die neuen T-Zellen für ihre unterschiedlichen Funktionen vorbereitet. Eine Einteilung erfolgt anhand der Oberflächenantigene CD4 und CD8. CD4⁺-T-Lymphozyten werden als Helferzellen bezeichnet und ihr Rezeptor erkennt MHC-Klasse-II-Moleküle. CD8⁺-T-Lymphozyten gelten als zytotoxische T-Zellen und ihr Rezeptor erkennt Antigene, die von fast allen Körperzellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Als Effektorzellen bezeichnet man in der Immunologie ausdifferenzierte Lymphozyten, die spezifische Aufgaben im Rahmen der Immunantwort übernehmen. Die Rolle der **CD4⁺-T-Zellen** im Pankreaskarzinom ist noch nicht bis ins Detail erforscht. Sicher ist jedoch, dass sie abhängig von der Zytokinausschüttung abläuft. CD4⁺-T-Zellen können sich in Th1, Th2, Th17 oder Treg differenzieren. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN- γ und induzieren B-Zellen, opsonisierende Antikörper herzustellen. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-6. (M. B. Wachsmann et al., 2012). In der vorliegenden Dissertation wurden die immunologischen Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie auf die CD4⁺-T- und CD8⁺-T-Zellen genauer untersucht. Betrachtet man die Population der Effektorzellen (CD4) in den *Milzen* der tumortragenden Mäuse *in vivo*, so fällt schnell auf, dass unter LD 5 FU und Gemcitabin die meisten Effektorzellen nachzuweisen waren. Die Anzahl unter TD und ULD beider Chemotherapeutika war etwas geringer oder etwa gleich groß. Die Zellpopulation der Effektor-Gedächtniszellen in den Milzen der tumortragenden Mäuse *in vivo* war unter TD 5 FU am größten, gefolgt von ULD 5 FU. Im Gegensatz zu den Effektorzellen konnten unter LD 5 FU die wenigsten Effektor-Gedächtniszellen identifiziert werden. In der *Tumormikroumgebung* konnten *in vivo* unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) mit 5 FU mehr Effektor-T-Zellen (CD4), ebenso wie mehr naive Zellen (CD4), im Vergleich zur Behandlung mit konventioneller Chemotherapie, durchflusszytometrisch bestimmt werden. Unter LD 5 FU konnten *in vivo* die meisten Effektor-Gedächtniszellen (CD4) nachgewiesen werden, ebenso wie unter TD und ULD 5 FU die meisten Zentralen-Gedächtniszellen differenziert werden. Unter der Behandlung mit Gemcitabin konnten *in vivo* in der Tumormikroumgebung unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) mehr Effektor- und naive Zellen (CD4), im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie, entdeckt werden. Betrachtet man diese Ergebnisse unabhängig vom Tumorgeschehen, so zeigt sich auch unter der

Behandlung der Milzen gesunder Mäuse *in vitro*, die positive Wirkung der metronomischen Chemotherapie auf die CD4⁺-T-Zellen. Vor allem unter ULD 5 FU konnten die meisten Effektor-, Effektor-Gedächtnis- und Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen werden. Insgesamt scheint sich die metronomische Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin positiv auf die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen auszuwirken. Im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie konnte unter LD und ULD beider Chemotherapeutika, in den meisten CD4⁺-T-Subpopulationen, mehr Zellen identifiziert werden.

Auch im Hinblick auf die **CD8⁺-T-Zellen** konnten *in vivo* in den *Milzen* der tumortragenden Mäuse unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) mit 5 FU mehr Effektor-Gedächtniszellen (CD8), im Vergleich zu den Kontrollen und der konventionellen Chemotherapie nachgewiesen werden. Unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) mit Gemcitabin konnten in diesem Zusammenhang ebenfalls die meisten Effektor-T-Zellen (CD8) und Effektor-Gedächtniszellen (CD8) differenziert werden, wobei die größte Anzahl jeweils unter der ULD Gemcitabin zu finden war. In der *Tumormikroumgebung* konnten unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) beider Chemotherapeutika mehr oder mindestens genauso viele Effektor-T-Zellen (CD8), naive Zellen (CD8) und Effektor-Gedächtniszellen (CD8) bestimmt werden. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich die metronomische Chemotherapie (LD und ULD) beider Chemotherapeutika positiv auf die Population der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen auswirkt. Dies bestätigt die Beobachtung anderer Wissenschaftler, die unter der metronomischer Chemotherapie mit CTX, Paclitaxel, Gemcitabin und Temozolomid eine Reduzierung der Treg im Tumor der Patienten und den tumortragenden Mäusen beobachtet haben, gleichzeitig aber eine Aktivierung der Effektorzellen festgestellt wurde (Hao et al., 2014; Shevchenko et al., 2013). Bei der Untersuchung der Treg in der *Tumormikroumgebung in vivo* konnten unter der Behandlung der tumortragenden Mäuse mit 5 FU und Gemcitabin unter LD und ULD die geringste Anzahl Treg durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich damit mit denen anderer Wissenschaftler. So konnte Kan et al. *in vitro* zeigen, dass Cyclophosphamid und Gemcitabin in niedriger Dosierung (low dose) die Anzahl der Treg reduziert, ohne dabei die Population der konventionellen CD4⁺-T-Zellen zu beeinträchtigen (Kan et al., 2012). Zusammenfassend kann unter der metronomischen Chemotherapie eine verbesserte Immunantwort bzgl. der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie dokumentiert werden. Mit Sicherheit hatte die erhöhte Anzahl dieser Zellen einen reduzierenden Einfluss auf das Tumolvolumen vor allem in der sehr geringen Dosierung (ULD).

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass niedrig dosierte metronomische Chemotherapie die Expression von MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche von Krebszellen fördert und damit die Antigen-abhängige Tötung durch die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen erleichtert. Zusätzlich induziert die

metronomische Chemotherapie in den Krebszellen einen "immunogenen Tod", der sich in Form einer Freisetzung immunstimulatorischer Faktoren manifestiert (Tagliamonte et al., 2016).

Um zu prüfen, inwiefern die **NK- oder CD8⁺-T-Zellen** für die **Zytotoxizität** gegenüber den Tumorzellen in den vorliegenden Ergebnissen verantwortlich sind, wurden die Immunzellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse durchflusszytometrisch charakterisiert. Zusammenfassend kann man nach der Auswertung der Ergebnisse des in vitro Experiments nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika festhalten, dass die Therapie mit 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der NK- und CD8⁺-T-Zellen keinen bedeutenden Einfluss hat. Besonders aufgefallen sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei der Untersuchung auf die Degranulationsmarker. Der Anteil der CD107⁺-Zellen der NK- ebenso wie der CD8⁺-T-Zellen der weiblichen Probanden war unter 5 FU und Gemcitabin signifikant höher als bei den männlichen Tieren. Woran der geschlechtsspezifische Unterschied liegt, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden. Vermutlich haben die weiblichen Probanden sensibler auf die Chemotherapeutika reagiert. Aus diesem Grund wäre es interessant, die immunmodulatorischen Auswirkungen der Chemotherapeutika auch geschlechtsspezifisch zu untersuchen. In der vorliegenden Dissertation wurden die Ergebnisse aus beiden Geschlechtern erhoben und gemeinsam ausgewertet. Daher lassen sich hinsichtlich der geschlechtsspezifischen, immunmodulatorischen Effekte auf die einzelnen Immunzellen leider keine Aussagen treffen. Die Ergebnisse des Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest (MTT) zeigen jedoch, dass die Behandlung der *Milzzellen gesunder Mäuse* mit konventioneller oder metronomischer Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin keinen bedeutenden Einfluss auf die Zellviabilität und das Geschlecht hatten. Trotz allem wird das Verhältnis der CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen zu den Treg als Hinweis auf die Überlebenszeit der Patienten betrachtet (Koumariou et al., 2014; Yao et al., 2012). Chemotherapeutische Mittel können ebenfalls in die molekularen und zellulären Mechanismen eingreifen und sind somit für die tumorinduzierte Immuntoleranz mit verantwortlich. Menschliche Kolonkarzinom-Zellen, die mit 5 FU behandelt wurden, reagierten empfindlicher auf die Lyse durch tumorspezifische zytotoxische T-Zellen (Michael R. Shurin, 2013; F. Tanaka et al., 2002). Die Rolle der zytotoxischen T-Zellen im Tumorgeschehen sollte daher in Zukunft weiter erforscht werden.

Abschließend kann mit den vorliegenden Ergebnissen unter der metronomischen Chemotherapie beider Chemotherapeutika eine verbesserte Immunantwort, im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie hinsichtlich der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, vor allem in Bezug auf die Anzahl der Subpopulationen, nachgewiesen werden.

4.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die Treg-, NK- und NKT-Zellen

Der Nachweis von T-Zellen im Pankreaskarzinom ist ein günstiger prognostischer Faktor und wird als Hinweis für die Existenz einer antitumoralen Immunität gewertet. Tumoren wissen sich jedoch durch verschiedene Mechanismen vor einer effektiven Immunantwort zu schützen. Eine zentrale Rolle spielen sogenannte **regulatorische T-Zellen (Treg)**, deren Vorkommen im Tumor mit einer schlechten Prognose korreliert. Es ist daher essentiell die Hypothese zu überprüfen, ob durch deren Elimination antitumorale Immunität induziert wird. In der von Pankreastumoren ausgehenden Immunsuppression sind die Treg von großer Bedeutung. Gegen Treg gerichtete Strategien sind in der Lage die Immunsuppression zu durchbrechen (Schnurr et al., 2008). In der Literatur wurde bereits berichtet, dass metronomische Chemotherapie die Anzahl der Treg verringern kann (Ghiringhelli et al., 2007; Landreneau et al., 2015). Um zu analysieren ob die metronomische Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin die vom Pankreaskarzinom ausgehende Immunsuppression vermindern oder durchbrechen kann, wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit die immunmodulatorischen Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie von 5 FU und Gemcitabin auf die Treg untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten in den *Milzen* der tumortragenden Mäusen unter der Behandlung mit Gemcitabin *in vivo* in allen Dosierungen sehr wenig Treg gefunden werden. Unter der Behandlung mit 5 FU *in vivo* wurden unter LD 5 FU die geringste Anzahl Treg dokumentiert. Insgesamt wurden unter der Therapie mit 5 FU und Gemcitabin weniger Treg nachgewiesen als ohne Chemotherapie. Bei der Untersuchung der Treg in der *Tumormikroumgebung in vivo* konnten unter der Behandlung der tumortragenden Mäuse mit 5 FU und Gemcitabin unter LD und ULD die geringste Anzahl Treg durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich mit denen anderer Wissenschaftler. So konnte Kan et al. *in vitro* zeigen, dass Cyclophosphamid und Gemcitabin in niedriger Dosierung (low dose) die Anzahl der Treg reduziert, ohne dabei die Population der CD4⁺-T-Zellen zu beeinträchtigen (Kan et al., 2012). In der Tumormikroumgebung konnten demnach in den vorliegenden Ergebnissen *in vivo* unter der metronomischen Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin (LD und ULD) mehr oder genauso viele CD4⁺-T-Zellen wie unter der konventionellen Chemotherapie nachgewiesen werden. Trotzdem war die Anzahl der CD4⁺-T-Zellen bei den Kontrollen teilweise höher als in den Behandlungsgruppen. Dies hängt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit mit der Zytotoxizität der Chemotherapeutika zusammen. Di Paolo et al. konnten im Mausmodell in ihrer *in vivo* Studie mit low dose Cyclophosphamid ebenfalls eine verminderte Anzahl tumorinfiltrierender Treg nachweisen (Di Paolo et al., 2006). Rettig et al. konnten eine signifikante Reduzierung der Treg auch unter der konventionellen Dosierung von Gemcitabin

feststellen. Er vermutet, dass die Population der Treg recht sensibel auf Chemotherapeutika reagiert und sieht daher viel Potential in der Untersuchung der unterschiedlichen Dosierung der Chemotherapeutika (Rettig et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte sogar eine Reduzierung der Treg bei den gesunden Mäusen nach der Chemotherapie beobachtet werden. Unter der Behandlung der *gesunden Mäuse* mit 5 FU *in vitro* konnten in den *Milzen* unter ULD die geringste Zellzahl der Treg nachgewiesen werden. Die Behandlung der gesunden Tiere mit Gemcitabin lieferte hingegen kein bedeutendes Ergebnis. Bei der Untersuchung der *Milzen der tumortragenden Mäuse* konnten unter 5 FU *in vitro* in allen Dosierungen weniger Treg als bei den unbehandelten Tieren erfasst werden.

Es stellt sich die Frage, wie es zur lokalen Anreicherung der Treg in der Tumormikroumgebung kommt und wie die regulatorische Wirkung der Treg abläuft. Tumorzellen können auf ihrer Oberfläche Tumor-assoziierte Antigene tragen, die den T-Zellen präsentiert werden und so die körpereigene Abwehrreaktion gegen den Tumor einleiten. Dabei kommt es zur Einwanderung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Tils). Unter den einwandernden T-Zellen befinden sich jedoch nicht nur zur Tumorabwehr befähigte Effektorzellen, sondern auch regulatorische T-Zellen, die die Tumorabwehrfunktion der Effektorzellen unterdrücken. Regulatorische T-Zellen hemmen T-Effektorzellen einerseits über Zell-Zell-Kontakte mit Hilfe von oberflächengebundenen Rezeptoren, andererseits über die Zytokine IL-10 und TGF- β (Abb. 4.4.1). Über den oberflächengebundenen inhibitorisch wirkenden Rezeptor CTLA-4 binden regulatorische T-Zellen direkt an antigenpräsentierende Zellen und inhibieren dadurch die Antigenpräsentation gegenüber Effektorzellen. Dabei werden die antigenpräsentierenden Zellen zusätzlich dazu angeregt das immunsuppressive Protein IDO (Indoleamin-2,3-Dioxygenase) zu bilden. Die Bildung des Botenstoffs IL-10 ist bei der Hemmung der Immunantwort dabei mindestens genauso wichtig, denn Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass regulatorische T-Zellen, die kein IL-10 bilden können, unterschiedlichste Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa, auslösen können. Regulatorische T-Zellen werden aber nicht nur bei Tumor- und Autoimmunerkrankungen gebildet. Im Grunde werden bei jeder Immunantwort nicht nur Effektor-T- und B-Zellen gebildet und an den Entzündungsherd/Tumor gelotst, sondern auch immer regulatorische T-Zellen, die eine überschießende Immunantwort eindämmen (Asseman, Mauze, Leach, Coffman, & Powrie, 1999; Campbell & Koch, 2011; Wing et al., 2008).

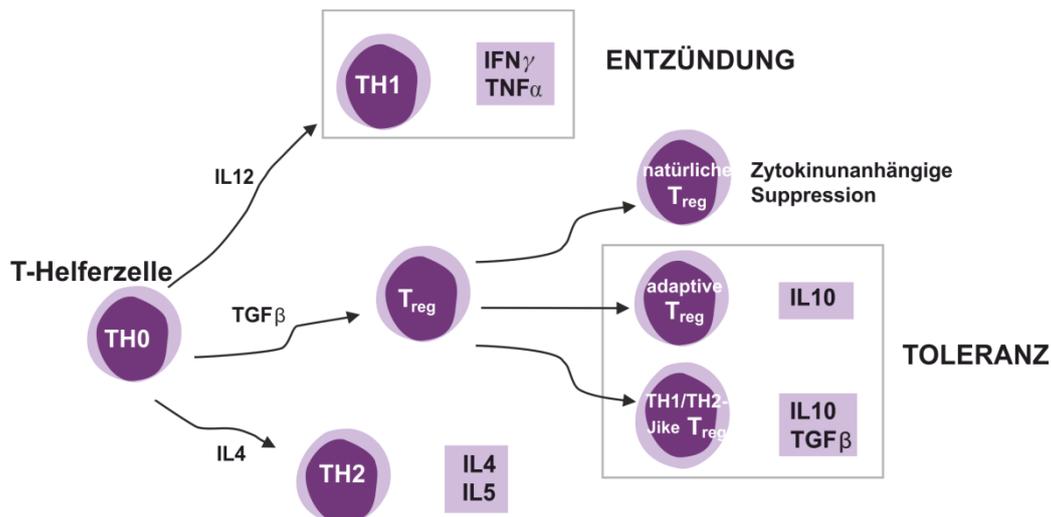


Abb. 4.4.1 Effektorzelltypisierung

URL: http://www.inflammatio.de/fileadmin/user_upload/inflammatio/Grafiken/Effekto_Abb_1.jpg (Stand: 12.08.2016).
Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

Da **IL-10 und TGF- β** für die Wirkung der Treg-Zellen so wichtig sind, wurden in dieser Dissertation die Konzentrationen von IL-10 und TGF- β in den Mediumüberständen der Tils gemessen. Dabei waren die Konzentrationen der beiden Zytokine bei den Kontrollen im Vergleich zu den Behandlungsgruppen deutlich höher. Das Ergebnis ist logisch, denn bei den unbehandelten Tieren konnten ebenso am meisten Treg und damit eine höhere Ausschüttung der Zytokine nachgewiesen werden.

Welche Rolle spielen nun die Treg in Bezug auf das Tumolvolumen? In vivo Studien deuten darauf hin, dass die Abnahme der Treg-Zellen in der Tumormikroumgebung des Pankreaskarzinoms das Tumorstadium hemmt und die tumorspezifische Immunabwehr fördert (Tan et al., 2009; Viehl et al., 2006). Dies bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation. In der Tumormikroumgebung wurden unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) deutlich weniger Treg im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie und den Kontrollen nachgewiesen. Das Tumorstadium fiel unter der metronomischen Chemotherapie beider Chemotherapeutika demnach auch gering aus. Ein Anstieg in der Treg-Zellpopulation basiert hingegen vor allem auf der TGF- β -Ausschüttung des Tumors (Liyanage et al., 2006; Moo-Young et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Veränderung der **TGF- β** Konzentration hinsichtlich der Dosierung der Chemotherapeutika genauer untersucht. Die höchste Anzahl der Treg konnte unter konventioneller Chemotherapie und den Kontrollen nachgewiesen werden. Die Kontrollen wiesen bei der Untersuchung der Tumormikroumgebung die höchste Konzentration TGF- β auf. Unter der Behandlung mit Gemcitabin konnten unter TD und ULD die geringsten Konzentrationen TGF- β festgestellt werden, während unter LD Gemcitabin der Wert ebenso hoch war wie bei den Kontrollen. Dies spiegelt sich auch im

Tumorvolumen wieder. Unter ULD Gemcitabin konnte ein viel geringeres Tumorvolumen gemessen werden als unter LD Gemcitabin. Unter der Behandlung mit LD und ULD 5 FU waren die Konzentrationen ähnlich, unter TD 5 FU jedoch minimal höher. Trotzdem fiel das Tumorvolumen unter TD 5 FU am geringsten aus, wobei das Tumorvolumen unter ULD 5 FU nur geringfügig größer war. Damit kann der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Treg-Zellen und der Konzentration von TGF- β in der Tumormikroumgebung mit den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Zusammenfassend stellt sich die metronomische Chemotherapie (LD und ULD) als erfolgreiche Therapie dar, die vor allem die Anzahl der Treg in der Tumormikroumgebung minimiert und damit eine wichtige Komponente für eine erfolgreiche Tumorbehandlung liefert.

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen. Erst seit kurzer Zeit wird der Subpopulation zytotoxischer Lymphozyten Aufmerksamkeit im Rahmen der Tumorentwicklung geschenkt. NK-Zellen können IFN- α , TNF- α , GM-CSF und IL-3 produzieren und töten ihre Zielzellen durch ein komplexes Zusammenspiel hemmender und aktivierender Signale. Es wird in der Literatur beschrieben, dass die NK-Zellen, der an Pankreaskarzinom erkrankten Patienten, zur Tumorzell-Lyse führen und einer hohen Zahl NK-Zellen eine bessere Prognose zugeschrieben wird. Im frühen Krankheitsstadium wird die Aktivität der NK-Zellen jedoch beeinträchtigt und verschlechtert sich im Laufe der Krankheit weiter (M. B. Wachsmann et al., 2012). NKG2D Liganden sind auf vielen Tumorzellen exprimiert, während man auf gesunden Zellen normalerweise keine dieser Liganden findet. Damit spielt der NKG2D-Rezeptor bei der Immunüberwachung im Kampf gegen den Tumor eine wichtige Rolle. Die Expression von NKG2D ist auf der Oberfläche von NK-, NKT-Zellen, CD8⁺-T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen zu finden, die unter anderem MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen. Sobald NKG2D Liganden auf Tumorzellen erkannt werden, aktiviert NKG2D die Lymphozyten und fördert die Immunantwort um letztlich die NKG2D exprimierenden Tumorzellen zu eliminieren. Es wurde in der Literatur beschrieben, dass IL-2, IL-12, IL-15 und IFN- α die NKG2D-Rezeptoren hochregulieren können und damit zu einer besseren Anti-Tumor-Antwort beitragen. Neueste wissenschaftliche Untersuchungen belegen, dass Chemotherapeutika, wie beispielsweise low dose CTX, die Sekretion immunstimulierender Zytokine steigert, die wiederum die Expression von NKG2D-Rezeptoren auf den NK-Zellen fördern und somit eine verbesserte Anti-Tumor-Immunität resultiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Serum der tumortragenden Mäuse unter der Behandlung mit ULD 5 FU die höchste Konzentration **IL-2** im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen und Kontrollen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Dissertation konnten unter der Behandlung mit ULD 5 FU in den Milzen in vivo am meisten **NKT-Zellen** nachgewiesen werden. Damit scheint ein

Zusammenhang zwischen der erhöhten Konzentration von IL-2 und dem Anstieg der NKT-Zellzahl sehr wahrscheinlich und bestätigt die bereits in der Vergangenheit beschriebenen Ergebnisse mit CTX. In den Mediumüberständen der *Tumoren* nach Therapie mit 5 FU konnte, verglichen mit den Mediumüberständen der *Milzen*, eine höhere Konzentration IL-2 dokumentiert werden. Betrachtet man in dieser Dissertation in vitro die Anzahl der NK- und NKT-Zellen in der Tumormikroumgebung, so lässt sich eine größere Anzahl dieser Zellen unter der Behandlung mit Gemcitabin im Vergleich zu den Kontrollen feststellen, wobei unter der therapeutischen Dosierung eine etwas größere Anzahl als unter der metronomischen Chemotherapie dargelegt wurde. Kürzlich konnte aufgezeigt werden, dass low-dose Dacarbazine die Expression der NKG2D Liganden auf den Tumorzellen triggert und somit zur Aktivierung der zytotoxischen Funktion der NK-Zellen beiträgt und im Melanom-Maus-Modell zur vermehrten Sekretion von IFN- γ führt. Low dose CTX, Doxorubicin und Cisplatin können damit zur Expression der NKG2D Liganden auf den Tumorzellen beitragen, der unter anderem die Aktivierung der NK- und NKT-Zellen auslöst. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen durch die Runterregulierung der NKG2D Expression dem Immunsystem entgehen können (Hao et al., 2014; Hayakawa, 2012).

4.5 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die MDSC und Makrophagen

Tumoren können dem Immunsystem auch entgehen und auf unterschiedliche Weise dafür sorgen, dass sie von den Abwehrzellen nicht erkannt werden oder dass die Immunreaktion unterdrückt wird. Sogenannte Immunsuppressorzellen spielen dabei eine wichtige Rolle. Im Blickfeld der Forschung liegen dabei vor allem myeloide Suppressorzellen (MDSC). „Darunter versteht man eine heterogene Gruppe unreifer Abwehrzellen, die aus dem Knochenmark stammen und bei Krebserkrankungen in stark erhöhter Zahl im Blut und im Tumorgewebe nachzuweisen sind“ (Zoglmeier et al., 2011).

Im Pankreaskarzinom unterhalten myeloide Zellen, wie **myeloid-derived suppressor cells (MDSC)**, ein potentes immunsuppressives Milieu. Man unterscheidet MDSC monozytären und granulozytären Ursprungs (M- bzw. G-MDSC), die sich im Tumor in alternativ-aktivierte M2/G2-Zellen differenzieren. Im Gegensatz zu M1/G1-Zellen, die produktive Immunantworten vermitteln, weisen M2/G2-Zellen immunsuppressive und tumorfördernde Funktionen auf (Kirchleitner, Schrom, Endres, Düwell, & Schnurr, 2014). Die gemeinsamen Eigenschaften der MDSC sind ihre Fähigkeit T-Zell Immunantworten zu unterdrücken, die Zytokinproduktion von Makrophagen zu modulieren und die Tumorangiogenese und Metastasierung zu fördern. Die Anzahl der MDSC steigt unter bestimmten pathologischen Bedingungen wie Krebs, Infektionen, Sepsis, Trauma und Autoimmunkrankheiten. Unter diesen Bedingungen differenzieren sich die unreifen myeloischen Zellen nicht zu reifen Makrophagen, Dendritischen Zellen oder Granulozyten, sondern entwickeln vielmehr immunsuppressive Funktionen wie beispielsweise die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ROS (reactive oxygen species) und NO (nitric oxide), die Expression von Arginase 1 und induzierbarer NO Synthase (Gabilovich & Nagaraj, 2009; Murdoch, Muthana, Coffelt, & Lewis, 2008; Sinha, Clements, Bunt, Albelda, & Ostrand-Rosenberg, 2007). MDSC können durch die Produktion von ROS und NO ebenso die Aktivierung der CD8⁺-T-Zellen blockieren (Husain, Huang, Seth, & Sukhatme, 2013; Alexandra Sevko et al., 2012; Talmadge & Gabilovich, 2013).

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass die metronomische Chemotherapie die Anzahl der MDSC verringern kann und dabei die Anti-Tumor-Immunität durch die T-Zellsubpopulationen aufrecht erhält (Husain et al., 2013; Talmadge & Gabilovich, 2013). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ebenso nachgewiesen werden. Während die Anzahl der MDSC in den *Milzen* der unbehandelten tumortragenden Mäuse in vivo sehr hoch war, wurden unter der Behandlung mit 5 FU unter konventioneller Chemotherapie etwas weniger MDSC gefunden. Unter low dose und ultra low dose 5 FU konnten am wenigsten MDSC identifiziert werden. Der Unterschied unter der metronomischen Behandlung mit 5 FU war im Vergleich zur konventionellen

Chemotherapie sehr deutlich. Unter der Behandlung mit Gemcitabin konnte keine bedeutende Reduzierung der MDSC in den Milzen der tumortragenden Mäuse *in vivo* beobachtet werden. *In vitro* konnten hingegen unter Gemcitabin und 5 FU eine Reduzierung der MDSC dokumentiert werden. *In vitro* gab es keinen bedeutenden Unterschied zwischen der metronomischen und konventionellen Chemotherapie. Unter Behandlung konnten beide Chemotherapeutika in allen Dosierungen die Anzahl der MDSC etwa gleich stark reduzieren. Vincent et al. konnten unter der Behandlung mit low dose 5 FU ebenfalls eine deutliche Verminderung der MDSC in den Milzen der tumortragenden Mäuse feststellen. Sie berichten, dass die Behandlung dabei keinerlei negative Auswirkung auf die B-, NK- und T-Zellen sowie den DZ hatte (J. Vincent et al., 2010). Diese Erkenntnis kann mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Eliminierung der MDSC durch 5 FU war mit einem Anstieg der Anti-Tumor-Immunität verbunden, die sich in Form einer vermehrten IFN- γ Produktion durch tumor-spezifische CD8⁺-T-Zellen manifestierte. In der Literatur wird eine Reduktion der MDSC unter metronomischer Chemotherapie vor allem in Mäusen mit Brustkrebs beschrieben. Vergleicht man jedoch den Effekt der beiden Chemotherapeutika auf die MDSC miteinander, scheint 5 FU die Zahl der MDSC stärker zu reduzieren und *in vivo* sowie *in vitro* zur Apoptose der MDSC beizutragen (Alizadeh et al., 2014; Annels et al., 2014; Ortiz, Lu, Ramachandran, & Gabrilovich, 2014; Sheng Sow & Mattarollo, 2013). Die stärkere Auswirkung von 5 FU *in vivo* auf die MDSC stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen der Arbeit überein. In einem weiteren *in vivo* Experiment wurde in dieser Dissertation die MDSC Population in der *Tumormikroumgebung* untersucht. Unter LD und ULD 5 FU konnte die geringste Anzahl MDSC nachgewiesen werden, während unter TD und ULD Gemcitabin am wenigsten MDSC in der Tumormikroumgebung zu finden waren. Damit erweist sich die metronomische Chemotherapie (LD und ULD 5 FU, ULD Gemcitabin) als Anti-Tumor-Immunitäts steigernd, indem sie die Anzahl der MDSC in der Tumormikroumgebung deutlich verringert und damit der tumorinduzierten Immunsuppression entgegensteuert.

Im murinen Melanom Modell konnte kürzlich *in vivo* unter der Therapie mit ultra low dose Paclitaxel (3 Injektionen/Woche) eine signifikante Reduktion der immunsuppressiven Aktivität und Ansammlung der tumorinfiltrierenden MDSC festgestellt werden. Landreneau et al. haben *in vitro* verschiedene Mechanismen von Paclitaxel auf die MDSC analysiert, um den Grund für das Anti-Tumor Potential der ultra low dose Paclitaxel Therapie in den Mäusen zu finden. Paclitaxel als ultra low dose Behandlung erhöht weder die Apoptose der MDSC, noch blockiert sie die MDSC Entstehung, sondern stimuliert die MDSC sich in DZ zu differenzieren (Landreneau et al., 2015). Im Rahmen des *in vitro* Experiments der vorliegenden Arbeit wurden die MDSC aus den Milzen der tumortragenden Mäuse weiter differenziert. Unter beiden Chemotherapeutika konnten mehr granulozytäre als monozytäre MDSC nachgewiesen werden. Während die Zahl der monozytären

MDSC in allen Behandlungsgruppen beider Therapeutika gleich niedrig ausfiel, wurden unter der metronomischen Chemotherapie von 5 FU und Gemcitabin mehr granulozytäre MDSC als unter der konventionellen Therapie entdeckt. Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen anderer Wissenschaftler, die in den meisten Tumormodellen 70-80% granulozytäre MDSC nachgewiesen haben. Beide Subpopulationen weisen eine erhöhte Arginase 1 Aktivität auf und verursachen durch den Abbau von Arginin T-Zell Suppression. Nur die monozytären MDSC können sich noch zu reifen DZ und Makrophagen differenzieren (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

MDSC wandern zum Tumor oder zu den lymphoiden Organen, deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auch die MDSC aus den Milzen und den Tumoren untersucht. Die MDSC-vermittelte Immunsuppression unterscheidet sich dabei je nach Lokalisation. In den *peripheren lymphoiden Organen* produzieren die MDSC hohe Konzentrationen ROS, weisen eine erhöhte Arginaseaktivität auf, regulieren STAT3 nach oben (Signal Transducers and Activators of Transcription) und produzieren relativ wenig NO. MDSC sind in der Lage Antigene aufzunehmen und antigenspezifischen CD8⁺-T-Zellen zu präsentieren. Während diesem engen Zell-Zell-Kontakt produzieren die MDSC Peroxynitrit was zur Nitrierung und Nitrosylierung verschiedener Aminosäuren im T-Zell-Rezeptor und den CD8 Molekülen auf der Oberfläche der T-Zellen führt. Dies wiederum führt zur Antigen-spezifischen Toleranz. Die T-Zellen sind nicht mehr in der Lage, bei Stimulation auf ein *spezifisches Antigen* zu reagieren (Abb. 4.5.1). MDSC, die sich im Tumor befinden, zeigen eine erhöhte STAT 1 Aktivität, eine hohe Konzentration iNOS (inducible nitric oxide synthase), NO, ebenso wie eine hohe Arginase Aktivität. Die Konzentration von ROS ist dabei relativ gering. Die großen Mengen von NO und Arginase, die von den MDSC freigesetzt werden, hemmen die T-Zell Funktion in einer nicht-spezifischen Art und Weise. MDSC, die sich *im Tumor* befinden, können sich auch zu Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) differenzieren. TAMs haben die Fähigkeit verschiedene suppressive Zytokine zu produzieren: IL-10, IL-1, IL-6 und TGF- β (Abb.4.5.1). Zusammen mit den MDSC tragen die TAMs zur *unspezifischen T-Zell-Unterdrückung* im Tumormikromilieu bei (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der MDSC und den Zytokinen **IL-10, IL-6 und TGF- β** nachgewiesen werden. Während unter der metronomischen Behandlung mit 5 FU in vivo in den Milzen und Tumoren jeweils viel weniger MDSC im Vergleich mit den Kontrollen und der konventionellen Chemotherapie mit 5 FU dokumentiert wurden, waren ebenso bedeutend weniger IL-10, IL-6 und TGF- β im Blut der Mäuse nachzuweisen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass sich hier viel weniger MDSC in den Tumoren zu TAM differenziert und sie somit weniger Zytokine ausgeschüttet haben. Dasselbe Ergebnis konnte in den in vitro Experimenten der

tumortragenden Mäuse nachgewiesen werden. Dabei wurden die Mediumüberstände der Tils der tumortragenden Mäuse auf die Zytokine untersucht. Wie bei der Anzahl der MDSC, fällt die Anzahl der genannten Zytokine unter der metronomischen Chemotherapie mit 5 FU niedriger aus, im Vergleich mit den Kontrollen und größtenteils geringer im Vergleich mit der TD 5 FU. Die Ergebnisse unter der Behandlung mit Gemcitabin in vivo und in vitro bzgl. den Zytokinen fallen ähnlich aus, jedoch nicht so deutlich wie unter 5 FU. Das hängt wohl damit zusammen, dass die MDSC unter Gemcitabin nicht so sensibel reagiert haben als unter 5 FU, wie bereits vorne beschrieben.

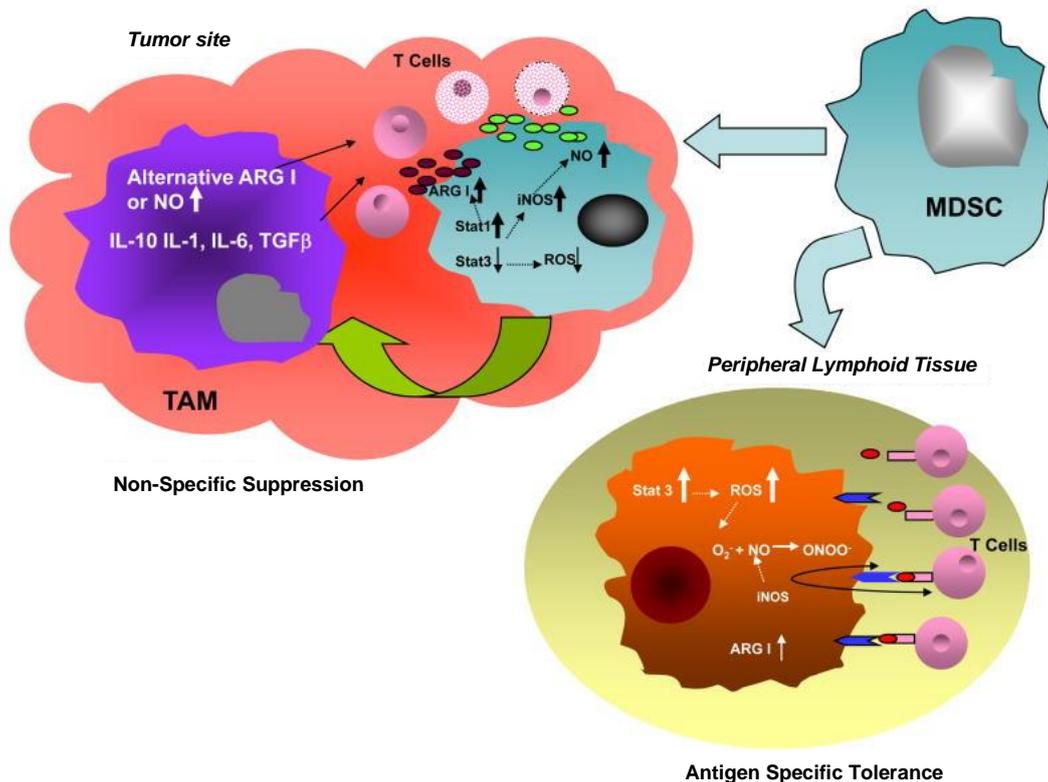
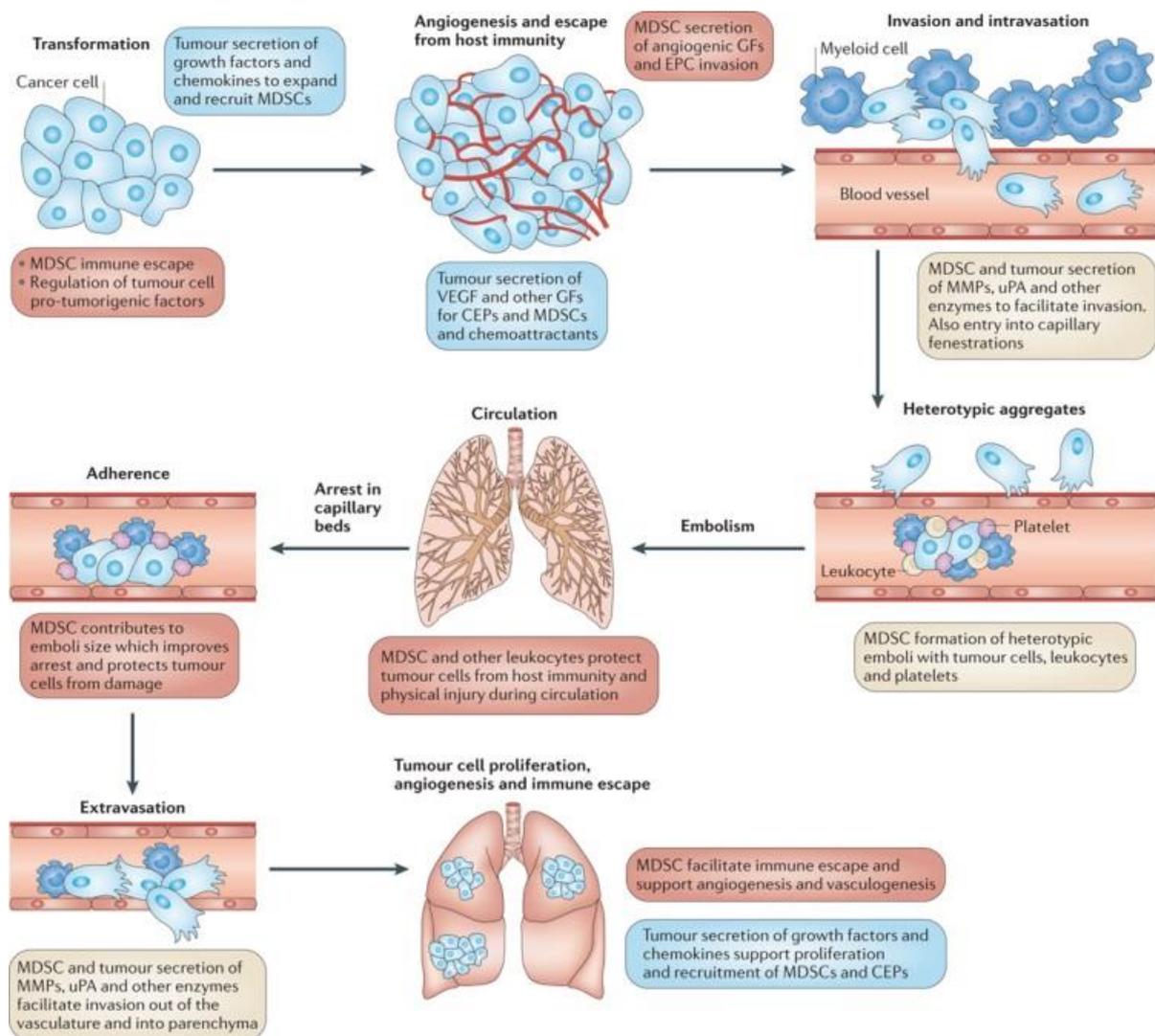


Abb. 4.5.1 Mechanismen der MDSC-vermittelten Immunsuppression in lymphoiden Organen und im Tumor (Talmadge & Gabrilovich, 2013) URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2828349/figure/F4/> (Stand: 12.08.2016). Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich beide Chemotherapeutika in metronomischer Verabreichung auf die MDSC auswirken und zu einer deutlichen Reduktion in den tumortragenden Mäusen führen. Da 5 FU einen stärkeren Effekt auf die MDSC hat, scheinen die MDSC auf 5 FU sensibler zu reagieren. Auch die gesunden Mäuse reagierten auf die Behandlung mit 5 FU, während Gemcitabin keinen Einfluss auf die MDSC Population in den Milzen der gesunden Mäuse hatte. Unter 5 FU konnte in den gesunden Mäusen jedoch unter LD und ULD mehr MDSC als unter TD und den Kontrollen nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass das Tumorgeschehen und die Wirkung der Chemotherapeutika in engem Zusammenhang stehen. Die Verringerung der MDSC unter metronomischer Chemotherapie scheint daher nur in tumortragenden Mäusen der Fall zu sein.

Insgesamt stimmen damit die vorliegenden Ergebnissen bzgl. der immunmodulierenden Effekte der beiden Chemotherapeutika mit den bisherigen Erkenntnissen der Wissenschaft überein. Neben vielen anderen Wissenschaftlern haben Sumida et al., Vincent et al. und Kodumudi et al. bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass 5 FU, Gemcitabin und Docetaxel die Anzahl der MDSC verringern kann (Kodumudi et al., 2010; Sumida et al., 2012; J. Vincent et al., 2010). Vincent et al. schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass die Anti-Tumor-Effekte von 5 FU auf der selektiven zytotoxischen Auswirkung auf die MDSC beruht. Die Eliminierung der MDSC durch 5 FU erhöht die Produktion von IFN- γ durch die tumorinfiltrierenden CD8⁺-T-Zellen und fördert somit die T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Antwort in vivo (J. Vincent et al., 2010).

Betrachtet man nun die genannten Ergebnisse hinsichtlich der *Tumorgroße und Metastasierung*, spielen die MDSC eine bedeutende Rolle. Das Tumorwachstum und die Metastasierung sind mehrstufige Prozesse, die entscheidend von den MDSC beeinflusst werden. Zahlreiche Studien von tumortragenden Mäusen und einige klinische Studien haben gezeigt, dass die Reduzierung der MDSC zu einer verzögerten Tumorinitiation führt, das Wachstum hemmt und das Überleben verlängert (Serafini, Meckel, et al., 2006; Suzuki, Kapoor, Jassar, Kaiser, & Albelda, 2005; Talmadge & Gabrilovich, 2013). Abb. 4.5.2 stellt die unterschiedlichen Rollen der MDSC während der Tumorprogression und der Metastasierung anschaulich dar.



Nature Reviews | Cancer

Abb. 4.5.2 Die Rolle der MDSC während des Tumorwachstums und der Metastasierung (Talmadge & Gabrilovich, 2013)

URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358792/figure/F2/> (Stand: 12.08.2016). Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

Shevchenko et al. konnten im orthotopen PDAC Modell unter low-dose Gemcitabin jedoch keine Effekte auf die MDSC feststellen (Shevchenko et al., 2013).

Makrophagen sind für die angeborene Immunität von Bedeutung und entwickeln sich aus den peripheren Monozyten. Im Vergleich zum gesunden Bauchspeicheldrüsengewebe findet man viel mehr Makrophagen im Pankreaskarzinom. Sica et al. haben zur Rolle der M1/M2 -Makrophagen bei der Tumorentwicklung eine Hypothese aufgestellt. Sie nehmen an, dass im frühen Verlauf der Tumorerkrankung der M1-Makrophagen-Phänotyp dominiert (hohe IL-12, IL-23 und TNF- α -Werte, toxische Zwischenprodukte) und die inflammatorischen und toxischen Zwischenprodukte die Tumorentwicklung fördern. Sobald jedoch der M2-Makrophagen-Phänotyp dominiert (TGF- β , IL-10-Produktion), kommt es zur Beeinträchtigung der Th1-Antwort und einer weiteren Förderung des

Tumorstadiums. Dies unterstützt wiederum die Hypothese der früh aktiven Th1-Antwort (Erzeugung von Anti-Tumor-T-Zellen, NK-Zellen, Antikörpern und Zytokinen) die im Laufe der Krankheit weniger wirksam wird. Verantwortlich sind dafür unter anderem die erhöhte Anzahl der Treg und die erhöhte Th2-Zytokin-Produktion (Sica et al., 2008). Clark et al. untersuchten die Immunantwort vom Beginn der Erkrankung bis zum fortgeschrittenen Stadium im Mausmodell. Sie fanden heraus, dass im frühen Stadium der Tumorerkrankung weniger Effektor-T-Zellen vorliegen, dafür aber jede Menge MDSC, Makrophagen und Treg. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Immunantwort schon zu Beginn der Erkrankung unterdrückt wird und es nicht zu einer erfolgreichen Anti-Tumor-Antwort kommen kann (Clark, Beatty, & Vonderheide, 2009; Clark et al., 2007).

In der vorliegenden Dissertation konnten in den Milzen der unbehandelten, tumortragenden Tiere am meisten Makrophagen nachgewiesen werden. In der Tumormikroumgebung, unter der Behandlung mit LD 5 FU *in vivo*, konnten jedoch genauso viele Makrophagen wie in den Kontrollen gefunden werden. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Unterteilung zwischen M1/M2 vorgenommen wurde, können aus den vorliegenden Ergebnissen keine weiteren Schlüsse zu der oben genannten Hypothese getroffen werden. Außerdem wurden die Tiere alle zum gleichen Zeitpunkt getötet und somit kann keine Aussage über die Entwicklung der Immunantwort im Laufe des Tumorgeschehens getroffen werden. Beim Blick auf die vorliegenden Ergebnisse scheinen die Makrophagen hinsichtlich des Tumorstadiums eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Ebenso ergaben sich aus den Ergebnissen keine eindeutigen Hinweise zur immunmodulatorischen Auswirkung der metronomischen Chemotherapie auf die Makrophagen. Auch in der Literatur sind andere Zellpopulationen (MDSC, Treg, DZ) in diesem Zusammenhang im Fokus. Trotzdem ist der Ansatz der oben beschriebenen Hypothese logisch und sollte weiter erforscht werden.

4.6 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die DZ

Dendritische Zellen sind verantwortlich für die Erkennung von Krankheitserregern und geschädigtem Gewebe, der Aktivierung der Immunität und der Erhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. Sie bilden die entscheidende Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Als Vermittler der Immunität übernehmen sie zwei klar voneinander abgrenzbare Schlüsselfunktionen. Als unreife Zellen sind sie für die Aufnahme und Verarbeitung von Antigenen zuständig. Kurze Zeit später sorgen sie dann als reife Zellen für die Stimulierung hauptsächlich von T-, aber auch B-Zellen, indem sie diesen große Mengen des verarbeiteten Antigens in Form von MHC-Peptid-Komplexen, zusammen mit co-stimulierenden Molekülen, an ihrer Oberfläche präsentieren (Watowich & Liu, 2010). DZ spielen eine bedeutende Rolle bei der Initiierung der Immunantwort gegen den Tumor. Tumorprogression und der Einfluss der Tumormikroumgebung kann die Rekrutierung, Differenzierung, Reifung und das Überleben der DZ jedoch hemmen. Ma et al. haben die Mechanismen analysiert mit denen Tumorzellen DZ regulieren. Demnach sind mehrere Faktoren in den DZ-Tumorzell Cross-talk involviert. Zu diesen Faktoren zählen GM-CSF, VEGF, TGF- β , IL-10 und reactive oxygen species (ROS). Tumorzellen produzieren oder exprimieren verschiedene Metaboliten oder Proteine, die die DZ an der Rekrutierung, der Differenzierung, Migration, Aktivierung und Präsentation der Antigene hindern und somit eine tumorspezifische T-Zellantwort hemmen (Ma, Aymeric, Locher, Kroemer, & Zitvogel, 2011). DZ kommen selten im Pankreaskarzinom vor und befinden sich im Außenrand des Tumors (Dallal et al., 2002). Einige Wissenschaftler berichten, dass unterschiedliche Chemotherapeutika in low dose, wie beispielsweise CTX, Doxorubicin, Etoposide, Methotrexate, Paclitaxel und Vinblastine die Reifung und Phagozytosefähigkeit der DZ verbessert (Hao et al., 2014). Shurin et al. berichten, dass die metronomische Chemotherapie die Funktion der DZ durch die Hochregulierung der Antigenprozessierung, MHC-Klasse-II und den co-stimulatorischen Molekülen (CD40) verbessert (Chen & Emens, 2013; Salem et al., 2010; M. R. Shurin, 2013).

Low dose Vinblastin kann durch die Erhöhung der Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, sowie MHC-Klasse-II, IL-1 und IL-6, signifikant die Fähigkeit zur Stimulierung der T-Zellen verbessern und damit die phänotypische und funktionelle Reifung der menschlichen und murinen DZ induzieren (H. Tanaka, Matsushima, Mizumoto, & Takashima, 2009). Außerdem konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass antineoplastische, chemotherapeutische Medikamente wie Paclitaxel, Doxorubicin, Mitomycin C und Methotrexat die Fähigkeit der DZ verbessern, Antigen-spezifischen T-Zellen Antigene zu präsentieren, wenn sie in extrem niedrigen, nicht-zytotoxischen Konzentrationen (ULD) verabreicht werden (G. V. Shurin et al., 2009). Die Fähigkeit der verbesserten

Antigen-Präsentation der DZ basiert auf der autokrinen oder parakrinen IL-12-Signalgebung. Paclitaxel, Methotrexat und Doxorubicin scheinen in ultra-niedrig, nicht zytotoxischen Konzentrationen die phagozytische Fähigkeit der DZ weiter zu erhöhen. Der Grund liegt in der Regulierung der Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen Rac 1/2, RhoA und RhoE in den murinen DZ (G. V. Shurin, Tourkova, & Shurin, 2008).

In der vorliegenden Dissertation konnte in den *Milzen der tumortragenden Mäuse* unter der metronomischen Behandlung (LD und ULD) mit 5 FU die höchste Anzahl cDZ nachgewiesen werden. Zudem war die Anzahl der reifen pDZ unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) 5 FU in den Milzen der tumortragenden Mäuse sehr hoch. Unter der metronomischen Behandlung (LD und ULD) mit Gemcitabin konnten in den Milzen der tumortragenden Mäuse weniger cDZ als unter 5 FU dokumentiert werden. Die Anzahl der reifen pDZ hingegen war ebenso hoch wie unter 5 FU. Betrachtet man die Reifungsmarker CD80/86 der reifen cDZ und pDZ, so konnten unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) mit Gemcitabin jeweils weniger Reifungsmarker nachgewiesen werden als unter TD und den Kontrollen. Damit kann die Beobachtung unter low dose Vinblastin von Tanaka et al. bezüglich der Reifungsmarker nicht bestätigt werden, wobei bei den vorliegenden Ergebnissen die Anzahl der Reifungsmarker unter ULD höher ausfiel als unter LD. In der vorliegenden Arbeit wurden andere Chemotherapeutika als in der zitierten Literatur verwendet und somit liegt eine andere Immunmodulation auf die DZ vor.

In der *Tumormikroumgebung der Mäuse* konnten unter der metronomischen Behandlung (LD und ULD) mit 5 FU deutlich weniger cDZ und reife cDZ im Vergleich zur metronomischen Behandlung mit Gemcitabin nachgewiesen werden. Die Anzahl der Reifungsmarker (CD80/CD86) der reifen cDZ waren unter ULD beider Chemotherapeutika jedoch sehr hoch. Die Anzahl der Reifungsmarker der reifen cDZ war unter ULD Gemcitabin im Vergleich mit den anderen Behandlungsgruppen und den Kontrollen am höchsten. Ebenso konnten unter LD und ULD Gemcitabin die meisten Reifungsmarker (CD80/CD86) der reifen pDZ dokumentiert werden. Insgesamt scheint die metronomische Chemotherapie (LD und ULD) mit Gemcitabin eine stärkere immunmodulierende Auswirkung in der Tumormikroumgebung auf die DZ im Vergleich zu 5 FU haben. Damit konnte die in der Literatur beschriebene Auswirkung der metronomischen Chemotherapie auf die Population der DZ hinsichtlich der Reifungsmarker und der Anzahl der DZ bestätigt werden. Insgesamt fielen die Ergebnisse in der Tumormikroumgebung für beide Chemotherapeutika größtenteils unter ULD etwas besser aus als unter LD.

Tjomsland et al. fanden heraus, dass ein hoher Prozentsatz zirkulierender, myeloider DZ (cDZ) oder eine große Anzahl DZ im Tumor das Überleben der Patienten verlängert (Yamamoto et al., 2012). Vor

allem die reifen DZ im Blut wirken sich positiv auf die Krankheitskontrolle und ein verlängertes Überleben aus (Tjomsland, Sandstrom, et al., 2010; Tjomsland, Spangeus, et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten vor allem unter LD und ULD 5 FU eine sehr hohe Anzahl cDZ in den Milzen festgestellt werden. Auch unter der Behandlung mit LD Gemcitabin konnte eine hohe Anzahl cDZ in den Milzen dokumentiert werden. Damit ist der Prozentsatz der zirkulierenden cDZ unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD 5 FU/ULD Gemcitabin) hoch, die Anzahl der DZ im Tumor vor allem unter der Behandlung mit Gemcitabin hoch. Daher lässt sich durch die vorliegenden Ergebnisse die immunmodulatorische Wirkung der metronomischen Chemotherapie auf die DZ nachweisen und könnte damit mitverantwortlich für das geringe Tumolvolumen unter ULD 5 FU und ULD Gemcitabin sein.

Mehrere präklinische Studien am Menschen und im Mausmodell haben die Auswirkungen von metronomischer Chemotherapie auf das Immunsystem bestätigt. Die Auswirkungen von ultra-low-dose verschiedener Klassen von Chemotherapeutika auf die menschlichen DZ, wurden bereits in vitro charakterisiert. DZ, die mit Vincristin, Vinblastin und Paclitaxel, 5-Aza-2-desoxycytidin und Methotrexat behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Expression der CD83 und CD40-Moleküle. Die Expression von CD80 auf den DZ, wurde auch von Vinblastin, Paclitaxel, Azacytidin, Methotrexat und Mitomycin C, in besonders niedrig, nicht-toxischen Konzentrationen stimuliert. Diese Daten aus der Vergangenheit zeigen, dass die metronomische Chemotherapie (LD und ULD) nicht zur Apoptose von humanen DZ führen, sondern die Reifung und Funktionen der DZ verbessern (R. Kaneno, Shurin, Tourkova, & Shurin, 2009).

4.7 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die Zytokine

4.7.1 IL-1 β , IL-17

Die Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluorouracil aktivieren eine Signalkaskade in den MDSC, die zur Sekretion von IL-1 β führt (Abb. 4.7.1.1). Nach Eintritt in die Zelle werden die Medikamente durch eine Kinase-vermittelte Phosphorylierung metabolisiert und die Metaboliten an ihre Zielmoleküle gebunden, wie beispielsweise an das proapoptotische Protein Bax. Dies führt zur Destabilisierung der Lysosomen und zur Freisetzung von Cathepsin B. Cathepsin B interagiert direkt mit der Leucin-rich-repeat (LRR) Domäne von NLRP3 Inflammasom und aktiviert diese. Danach verwandelt sich das Inflammasom pro-Caspase-1 in ein aktives Enzym, das wiederum pro-IL-1 β (Vorläufer von IL-1 β) spaltet und zur Bildung eines biologisch aktiven Zytokins führt, das von den MDSC freigesetzt wird. IL-1 β ist ein wichtiger Regulator der CD4⁺-T-Helferzell-Population und fördert die Entstehung von TH17 Subpopulationen, die IL-17 produzieren. Das Zytokin IL-1 β kann die Ausbreitung und Ansammlung der MDSC begünstigen und vorantreiben. IL-17 spielt eine aktive Rolle bei der Pathogenese und der Progression des Tumors, indem es die MDSC Entstehung im Tumor fördert, die Tumordinfiltration durch zytotoxische T-Zellen reduziert und intratumorale Neoangiogenese induziert (Bruchard et al., 2013; Michael R. Shurin, 2013). Bruchard et al. konnte in seinen Studien zeigen, dass Gemcitabin und 5 FU neben der Reduzierung der Zellzahl der MDSC durchaus auch zur Förderung des Tumorwachstums durch die IL-17 Produktion der T-Zellen beitragen kann. Diese Studien zeigen deutlich, dass eine Kombination von chemotherapeutischen Medikamenten mit spezifischen immuntherapeutischen Ansätzen sinnvoll ist. In diesem Fall könnte ein IL-1-Rezeptorantagonist die Anti-Tumor-Wirkung verbessern. Außerdem zeigt dieses Beispiel wie wichtig es ist, die immunmodulatorischen Wirkungen der einzelnen Chemotherapeutika genau zu erforschen und dabei auch die Subpopulationen detailliert zu untersuchen. Während die Chemotherapeutika ähnliche molekulare Mechanismen nutzen um die Immunantwort zu beeinflussen, können sie durchaus auf die Subpopulationen unterschiedliche Wirkungen und damit auch auf die Anti-Tumor-Immunität haben. IL-17 hat sich als Zytokin mit pro- und anti-Tumor-Wirkung herauskristallisiert. Die Wirkung scheint sehr stark von der Tumorumgebung, dem Grad der Entzündung und der Stabilität der IL-17-produzierenden Zellen abhängig zu sein. Es sind weitere Studien erforderlich um zu verstehen wie die Chemotherapeutika auf die unterschiedlichen Quellen von IL-17 wirkt und wie diese Effekte die Entwicklung der pro- und anti-Tumor-Antwort verändern (M. R. Shurin, 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde aus diesem Grund das Blut, die Milzen und die Tumoren ebenfalls auf die Zytokine IL-1 β und IL-17 untersucht. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse aus dem Blut der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin, konnte jeweils eine geringere Zahl an IL-1 β und IL-17, im Vergleich mit den unbehandelten Tieren, festgestellt werden. TD und ULD 5 FU und Gemcitabin lieferten hinsichtlich beider Zytokine eine geringere Konzentration im Blut als unter LD 5 FU und Gemcitabin. Damit zeigt die metronomische Chemotherapie (ULD) mit 5 FU und Gemcitabin *in vivo* einen reduzierenden Effekt bezüglich der Konzentration der Zytokine IL-1 β und IL-17 im Blut der tumortragenden Mäuse. Die *in vitro* Experimente lieferten ein ähnliches Ergebnis. Bei der Untersuchung der Mediumüberstände (Tils der tumortragenden Mäuse) auf die beiden Zytokine konnte unter allen Dosierungen von 5 FU und Gemcitabin eine deutliche Reduzierung der Konzentration von IL-1 β und IL-17, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren beobachtet werden. Damit widersprechen diese Ergebnisse den oben beschriebenen Erkenntnissen von Bruchard et al. Sie berichten von Chemotherapie-induzierten, erhöhten IL-1 β und IL-17 Konzentrationen durch 5 FU und Gemcitabin. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Hier war eine deutlich höhere Konzentration beider Zytokine *in vivo* und *in vitro* im Tumor und im Blut der unbehandelten Tiere nachzuweisen. Da die Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin, wie bereits im Abschnitt 4.5 beschrieben, die Anzahl der MDSC herabsetzt, scheint hier ein deutlicher Zusammenhang vorzuliegen. **Weniger MDSC -> weniger IL-1 β -> weniger IL-17** und dadurch eine **verbesserte Anti-Tumor-Antwort**. Shurin vermutet ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Abbau der MDSC und der damit verminderten IL-1 β Ausschüttung (Michael R. Shurin, 2013). Ob dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit für das geringe Tumolvolumen unter ULD 5 FU und Gemcitabin verantwortlich ist, kann man abschließend nicht genau sagen. Fest steht aber, dass dieser Effekt der metronomischen Chemotherapie einen großen und wichtigen Teil gemeinsam mit den weiteren Effekten der metronomischen Chemotherapie zur Anti-Tumor-Antwort beiträgt und somit das Tumorstadium hemmen kann.

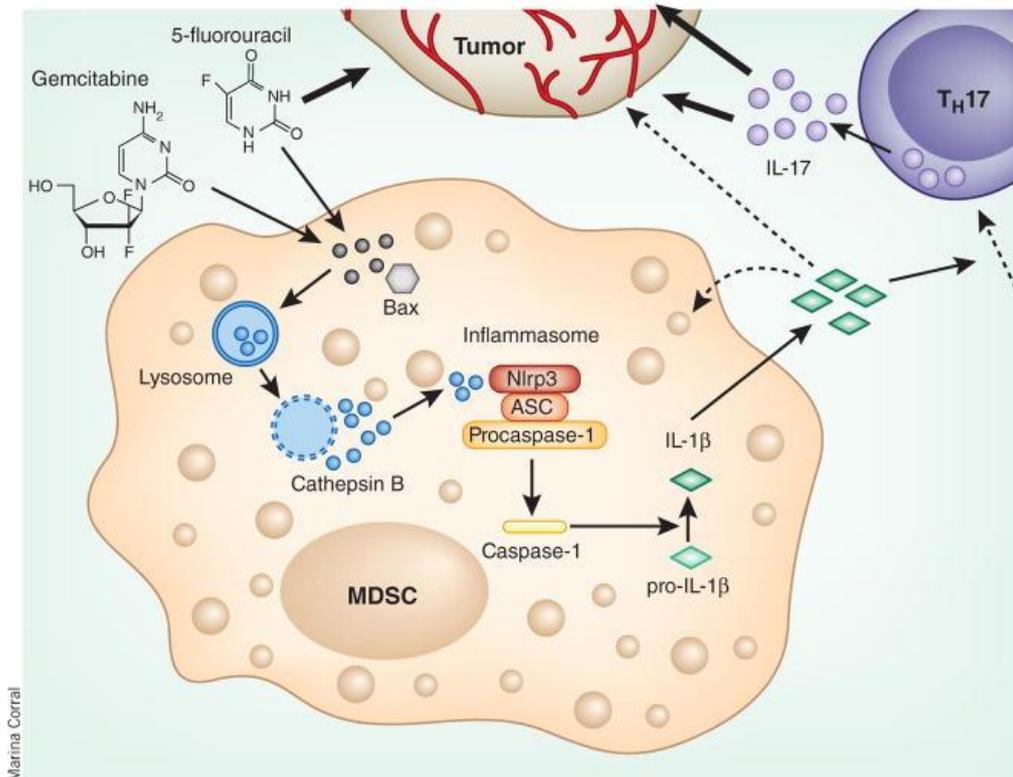


Abb. 4.7.1.1 Chemotherapie-induzierte Immunzell-vermittelte Hemmung der Anti-Tumor-Wirksamkeit (M. R. Shurin, 2013) URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4045109/figure/F1/> (Stand: 12.08.2016). Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

4.7.2 IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β

Die immunmodulatorischen Effekte von 5 FU und Gemcitabin auf diese Zytokine werden in den Abschnitten 4.4 und 4.5 beschrieben.

4.7.3 IFN- γ , VEGF

Krebs ist eine Krankheit der Tumorzellen und der Tumormikroumgebung. Diese Erkenntnis hat sich in den letzten Jahren in der Wissenschaft immer mehr durchgesetzt (Hanahan & Weinberg, 2011).

VEGF ist ein wichtiges Signalmolekül, das sowohl in der Vaskulogenese als auch in der Angiogenese seine Wirkung entfaltet. Wie der Name bereits impliziert, stimuliert dieser Faktor hauptsächlich vaskuläres Endothel, hat aber auch Effekte auf andere Zellen wie beispielsweise die Stimulation der Migration von Monozyten und Makrophagen. In vitro stimuliert VEGF die Teilung und Migration von Endothelzellen. Die Produktion von VEGF wird angeregt, wenn Zellen nicht genug Sauerstoff erhalten. In diesem Fall produzieren Zellen hypoxie-induzierte Faktoren, welche zur Ausschüttung von VEGF und schließlich zur Angiogenese führen (Izzedine, Rixe, Billefont, Baumelou, & Deray). Eine erhöhte Expression von VEGF-A wird bei einer Reihe von Tumoren gefunden (Izzedine et al.).

Metronomische Chemotherapien richten sich nicht nur gegen den Tumor selbst, sondern auch gegen das umgebende Gewebe. Das soll das gesamte Tumorsystem aus seinem Gleichgewicht bringen und nachhaltig schädigen. Es ist wichtig, die angiogenen Wirkungen von herkömmlichen anti-angiogenen Medikamenten von der anti-angiogenen Wirkungen der metronomischen Chemotherapie zu unterscheiden, da die zugrunde liegenden Mechanismen unterschiedlich sind. Die metronomische Chemotherapie hemmt direkt die Quelle der Produktion von Wachstumsfaktoren (Fibroblasten und Tumor Endothelial Cells (TECs)), während sich die anti-angiogenen Medikamente auf den Wachstumsfaktor selbst konzentrieren (Klement et al., 2000; Scharovsky, Mainetti, & Rozados, 2009; Shih & Lindley, 2006).

VEGF ist als pro-angiogener Wachstumsfaktor in die Pathogenese vieler Krebsarten verwickelt (Ferrara, 2000). Im Tumor der Bauchspeicheldrüse fördert VEGF das Tumorwachstum, die Invasion und Metastasierung durch die Aktivierung des MAPK-Weg (Mitogen-Activated Protein Kinase) und fungiert zusätzlich als autokriner Wachstumsfaktor für die Tumorzellen (Itakura, Ishiwata, Shen, Kornmann, & Korc, 2000; Masood et al., 2001; von Marschall et al., 2000). Die Überexpression von VEGF und seinen Rezeptoren tritt in >90% der an Pankreaskarzinom erkrankten Patienten auf und korreliert mit einer schlechten Prognose (Karayiannakis et al., 2003; Kuwahara et al., 2003). Präklinische Daten deuten darauf hin, dass die Hemmung von VEGF das Tumorwachstum und die Metastasierung vermindert (Bruns et al., 2002). Somit stellt VEGF ein attraktives, therapeutisches Ziel dar. In der vorliegenden Dissertation wurden die Konzentrationen von VEGF im Blut, den Mediumüberständen der Milzen und den Mediumüberständen der Tils (Tumormikromilieu) bestimmt. Ziel der Untersuchung war die Analyse der VEGF Konzentrationen nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie. *Im Serum* der tumortragenden Mäuse konnte unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin eine sehr viel geringere Konzentration VEGF im Vergleich mit den Kontrollen nachgewiesen werden. Dabei waren kaum Unterschiede zwischen der konventionellen und metronomischen Chemotherapie zu erkennen. Betrachtet man nun die Zytokinkonzentrationen in der *Tumormikroumgebung*, fällt auf, dass die Kontrollen die niedrigsten Konzentrationen VEGF aufweisen. Die metronomische Chemotherapie mit 5 FU wies geringere Werte als die konventionelle Chemotherapie auf. Der Wert unter ULD 5 FU war noch etwas geringer als unter LD 5 FU. Unter der metronomischen Behandlung mit Gemcitabin waren die Konzentrationen von VEGF deutlich höher als unter TD Gemcitabin und den Kontrollen. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich die Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin hinsichtlich der Serumkonzentration von VEGF positiv auswirkt. In allen Dosierungen konnte eine niedrige Konzentration dokumentiert werden. Einen senkenden Einfluss auf die VEGF Werte in der Tumormikroumgebung konnte nur unter 5 FU nachgewiesen werden. Damit kann zumindest für die

Serumkonzentrationen in allen Dosierungen beider Chemotherapeutika und unter der metronomischen Behandlung mit 5 FU in der Tumormikroumgebung eine niedrige VEGF Konzentration erreicht werden. Auf diese Weise konnte in dieser Arbeit zumindest teilweise die in der Literatur beschriebene anti-angiogene Wirkung durch metronomische Chemotherapie aufgezeigt werden. Bereits in der Vergangenheit konnten Wissenschaftler beweisen, dass niedrig dosierte Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil oder Cyclophosphamid einen Gegenspieler des Gefäßwachstumsfaktors VEGF hochregulieren. Dieses sogenannte Thrombospondin-1 hemmt die Angiogenese zur Tumorversorgung (H.-Y. Zhao et al.).

IFN- γ ist neben IL-2 das hauptsächlich aktivierende Zytokin für zytotoxische T-Zellen. Es aktiviert Makrophagen und induziert die Bildung von MHC-Klasse-II. IFN- γ wird im Zuge der angeborenen Immunantwort von NK-Zellen und NK-T-Zellen sowie im Zuge der adaptiven Immunantwort sowohl von CD4⁺- als auch von CD8⁺-T-Zellen gebildet (Zaidi & Merlino, 2011). Die am besten charakterisierte Funktion von IFN- γ ist die Hochregulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle um die Antigen-präsentierenden Zellen beim Priming und der Präsentation ihrer Antigene zu unterstützen (Seliger, Ruiz-Cabello, & Garrido, 2008). IFN- γ reguliert die Differenzierung und Funktionen vieler Immunzellen. Das Zytokin ist an der Th1-vermittelten Immunreaktion beteiligt, indem es die Differenzierung, Aktivierung und Homöostase der T-Zellen reguliert. Zudem hemmt IFN- γ die Th2-Zell-Entwicklung, fördert dafür jedoch die Entwicklung von Treg (Agnello et al., 2003). Außerdem induziert IFN- γ die Produktion von Chemokinen, die spezifische Effektor-Zellen an den Ort der Entzündung/Tumor rekrutieren (Hu, Chakravarty, & Ivashkiv, 2008).

IFN- γ weist sowohl anti-Tumor- als auch pro-Tumor-Aktivitäten auf (Abb. 4.7.3.1). In beiden Szenarien beeinflusst IFN- γ die Tumorzellen ebenso wie die Entwicklung, die Rekrutierung und/oder Aktivierung der Immunzellen. Die Anti-Tumor-Effekte führen zur direkten Hemmung des Tumorzellwachstums und zur Erkennung und Eliminierung durch die Immunzellen. Auf der anderen Seite zeigen sich die pro-Tumor-Funktionen von IFN- γ in Form von proliferativen und anti-apoptotischen Signalen und dem Entkommen der Tumorzellen vor der Erkennung und Zytolyse der zytotoxischen-T-Zellen ebenso wie den NK-Zellen. Welches der beiden Gesichter IFN- γ schließlich zeigt, hängt von der Tumorspezifität, der Tumormikroumgebung und der Signalstärke ab (Zaidi & Merlino, 2011). In der vorliegenden Dissertation wurde überprüft, inwieweit sich die Dosierung der Chemotherapeutika auf IFN- γ auswirkt. Betrachtet man die Ergebnisse der Zytokinkonzentration *im Serum* der tumortragenden Mäuse, fällt auf, dass die Werte unter der ULD Behandlung beider Chemotherapeutika am höchsten ausfiel, während die Werte der Kontrollen und anderen Behandlungsgruppen sehr niedrig waren. Beim Blick auf die IFN- γ -Werte in der

Tumormikroumgebung konnte unter der Behandlung mit Gemcitabin in allen Dosierungen eine geringere Konzentration IFN- γ im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden, wobei TD Gemcitabin den geringsten Wert aufwies. Unter der Behandlung mit 5 FU konnten unter TD der größte Wert und unter LD 5 FU der geringste Wert dokumentiert werden. Insgesamt scheint die metronomische Chemotherapie auf die Konzentration von IFN- γ eine reduzierende Wirkung in der Tumormikroumgebung zu haben. Im Serum hingegen konnten unter ULD die höchsten Konzentrationen nachgewiesen werden. Leider kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht weiter geschlussfolgert werden inwieweit IFN- γ bei den vorliegenden Experimenten eine pro- oder anti-Tumor-Wirkung hatte. Fest steht, dass die Anzahl der MDSC und Treg durch die metronomische Chemotherapie reduziert wurden, was beispielsweise einer pro-Tumor-Aktivität durch IFN- γ widerspricht. Ob nun die Anti-Tumor-Aktivität von IFN- γ oder die immunmodulatorischen Effekte der metronomischen Chemotherapie für das Tumolvolumen und die Anzahl der MDSC und Treg eine Rolle spielen, lässt sich in dieser Dissertation nicht final beantworten. Wahrscheinlich ist es ein Zusammenspiel der einzelnen Immunzellen, das für das Ergebnis verantwortlich ist. Trotzdem wäre es interessant, im Zusammenhang mit den zwei Gesichtern von IFN- γ , noch genauere Ergebnisse hinsichtlich der tatsächlichen Aktivität von IFN- γ zu bekommen. In der Vergangenheit konnte im Zusammenhang mit der Elimination von MDSC durch 5 FU eine bessere Anti-Tumor-Immunität durch die erhöhte IFN- γ Produktion durch die tumorspezifischen CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (Hao et al., 2014).

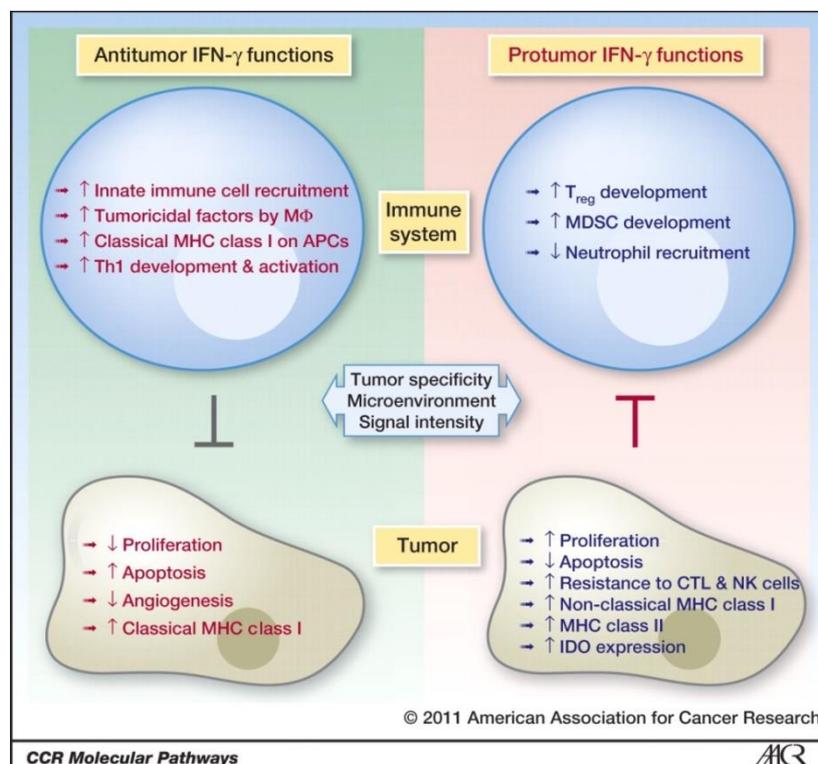


Abb. 4.7.3.1 Anti-Tumor- und Pro-Tumor-Aktivitäten von IFN- γ (Zaidi & Merlino, 2011).
Abdruck erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Rechteinhaber.

4.8 Zukunftsperspektiven der metronomischen Chemotherapie

Klinische und präklinische Studien haben bereits bewiesen, dass sich die metronomische Chemotherapie als neue Behandlungsstrategie gegen Krebs etabliert hat. Auch nach einem Jahrzehnt der klinischen Forschung stellt sich die Optimierung der metronomischen Chemotherapie immer noch als schwierige Aufgabe dar. Die zukünftige Forschung sollte sich vor allem darauf konzentrieren das *beste Medikament für die jeweilige Tumorart* zu bestimmen, die *optimale Dosierung* und die *genauen Zeitpunkte der Verabreichung* festzulegen und eventuelle *Kombinationen mit anderen Arzneimitteln* zu identifizieren. Die unterschiedlichen Immunmodulationen der jeweiligen Chemotherapeutika sollte bei der Wahl der Behandlung immer im Hinblick auf den Tumor und die Tumormikroumgebung und den damit verbundenen Voraussetzungen (z.B. Immunsuppression) ausgewählt werden. Neue Strategien wie beispielsweise die metronomische Chemotherapie mit der konventionellen Chemotherapie/Strahlentherapie und/oder gezielten Krebstherapie (targeted therapy) zu kombinieren, werden bereits in den Onkologischen Kliniken entwickelt und bieten viele potenzielle Kombinationsmöglichkeiten (Maiti, 2014).

5 Zusammenfassung

Das exokrine Pankreaskarzinom/Bauchspeicheldrüsenkrebs rangiert als Todesursache an vierter Stelle der Krebserkrankungen und ist für ca. 6-8% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Die Ursache liegt einerseits an dem meist fortgeschrittenen Stadium bei der Erstdiagnose und andererseits an der aggressiven Tumorbiologie mit einer frühen Metastasierung. Gegenwärtig erfolgt die konventionelle Chemotherapie mit den Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin mit der maximal tolerierten Dosis. Unglücklicherweise entwickeln Tumoren in den Behandlungspausen oft Resistenzen gegen die Chemotherapeutika und machen den nachfolgenden Behandlungszyklus somit unwirksam. Trotz erheblicher Fortschritte in der Krebsforschung und der positiven Wirkung von 5 FU/Gemcitabin, ist der Erfolg der Standardtherapie unzureichend und die mittlere Überlebenszeit relativ kurz. Auf Grund der tumorinduzierten Immunsuppression des Pankreaskarzinoms, stellt die metronomische Chemotherapie eine erfolgreiche Alternative zur konventionellen Chemotherapie dar. Im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie (TD), wird die metronomische Chemotherapie häufig und in niedrigen (LD)/sehr niedrigen Dosierungen (ULD) ohne längere Behandlungspausen verabreicht. Dadurch werden die zytotoxischen Nebenwirkungen minimiert und die Chemoresistenzentwicklung herabgesetzt. Die metronomische Chemotherapie richtet sich nicht nur gegen den Tumor selbst, sondern vor allem gegen die Wechselwirkung zwischen Tumor und dem umliegenden Gewebe, in dem durch entzündliche Reaktionen und Förderung der Angiogenese das Tumorstadium aufrechterhalten wird. In Anbetracht dieser Tatsachen wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin im Hinblick auf die immunmodulatorischen Eigenschaften in den unterschiedlichen Dosierungen im Panc02 murinen Modell des Pankreaskarzinoms durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die metronomische Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin die Anzahl der immunsuppressiven Zellpopulationen MDSC und Treg vor allem in der Tumormikroumgebung im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie deutlich herabsetzt und somit der tumorinduzierten Immunsuppression entgegen wirkt. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der MDSC und den Zytokinen IL-10, IL-6 und TGF- β nachgewiesen. Während unter der metronomischen Behandlung mit 5 FU in vivo in den Milzen und Tumoren jeweils viel weniger MDSC im Vergleich mit den Kontrollen und der konventionellen Chemotherapie mit 5 FU dokumentiert wurden, waren ebenso bedeutend weniger IL-10, IL-6 und TGF- β im Blut der Mäuse zu finden. Die konventionelle Chemotherapie wirkt sich oft negativ auf die Lymphozytenpopulation aus. Unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) konnten in vivo in den Milzen unter 5 FU und Gemcitabin viel mehr Lymphozyten, im Vergleich mit den Kontrollen und der konventionellen Chemotherapie, durchflusszytometrisch bestimmt werden. In

der Tumormikroumgebung konnten unter ULD 5 FU die meisten Lymphozyten dokumentiert werden. Darüber hinaus wurden, neben der deutlichen Reduzierung der Treg unter der metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin, die CD4⁺/CD8⁺-T-Zellpopulationen nicht beeinträchtigt. Im Gegenteil, größtenteils konnten sogar mehr Effektorzellen unter der metronomischen als unter der konventionellen Chemotherapie in den Milzen und der Tumormikroumgebung gefunden werden. Des Weiteren konnte die immunmodulierende Wirkung der metronomischen Chemotherapie auf die DZ, vor allem hinsichtlich der Reifung der DZ, bestätigt werden. In den Milzen der tumortragenden Mäuse konnte unter der metronomischen Behandlung (LD und ULD) mit 5 FU die höchste Anzahl cDZ belegt werden. Zudem war die Anzahl der reifen pDZ unter der metronomischen Chemotherapie (LD und ULD) 5 FU in den Milzen der tumortragenden Mäuse sehr hoch. In der Tumormikroumgebung konnten unter LD und ULD 5 FU deutlich weniger cDZ und reife cDZ im Vergleich zur metronomischen Behandlung mit Gemcitabin nachgewiesen werden. Die Anzahl der Reifungsmarker (CD80/CD86) der reifen cDZ waren unter ULD beider Chemotherapeutika jedoch sehr hoch. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind die jeweilige Dosierung (TD, LD oder ULD) und das jeweilige Chemotherapeutikum entscheidend für den gewünschten immunmodulierenden Effekt. Die positive Auswirkung der immunmodulierenden Wirkung der metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin spiegelt sich auch im Tumorvolumen wieder. Die geringste Tumorgöße konnte unter der Behandlung mit 5 FU und Gemcitabin mit der hoch dosierten, konventionellen Chemotherapie (TD) nachgewiesen werden. Jedoch konnte unter der Behandlung mit der sehr gering dosierten Chemotherapie (ULD) mit Gemcitabin, eine fast identische Tumorgöße wie unter TD Gemcitabin erzielt werden. Zwar war die Tumorgöße unter ULD 5 FU minimal größer als unter TD 5 FU Behandlung, aber trotzdem war auch dieses Ergebnis sehr gut. Damit konnte gezeigt werden, dass unter der metronomischen Behandlung mit ULD Gemcitabin und 5 FU vergleichbare Ergebnisse mit der hoch dosierten, konventionellen Chemotherapie in Bezug auf das Tumorvolumen erreicht werden. Die Metastasierungsrate nahm unter der Behandlung mit Chemotherapie ab. Sie entsprach unter metronomischer Chemotherapie (LD, ULD) der therapeutischen Dosierung (TD) und war unter ULD Gemcitabin sogar geringer. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich die metronomische Chemotherapie nicht nur positiv auf den Primärtumor, sondern auch auf die Metastasierungsrate auswirkt. Die metronomische Chemotherapie stellt eine erfolgreiche Behandlungsoption für die Krebspatienten dar, die auch über längere Zeiträume durchgeführt werden kann. Sie liefert neben minimaler Zytotoxizität und geringer Chemoresistenzentwicklung, vor allem durch die immunmodulatorischen Effekte von 5 FU und Gemcitabin in niedrigen/sehr niedrigen Konzentrationen, größtenteils bessere oder genauso gute Ergebnisse bezüglich des Tumorvolumens, der Metastasierungsrate und den relevanten Immunzellpopulationen als die maximal dosierte Chemotherapie und sollte daher weiter erforscht werden.

6 Summary

The exocrine pancreas carcinoma/pancreatic cancer ranks at the fourth place of the cancer illnesses and is responsible for approx. 6-8% of all cancer deaths. The diagnosis is often made in an advanced stage and the tumor is aggressive with early metastasis. Currently the conventional chemotherapy with the standard chemotherapy regime 5 FU and gemcitabine occurs with the maximum tolerated dose. Unfortunately, during treatment interruption, tumors often develop resistance to chemotherapeutic agents and make the following cycle ineffective. Despite of considerable progress in the cancer research and the positive effect of 5 FU and gemcitabine, the success of the standard therapy is insufficient and the mean survival time is relatively short. Due to the tumor-induced immunosuppression of pancreatic cancer, metronomic chemotherapy provides a viable alternative to conventional chemotherapy. In contrast to conventional chemotherapy (TD), metronomic chemotherapy is administered frequently and in low dose (LD)/very low dose (ULD) without prolonged treatment breaks. Thus, the cytotoxic side effects are minimized and the chemoresistance development is reduced. The metronomic chemotherapy is not only directed against the tumor itself, but especially against the interaction between tumors and surrounding tissue, where by inflammatory reactions and promotion of angiogenesis, tumor growth is maintained. Considering these facts, the effects of conventional and metronomic chemotherapy with 5 FU and gemcitabine, in view of the immunomodulatory properties in different doses, were studied in the present study by flow cytometry in the Panc02 murine model of pancreatic cancer. It could be demonstrated that metronomic chemotherapy with 5 FU and gemcitabine reduce the number of immunosuppressive Treg and MDSC cell populations, especially in the tumor microenvironment as compared to the conventional chemotherapy and thus counteracts the tumor-induced immunosuppression. In addition, a connection between the number of MDSC and the cytokines IL-10, IL-6 and TGF- β was detected. While under the metronomic treatment with 5 FU in vivo in the spleens and tumors less MDSC were documented, compared with the controls and the conventional chemotherapy with 5 FU, there were also significantly less IL-10, IL-6 and TGF- β found in the blood of the mice. Usually conventional chemotherapy has negative effects on the lymphocyte population. Under the metronomic chemotherapy (LD and ULD) were much more lymphocytes determined by flow cytometry in vivo in the spleens under 5 FU and gemcitabine compared with the controls and the conventional chemotherapy. In the tumor microenvironment most lymphocytes were documented under ULD 5 FU. In addition, the CD4⁺/CD8⁺-T-cell populations were not affected, beside the significant reduction of the Treg under the metronomic chemotherapy with 5 FU and gemcitabine. On the contrary, there could be found more effector cells under metronomic chemotherapy than under the conventional chemotherapy in the spleens and the tumor microenvironment.

Furthermore the immune-modulating effect of the metronomic chemotherapy on the DC could be confirmed, especially the maturation of the DC. In the spleens of the tumor-bearing mice the highest number cDC could be attested under the metronomic treatment (LD and ULD) with 5 FU. Besides, the number of mature pDC was very high under the metronomic chemotherapy (LD and ULD) with 5 FU in the spleens of the tumor-bearing mice. In the tumor microenvironment were significantly less cDC and mature cDC under the treatment of LD and ULD 5 FU compared to the metronomic treatment with gemcitabine. However, the number of maturation markers (CD80/CD86) of mature cDC was very high among both ULD chemotherapeutics. As the results show, the respective dose (TD, LD or ULD) and the respective chemotherapeutic agent is crucial for the desired immunomodulatory effect. The positive impact of the immunomodulatory effect of metronomic chemotherapy with 5 FU and gemcitabine is also reflected in the tumor volume. The smallest tumor size was demonstrated during treatment with 5 FU and gemcitabine with the high dose, conventional chemotherapy (TD). However, under treatment with very low dose chemotherapy (ULD) with gemcitabine, an almost identical tumor size, as with TD gemcitabine, was achieved. Although the tumor size under ULD 5 FU was minimally larger than under TD 5 FU, this result was also very good. Thus, it was demonstrated that under the metronomic treatment comparable results are achieved with the high-dose conventional chemotherapy in terms of tumor volume with ULD gemcitabine and 5 FU. The metastasis rate decreased under the treatment with chemotherapy and the results under therapeutic dose corresponded with the metronomic chemotherapy (LD, ULD) or even lower (ULD Gemcitabin). The present results clearly show that the metronomic chemotherapy has not only a positive effect on the primary tumor, but also to the rate of metastasis. The metronomic chemotherapy could be a successful option for the treatment of cancer patients and can be applied over longer periods of time. In addition to minimal cytotoxicity and low chemoresistance development, especially through the immunomodulatory effects of 5 FU and gemcitabine in low/very low concentrations, there are mostly better or equally good results in terms of tumor volume, metastasis rate and the relevant immune cell populations than under the treatment with the maximal tolerated dose and should therefore further be explored.

III. Literaturverzeichnis

- Adamek, H. E., Albert, J., Breer, H., Weitz, M., Schilling, D., & Riemann, J. F. (2000). Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *Lancet*, *356*(9225), 190-193. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02479-x
- Agnello, D., Lankford, C. S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J. J., & Frucht, D. M. (2003). Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol*, *23*(3), 147-161.
- Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., & Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*, *53*(10), 904-910. doi: 10.1007/s00262-004-0517-9
- Alizadeh, D., Trad, M., Hanke, N. T., Larmonier, C. B., Janikashvili, N., Bonnotte, B., . . . Larmonier, N. (2014). Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res*, *74*(1), 104-118. doi: 10.1158/0008-5472.can-13-1545
- Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N. R., Knight, S. C., . . . Gabrilovich, D. I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*, *166*(1), 678-689.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, *53*(4), 549-554.
- Andre, N., Padovani, L., & Verschuur, A. (2010). Metronomic chemotherapy: Back to the future! *Drug News Perspect*, *23*(2), 143-151. doi: 10.1358/dnp.2010.23.2.1475913
- Annels, N. E., Shaw, V. E., Gabitass, R. F., Billingham, L., Corrie, P., Eatock, M., . . . Middleton, G. (2014). The effects of gemcitabine and capecitabine combination chemotherapy and of low-dose adjuvant GM-CSF on the levels of myeloid-derived suppressor cells in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*, *63*(2), 175-183. doi: 10.1007/s00262-013-1502-y
- Aparicio-Pages, M. N., Verspaget, H. W., Pena, A. S., & Lamers, C. B. (1991). Natural killer cell activity in patients with adenocarcinoma in the upper gastrointestinal tract. *J Clin Lab Immunol*, *35*(1), 27-32.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, *190*(7), 995-1004.
- Azuma, E., Nagai, M., Qi, J., Umemoto, M., Hirayama, M., Kumamoto, T., . . . Sakurai, M. (1998). CD4+ T-Lymphocytopenia in long-term survivors following intensive chemotherapy in childhood cancers. *Medical and Pediatric Oncology*, *30*(1), 40-45. doi: 10.1002/(SICI)1096-911X(199801)30:1<40::AID-MPO11>3.0.CO;2-C
- Baguley, B. C. (2002). Novel strategies for overcoming multidrug resistance in cancer. *BioDrugs*, *16*(2), 97-103.
- Bayry, J., Tchilian, E. Z., Davies, M. N., Forbes, E. K., Draper, S. J., Kaveri, S. V., . . . Tough, D. F. (2008). In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(29), 10221-10226. doi: 10.1073/pnas.0803453105
- Beatty, G. L., Chiorean, E. G., Fishman, M. P., Saboury, B., Teitelbaum, U. R., Sun, W., . . . Vonderheide, R. H. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science*, *331*(6024), 1612-1616. doi: 10.1126/science.1198443
- Beger, H. G. (Ed.). (2013). *Erkrankungen des Pankreas : Evidenz in Diagnostik, Therapie und Langzeitverlauf ; mit 98 Tabellen*. Berlin ; Heidelberg: Springer Medizin.

- Bellone, G., Turletti, A., Artusio, E., Mareschi, K., Carbone, A., Tibaudi, D., . . . Rodeck, U. (1999). Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol*, *155*(2), 537-547.
- Belz, G. T., Carbone, F. R., & Heath, W. R. (2002). Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol*, *22*(5-6), 439-448.
- Berrington de Gonzalez, A., Sweetland, S., & Spencer, E. (2003). A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *89*(3), 519-523. doi: 10.1038/sj.bjc.6601140
- Bipat, S., Phoa, S. S., van Delden, O. M., Bossuyt, P. M., Gouma, D. J., Lameris, J. S., & Stoker, J. (2005). Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *J Comput Assist Tomogr*, *29*(4), 438-445.
- Bissell, M. J., & Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, *1*(1), 46-54. doi: 10.1038/35094059
- Bocci, G., Francia, G., Man, S., Lawler, J., & Kerbel, R. S. (2003). Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(22), 12917-12922. doi: 10.1073/pnas.2135406100
- Bocci, G., Nicolaou, K. C., & Kerbel, R. S. (2002). Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*, *62*(23), 6938-6943.
- Boeck, S., & Heinemann, V. (2008). Second-line therapy in gemcitabine-pretreated patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *26*(7), 1178-1179; author reply 1179. doi: 10.1200/jco.2007.15.3304
- Boggi, U., Del Chiaro, M., Croce, C., Vistoli, F., Signori, S., Moretto, C., . . . Mosca, F. (2009). Prognostic implications of tumor invasion or adhesion to peripancreatic vessels in resected pancreatic cancer. *Surgery*, *146*(5), 869-881. doi: 10.1016/j.surg.2009.04.029
- Bronte, V., Chappell, D. B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., & Restifo, N. P. (1999). Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol*, *162*(10), 5728-5737.
- Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., . . . Ghiringhelli, F. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med*, *19*(1), 57-64. doi: 10.1038/nm.2999
- Brunner, T. B. (2013). Neoadjuvant therapy for potentially resectable pancreatic cancer: an emerging paradigm? *Curr Oncol Rep*, *15*(2), 162-169. doi: 10.1007/s11912-012-0291-3
- Bruns, C. J., Shrader, M., Harbison, M. T., Portera, C., Solorzano, C. C., Jauch, K. W., . . . Ellis, L. M. (2002). Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Int J Cancer*, *102*(2), 101-108. doi: 10.1002/ijc.10681
- Büchler, M. W., Uhl, W., & Malfertheiner, P. (2004). *Pankreaserkrankungen : akute Pankreatitis, chronische Pankreatitis, Tumore des Pankreas ; 87 Tab (2., vollst. überarb. Auflage ed.)*. Basel ; Freiburg im Breisgau [u.a.]: Karger.
- Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., . . . Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, *15*(6), 2403-2413.
- Burton, J. H., Mitchell, L., Thamm, D. H., Dow, S. W., & Biller, B. J. (2011). Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma. *J Vet Intern Med*, *25*(4), 920-926. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.0753.x

- Campbell, D. J., & Koch, M. A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*, *11*(2), 119-130. doi: 10.1038/nri2916
- Cardillo, I., Spugnini, E. P., Galluzzo, P., Contestabile, M., Dell'Anna, M. L., Picardo, M., . . . Baldi, A. (2013). Functional and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide and docetaxel regimen in castration-resistant prostate cancer. *Future Oncol*, *9*(9), 1375-1388. doi: 10.2217/fon.13.99
- Cascinu, S., Falconi, M., Valentini, V., & Jelic, S. (2010). Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, *21 Suppl 5*, v55-58. doi: 10.1093/annonc/mdq165
- Cerullo, V., Diaconu, I., Kangasniemi, L., Rajecski, M., Escutenaire, S., Koski, A., . . . Hemminki, A. (2011). Immunological effects of low-dose cyclophosphamide in cancer patients treated with oncolytic adenovirus. *Mol Ther*, *19*(9), 1737-1746. doi: 10.1038/mt.2011.113
- Cham, K. K. Y., Baker, J. H. E., Takhar, K. S., Flexman, J. A., Wong, M. Q., Owen, D. A., . . . Ng, S. S. W. (2010). Metronomic gemcitabine suppresses tumour growth, improves perfusion, and reduces hypoxia in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*, *103*(1), 52-60. doi: 10.1038/sj.bjc.6605727
- Chari, S. T., Leibson, C. L., Rabe, K. G., Ransom, J., de Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Probability of Pancreatic Cancer Following Diabetes: A Population-Based Study. *Gastroenterology*, *129*(2), 504-511. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.007>
- Chen, G., & Emens, L. A. (2013). Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*, *62*(2), 203-216. doi: 10.1007/s00262-012-1388-0
- Clark, C. E., Beatty, G. L., & Vonderheide, R. H. (2009). Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Lett*, *279*(1), 1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2008.09.037
- Clark, C. E., Hingorani, S. R., Mick, R., Combs, C., Tuveson, D. A., & Vonderheide, R. H. (2007). Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*, *67*(19), 9518-9527. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-0175
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., . . . Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, *364*(19), 1817-1825. doi: 10.1056/NEJMoa1011923
- Cooper, C. L., O'Toole, S. A., & Kench, J. G. (2013). Classification, morphology and molecular pathology of premalignant lesions of the pancreas. *Pathology*, *45*(3), 286-304. doi: 10.1097/PAT.0b013e32835f2205
- Corbett, T. H., Roberts, B. J., Leopold, W. R., Peckham, J. C., Wilkoff, L. J., Griswold, D. P., Jr., & Schabel, F. M., Jr. (1984). Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res*, *44*(2), 717-726.
- Custodio, A., Puente, J., Sastre, J., & Diaz-Rubio, E. (2009). Second-line therapy for advanced pancreatic cancer: a review of the literature and future directions. *Cancer Treat Rev*, *35*(8), 676-684. doi: 10.1016/j.ctrv.2009.08.012
- Dallal, R. M., Christakos, P., Lee, K., Egawa, S., Son, Y. I., & Lotze, M. T. (2002). Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer. *Surgery*, *131*(2), 135-138.
- David, O., Green, L., Reddy, V., Kluskens, L., Bitterman, P., Attal, H., . . . Gattuso, P. (1998). Pancreatic masses: a multi-institutional study of 364 fine-needle aspiration biopsies with histopathologic correlation. *Diagn Cytopathol*, *19*(6), 423-427.
- De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., . . . Protti, M. P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*, *208*(3), 469-478. doi: 10.1084/jem.20101876
- Degrade, L., Nobili, C., Franciosi, C., Caprotti, R., Brivio, F., Romano, F., . . . Uggeri, F. (2009). Interleukin-2 immunotherapy action on innate immunity cells in peripheral blood and tumoral tissue of pancreatic adenocarcinoma patients. *Langenbecks Arch Surg*, *394*(1), 115-121. doi: 10.1007/s00423-008-0393-4

- Dellapasqua, S., Bertolini, F., Bagnardi, V., Campagnoli, E., Scarano, E., Torrisi, R., . . . Colleoni, M. (2008). Metronomic cyclophosphamide and capecitabine combined with bevacizumab in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*, *26*(30), 4899-4905. doi: 10.1200/jco.2008.17.4789
- Dewitt, J., Devereaux, B. M., Lehman, G. A., Sherman, S., & Imperiale, T. F. (2006). Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *4*(6), 717-725; quiz 664. doi: 10.1016/j.cgh.2006.02.020
- Di Paolo, N. C., Tuve, S., Ni, S., Hellstrom, K. E., Hellstrom, I., & Lieber, A. (2006). Effect of adenovirus-mediated heat shock protein expression and oncolysis in combination with low-dose cyclophosphamide treatment on antitumor immune responses. *Cancer Res*, *66*(2), 960-969. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2388
- Diener, M. K., Knaebel, H. P., Heukaufel, C., Antes, G., Buchler, M. W., & Seiler, C. M. (2007). A systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus classical pancreaticoduodenectomy for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Ann Surg*, *245*(2), 187-200. doi: 10.1097/01.sla.0000242711.74502.a9
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., . . . Yoshida, S. (2008). Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today*, *38*(11), 1021-1028. doi: 10.1007/s00595-007-3745-8
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991
- El-Gazzar, A., Groh, V., & Spies, T. (2013). Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol*, *191*(4), 1509-1515. doi: 10.4049/jimmunol.1301071
- Emmrich, J., Sparmann, G., Hopt, U., Lohr, M., & Liebe, S. (1999). Typing of leukocytes in pancreatic tissue surrounding human pancreatic carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, *880*, 171-174.
- Erkan, M., Adler, G., Apte, M. V., Bachem, M. G., Buchholz, M., Detlefsen, S., . . . Wilson, J. (2012). StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*, *61*(2), 172-178. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301220
- Erkan, M., Hausmann, S., Michalski, C. W., Fingerle, A. A., Dobritz, M., Kleeff, J., & Friess, H. (2012). The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *9*(8), 454-467. doi: 10.1038/nrgastro.2012.115
- Erkan, M., Kleeff, J., Gorbachevski, A., Reiser, C., Mitkus, T., Esposito, I., . . . Friess, H. (2007). Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology*, *132*(4), 1447-1464. doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.031
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Kong, B., Esposito, I., Friess, H., & Kleeff, J. (2012). The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med*, *12*(3), 288-303.
- Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res*, *72*(9), 2162-2171. doi: 10.1158/0008-5472.can-11-3687
- Ferrara, N. (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*, *55*, 15-35; discussion 35-16.
- Ferrari, S., Rovati, B., Porta, C., Alessandrino, P. E., Bertolini, A., Collova, E., . . . Danova, M. (2003). Lack of dendritic cell mobilization into the peripheral blood of cancer patients following standard- or high-dose chemotherapy plus granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Immunol Immunother*, *52*(6), 359-366. doi: 10.1007/s00262-002-0365-4
- Fietkau, R., Heinemann, V., Oettle, H., Knoefel, W. T., & Tannapfel, A. (2010). [New data on pancreatic cancer]. *Onkologie*, *33 Suppl 4*, 31-35. doi: 10.1159/000308453
- Fogar, P., Sperti, C., Basso, D., Sanzari, M. C., Greco, E., Davoli, C., . . . Plebani, M. (2006). Decreased total lymphocyte counts in pancreatic cancer: an index of adverse outcome. *Pancreas*, *32*(1), 22-28.

- Fukunaga, A., Miyamoto, M., Cho, Y., Murakami, S., Kawarada, Y., Oshikiri, T., . . . Katoh, H. (2004). CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, *28*(1), e26-31.
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, *9*(3), 162-174. doi: 10.1038/nri2506
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2012). The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, *11*(3), 215-233. doi: 10.1038/nrd3626
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., . . . Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, *56*(5), 641-648. doi: 10.1007/s00262-006-0225-8
- Gilboa, E. (1999). How tumors escape immune destruction and what we can do about it. *Cancer Immunol Immunother*, *48*(7), 382-385.
- Gille, J., Spieth, K., & Kaufmann, R. (2005). Metronomic low-dose chemotherapy as antiangiogenic therapeutic strategy for cancer. *J Dtsch Dermatol Ges*, *3*(1), 26-32.
- Glimelius, B., Hoffman, K., Sjoden, P. O., Jacobsson, G., Sellstrom, H., Enander, L. K., . . . Svensson, C. (1996). Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol*, *7*(6), 593-600.
- Go, V. L. W., Gukovskaya, A., & Pandol, S. J. (2005). Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol*, *35*(3), 205-211. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.03.010>
- Haeno, H., Gonen, M., Davis, M. B., Herman, J. M., Iacobuzio-Donahue, C. A., & Michor, F. (2012). Computational modeling of pancreatic cancer reveals kinetics of metastasis suggesting optimum treatment strategies. *Cell*, *148*(1-2), 362-375. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.060
- Hahnfeldt, P., Folkman, J., & Hlatky, L. (2003). Minimizing long-term tumor burden: the logic for metronomic chemotherapeutic dosing and its antiangiogenic basis. *J Theor Biol*, *220*(4), 545-554.
- Hamano, Y., Sugimoto, H., Soubasakos, M. A., Kieran, M., Olsen, B. R., Lawler, J., . . . Kalluri, R. (2004). Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res*, *64*(5), 1570-1574.
- Hao, Y. B., Yi, S. Y., Ruan, J., Zhao, L., & Nan, K. J. (2014). New insights into metronomic chemotherapy-induced immunoregulation. *Cancer Lett*, *354*(2), 220-226. doi: 10.1016/j.canlet.2014.08.028
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, *6*(11), 1123-1132. doi: 10.1038/ni1254
- Hayakawa, Y. (2012). Targeting NKG2D in tumor surveillance. *Expert Opin Ther Targets*, *16*(6), 587-599. doi: 10.1517/14728222.2012.681378
- Heinrich, S., Schafer, M., Weber, A., Hany, T. F., Bhure, U., Pestalozzi, B. C., & Clavien, P. A. (2008). Neoadjuvant chemotherapy generates a significant tumor response in resectable pancreatic cancer without increasing morbidity: results of a prospective phase II trial. *Ann Surg*, *248*(6), 1014-1022. doi: 10.1097/SLA.0b013e318190a6da
- Helm, O., Held-Feindt, J., Grage-Griebenow, E., Schäfer, H., & Sebens, S. (2012). Die Bedeutung von pro- und antiinflammatorischen Makrophagen in der Tumorigenese des duktaalen Pankreasadenokarzinoms. *Z Gastroenterol*, *50*(8), V16.
- Hervieu, A., Rebe, C., Vegran, F., Chalmin, F., Bruchard, M., Vabres, P., . . . Mignot, G. (2013). Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. *J Invest Dermatol*, *133*(2), 499-508. doi: 10.1038/jid.2012.273
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med*, *362*(17), 1605-1617. doi: 10.1056/NEJMra0901557

- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., & Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*, *12*(18), 5423-5434. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-06-0369
- Hishinuma, S., Ogata, Y., Tomikawa, M., Ozawa, I., Hirabayashi, K., & Igarashi, S. (2006). Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg*, *10*(4), 511-518. doi: 10.1016/j.gassur.2005.09.016
- Hu, X., Chakravarty, S. D., & Ivashkiv, L. B. (2008). Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev*, *226*, 41-56. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00707.x
- Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., . . . Chen, S. H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*, *66*(2), 1123-1131. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-1299
- Humeniuk, R., Mishra, P. J., Bertino, J. R., & Banerjee, D. (2009). Epigenetic reversal of acquired resistance to 5-fluorouracil treatment. *Mol Cancer Ther*, *8*(5), 1045-1054. doi: 10.1158/1535-7163.mct-08-0717
- Husain, Z., Huang, Y., Seth, P., & Sukhatme, V. P. (2013). Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol*, *191*(3), 1486-1495. doi: 10.4049/jimmunol.1202702
- Ikemoto, T., Yamaguchi, T., Morine, Y., Imura, S., Soejima, Y., Fujii, M., . . . Shimada, M. (2006). Clinical roles of increased populations of Foxp3+CD4+ T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas*, *33*(4), 386-390. doi: 10.1097/01.mpa.0000240275.68279.13
- Inman, K. S., Francis, A. A., & Murray, N. R. (2014). Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, *20*(32), 11160-11181. doi: 10.3748/wjg.v20.i32.11160
- Itakura, J., Ishiwata, T., Shen, B., Kornmann, M., & Korc, M. (2000). Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, *85*(1), 27-34. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000101)85:1<27::AID-IJC5>3.0.CO;2-8
- Izzedine, H., Rixe, O., Billefont, B., Baumelou, A., & Deray, G. Angiogenesis Inhibitor Therapies: Focus on Kidney Toxicity and Hypertension. *American Journal of Kidney Diseases*, *50*(2), 203-218. doi: 10.1053/j.ajkd.2007.04.025
- Jabbour, E., Issa, J.-P., Garcia-Manero, G., & Kantarjian, H. (2008). Evolution of decitabine development. *Cancer*, *112*(11), 2341-2351. doi: 10.1002/cncr.23463
- Jang, J.-H., Cotterchio, M., Borgida, A., Gallinger, S., & Cleary, S. P. (2012). Genetic variants in carcinogen-metabolizing enzymes, cigarette smoking and pancreatic cancer risk. *Carcinogenesis*, *33*(4), 818-827. doi: 10.1093/carcin/bgs028
- Javid, B., MacAry, P. A., & Lehner, P. J. (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol*, *179*(4), 2035-2040.
- Jiao, L., Silverman, D. T., Schairer, C., Thiebaut, A. C., Hollenbeck, A. R., Leitzmann, M. F., . . . Stolzenberg-Solomon, R. Z. (2009). Alcohol use and risk of pancreatic cancer: the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol*, *169*(9), 1043-1051. doi: 10.1093/aje/kwp034
- Jiga, L. P., Bauer, T. M., Chuang, J. J., Opelz, G., & Terness, P. (2004). Generation of tolerogenic dendritic cells by treatment with mitomycin C: inhibition of allogeneic T-cell response is mediated by downregulation of ICAM-1, CD80, and CD86. *Transplantation*, *77*(11), 1761-1764.
- Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M., & Harding, C. V. (1999). Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol*, *163*(8), 4224-4231.

- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, *30*, 531-564. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
- Kamen, B. A. (2005). Metronomic therapy: it makes sense and is patient friendly. *J Pediatr Hematol Oncol*, *27*(11), 571-572.
- Kan, S., Hazama, S., Maeda, K., Inoue, Y., Homma, S., Koido, S., . . . Oka, M. (2012). Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction in vitro. *Anticancer Res*, *32*(12), 5363-5369.
- Kaneno, R., Shurin, G., Kaneno, F., Naiditch, H., Luo, J., & Shurin, M. (2011). Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cellular Oncology*, *34*(2), 97-106. doi: 10.1007/s13402-010-0005-5
- Kaneno, R., Shurin, G. V., Tourkova, I. L., & Shurin, M. R. (2009). Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med*, *7*, 58. doi: 10.1186/1479-5876-7-58
- Kang, T. H., Mao, C. P., Lee, S. Y., Chen, A., Lee, J. H., Kim, T. W., . . . Wu, T. C. (2013). Chemotherapy acts as an adjuvant to convert the tumor microenvironment into a highly permissive state for vaccination-induced antitumor immunity. *Cancer Res*, *73*(8), 2493-2504. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-4241
- Karayiannakis, A. J., Bolanaki, H., Syrigos, K. N., Asimakopoulos, B., Polychronidis, A., Anagnostoulis, S., & Simopoulos, C. (2003). Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett*, *194*(1), 119-124.
- Kareva, I., Waxman, D. J., & Klement, G. L. (2015). Metronomic chemotherapy: an attractive alternative to maximum tolerated dose therapy that can activate anti-tumor immunity and minimize therapeutic resistance. *Cancer Lett*, *358*(2), 100-106. doi: 10.1016/j.canlet.2014.12.039
- Kerbel, R. S., & Kamen, B. A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, *4*(6), 423-436. doi: 10.1038/nrc1369
- Kersten, K., Salvagno, C., & de Visser, K. E. (2015). Exploiting the Immunomodulatory Properties of Chemotherapeutic Drugs to Improve the Success of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, *6*, 516. doi: 10.3389/fimmu.2015.00516
- Khong, H. T., & Restifo, N. P. (2002). Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, *3*(11), 999-1005. doi: 10.1038/ni1102-999
- Kirchleitner, S. V., Schrom, E., Endres, S., Düwell, P., & Schnurr, M. (2014). Die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms mit Liganden von RIG-I-like Helikasen induziert eine funktionelle Umprogrammierung von myeloiden Suppressor-Zellen mit reduzierter Immunsuppression. *Z Gastroenterol*, *52*(08), KG162. doi: 10.1055/s-0034-1386184
- Klautke, G., & Brunner, T. B. (2008). Radiotherapy in pancreatic cancer
- Die Rolle der Strahlentherapie bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]*, *184*(11), 557-564.
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D. J., . . . Kerbel, R. S. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*, *105*(8), R15-24. doi: 10.1172/jci8829
- Kodumudi, K. N., Woan, K., Gilvary, D. L., Sahakian, E., Wei, S., & Djeu, J. Y. (2010). A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res*, *16*(18), 4583-4594. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-0733
- Koido, S., Homma, S., Hara, E., Namiki, Y., Takahara, A., Komita, H., . . . Tajiri, H. (2010). Regulation of Tumor Immunity by Tumor/Dendritic Cell Fusions. *Clin Dev Immunol*, *2010*. doi: 10.1155/2010/516768

- Koido, S., Homma, S., Takahara, A., Namiki, Y., Tsukinaga, S., Mitobe, J., . . . Tajiri, H. (2011). Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. *Clin Dev Immunol*, 2011, 267539. doi: 10.1155/2011/267539
- Korc, M. (2007). Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg*, 194(4 Suppl), S84-86. doi: 10.1016/j.amjsurg.2007.05.004
- Koumariou, A., Christodoulou, M.-I., Patapis, P., Papadopoulos, I., Liakata, E., Giagini, A., . . . Pappa, V. (2014). The effect of metronomic versus standard chemotherapy on the regulatory to effector T-cell equilibrium in cancer patients. *Experimental Hematology & Oncology*, 3, 3-3. doi: 10.1186/2162-3619-3-3
- Kurahara, H., Shinchi, H., Mataka, Y., Maemura, K., Noma, H., Kubo, F., . . . Takao, S. (2011). Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*, 167(2), e211-219. doi: 10.1016/j.jss.2009.05.026
- Kuwahara, K., Sasaki, T., Kuwada, Y., Murakami, M., Yamasaki, S., & Chayama, K. (2003). Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas*, 26(4), 344-349.
- Landreneau, J. P., Shurin, M. R., Agassandian, M. V., Keskinov, A. A., Ma, Y., & Shurin, G. V. (2015). Immunological Mechanisms of Low and Ultra-Low Dose Cancer Chemotherapy. *Cancer Microenvironment*, 8(2), 57-64. doi: 10.1007/s12307-013-0141-3
- Larsson, S. C., Permert, J., Hakansson, N., Naslund, I., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2005). Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer*, 93(11), 1310-1315. doi: 10.1038/sj.bjc.6602868
- Lennernäs, B. O., Albertsson, P. E. R., Damber, J.-E., & Norrby, K. (2004). Antiangiogenic effect of metronomic paclitaxel treatment in prostate cancer and non-tumor tissue in the same animals: a quantitative study. *APMIS*, 112(3), 201-209. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120306.x
- Li, D., Morris, J. S., Liu, J., Hassan, M. M., Day, R. S., Bondy, M. L., & Abbruzzese, J. L. (2009). Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *Jama*, 301(24), 2553-2562. doi: 10.1001/jama.2009.886
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., & Abbruzzese, J. L. (2004). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 363(9414), 1049-1057.
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., & Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, 182(1), 240-249.
- Lim, K. H., Chung, E., Khan, A., Cao, D., Linehan, D., Ben-Josef, E., & Wang-Gillam, A. (2012). Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *Oncologist*, 17(2), 192-200. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0268
- Lin, P. W., Shan, Y. S., Lin, Y. J., & Hung, C. J. (2005). Pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer: PPPD versus Whipple procedure. *Hepatogastroenterology*, 52(65), 1601-1604.
- Liyanage, U. K., Goedegebuure, P. S., Moore, T. T., Viehl, C. T., Moo-Young, T. A., Larson, J. W., . . . Linehan, D. C. (2006). Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother*, 29(4), 416-424. doi: 10.1097/01.cji.0000205644.43735.4e
- Lohr, M., Schmidt, C., Ringel, J., Kluth, M., Muller, P., Nizze, H., & Jesnowski, R. (2001). Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 61(2), 550-555.
- Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 205(2), 275-292. doi: 10.1002/path.1706
- Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2006). Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 20(2), 197-209. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2005.10.001>

- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R. W., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., . . . Domellof, L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med*, *328*(20), 1433-1437. doi: 10.1056/nejm199305203282001
- Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2011). The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer. *Curr Opin Immunol*, *23*(1), 146-152. doi: 10.1016/j.coi.2010.09.008
- Mackall, C. L., Fleisher, T. A., Brown, M. R., Andrich, M. P., Chen, C. C., Feuerstein, I. M., . . . Gress, R. E. (1997). Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood*, *89*(10), 3700-3707.
- Maiti, R. (2014). Metronomic chemotherapy. *J Pharmacol Pharmacother*, *5*(3), 186-192. doi: 10.4103/0976-500x.136098
- Mannell, A., van Heerden, J. A., Weiland, L. H., & Ilstrup, D. M. (1986). Factors influencing survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Surg*, *203*(4), 403-407.
- Mantovani, A., Ming, W. J., Balotta, C., Abdeljalil, B., & Bottazzi, B. (1986). Origin and regulation of tumor-associated macrophages: the role of tumor-derived chemotactic factor. *Biochim Biophys Acta*, *865*(1), 59-67.
- Masood, R., Cai, J., Zheng, T., Smith, D. L., Hinton, D. R., & Gill, P. S. (2001). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood*, *98*(6), 1904-1913.
- McConnell, J. R., & McAlpine, S. R. (2013). Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorg Med Chem Lett*, *23*(7), 1923-1928. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.02.014
- McNulty, S., Colaco, C. A., Blandford, L. E., Bailey, C. R., Baschieri, S., & Todryk, S. (2013). Heat-shock proteins as dendritic cell-targeting vaccines--getting warmer. *Immunology*, *139*(4), 407-415. doi: 10.1111/imm.12104
- McWilliams, R. R., Rabe, K. G., Olsword, C., De Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, *104*(2), 388-394. doi: 10.1002/cncr.21166
- Melani, C., Chiodoni, C., Forni, G., & Colombo, M. P. (2003). Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood*, *102*(6), 2138-2145. doi: 10.1182/blood-2003-01-0190
- Menard, C., Martin, F., Apetoh, L., Bouyer, F., & Ghiringhelli, F. (2008). Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother*, *57*(11), 1579-1587. doi: 10.1007/s00262-008-0505-6
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol*, *31*. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., . . . Kroemer, G. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, *334*(6062), 1573-1577. doi: 10.1126/science.1208347
- Michels, T., Shurin, G. V., Naiditch, H., Sevko, A., Umansky, V., & Shurin, M. R. (2012). Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. *Journal of Immunotoxicology*, *9*(3), 292-300. doi: doi:10.3109/1547691X.2011.642418
- Moo-Young, T. A., Larson, J. W., Belt, B. A., Tan, M. C., Hawkins, W. G., Eberlein, T. J., . . . Linehan, D. C. (2009). Tumor-derived TGF-beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother*, *32*(1), 12-21. doi: 10.1097/CJI.0b013e318189f13c
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., . . . Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, *25*(15), 1960-1966. doi: 10.1200/jco.2006.07.9525

- Moss, A. C., Morris, E., & Mac Mathuna, P. (2006). Palliative biliary stents for obstructing pancreatic carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*(2), Cd004200. doi: 10.1002/14651858.CD004200.pub4
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8(8), 618-631. doi: 10.1038/nrc2444
- Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M., & Ehrenstein, M. (2009). *Janeway - Immunologie* (C. Janeway Ed. 7. Aufl. ed.). Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181-1188. doi: 10.1093/carcin/bgt111
- Nakashima, H., Tasaki, A., Kubo, M., Kuroki, H., Matsumoto, K., Tanaka, M., . . . Katano, M. (2005). Effects of docetaxel on antigen presentation-related functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 55(5), 479-487. doi: 10.1007/s00280-004-0918-7
- Nars, M. S., & Kaneno, R. (2013). Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy. *Int J Cancer*, 132(11), 2471-2478. doi: 10.1002/ijc.27801
- Nausch, N., & Cerwenka, A. (2008). NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene*, 27(45), 5944-5958. doi: 10.1038/onc.2008.272
- Neesse, A., Michl, P., Frese, K. K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M. A., . . . Tuveson, D. A. (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 60(6), 861-868. doi: 10.1136/gut.2010.226092
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., . . . Buchler, M. W. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *Jama*, 304(10), 1073-1081. doi: 10.1001/jama.2010.1275
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J. A., Hickey, H., . . . Buchler, M. W. (2004). A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med*, 350(12), 1200-1210. doi: 10.1056/NEJMoa032295
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J. A., Hickey, H., . . . Buchler, M. W. (2004). A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*, 350(12), 1200-1210.
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Tudur Smith, C., Bassi, C., Ghaneh, P., Owen, E., . . . Buchler, M. W. (2009). Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials. *Br J Cancer*, 100(2), 246-250.
- Ni Fhlathartaigh, M., McMahon, J., Reynolds, R., Connolly, D., Higgins, E., Counihan, T., & Fitzgerald, U. (2013). Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta Neuropathol Commun*, 1, 37. doi: 10.1186/2051-5960-1-37
- Noronha, V., Patil, V., Bhosale, B., Joshi, A., Purandare, N., & Prabhash, K. (2013). Metronomic weekly paclitaxel in advanced unresectable esophageal cancer. *Indian J Cancer*, 50(2), 128-134. doi: 10.4103/0019-509x.117020
- Nowak, A. K., Lake, R. A., & Robinson, B. W. (2006). Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines? *Adv Drug Deliv Rev*, 58(8), 975-990. doi: 10.1016/j.addr.2006.04.002
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., . . . Riess, H. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *Jama*, 310(14), 1473-1481. doi: 10.1001/jama.2013.279201
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., . . . Riess, H. (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*, 297(3), 267-277. doi: 10.1001/jama.297.3.267

- Ohta, T., Elnemr, A., Kitagawa, H., Kayahara, M., Takamura, H., Fujimura, T., . . . Miwa, K. (2004). Fas ligand expression in human pancreatic cancer. *Oncol Rep*, *12*(4), 749-754.
- Ortiz, M. L., Lu, L., Ramachandran, I., & Gabilovich, D. I. (2014). Myeloid-derived suppressor cells in the development of lung cancer. *Cancer Immunol Res*, *2*(1), 50-58. doi: 10.1158/2326-6066.cir-13-0129
- Pampena Mí, B., & Levy, E. M. (2015). Natural Killer Cells as Helper Cells in Dendritic Cell Cancer Vaccines. *Front Immunol*, *6*. doi: 10.3389/fimmu.2015.00013
- Pandol, S. J., Apte, M. V., Wilson, J. S., Gukovskaya, A. S., & Edderkaoui, M. (2012). The burning question: why is smoking a risk factor for pancreatic cancer? *Pancreatology*, *12*(4), 344-349. doi: 10.1016/j.pan.2012.06.002
- Patel, A. V., Rodriguez, C., Bernstein, L., Chao, A., Thun, M. J., & Calle, E. E. (2005). Obesity, recreational physical activity, and risk of pancreatic cancer in a large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *14*(2), 459-466. doi: 10.1158/1055-9965.epi-04-0583
- Perussia, B. (1991). Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol*, *3*(1), 49-55.
- Pinho, A. V., Chantrill, L., & Rooman, I. (2014). Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett*, *345*(2), 203-209. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.015
- Pinzon-Charry, A., Schmidt, C. W., & Lopez, J. A. (2006). The key role of CD40 ligand in overcoming tumor-induced dendritic cell dysfunction. *Breast Cancer Res*, *8*(1), 402. doi: 10.1186/bcr1386
- Pirtskhalaishvili, G., Shurin, G. V., Esche, C., Cai, Q., Salup, R. R., Bykovskaia, S. N., . . . Shurin, M. R. (2000). Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br J Cancer*, *83*(4), 506-513. doi: 10.1054/bjoc.2000.1289
- Pschyrembel, W., & Bach, M. (Eds.). (2010). *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2011* (262., neu bearb. und erw. Aufl. ed.). Berlin [u.a.]: de Gruyter.
- Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P., & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *24*(3), 349-358. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2010.02.007>
- Regine, W. F., Winter, K. A., Abrams, R., Safran, H., Hoffman, J. P., Konski, A., . . . Willett, C. G. (2011). Fluorouracil-based chemoradiation with either gemcitabine or fluorouracil chemotherapy after resection of pancreatic adenocarcinoma: 5-year analysis of the U.S. Intergroup/RTOG 9704 phase III trial. *Ann Surg Oncol*, *18*(5), 1319-1326. doi: 10.1245/s10434-011-1630-6
- Rettig, L., Seidenberg, S., Parvanova, I., Samaras, P., Curioni, A., Knuth, A., & Pascolo, S. (2011). Gemcitabine depletes regulatory T-cells in human and mice and enhances triggering of vaccine-specific cytotoxic T-cells. *Int J Cancer*, *129*(4), 832-838. doi: 10.1002/ijc.25756
- Rico, M. J., Perroud, H. A., Mainetti, L. E., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2014). Comparative effectiveness of two metronomic chemotherapy schedules-our experience in the preclinical field. *Cancer Invest*, *32*(3), 92-98. doi: 10.3109/07357907.2013.877480
- Rodriguez-Viciano, P., Tetsu, O., Oda, K., Okada, J., Rauen, K., & McCormick, F. (2005). Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *70*, 461-467. doi: 10.1101/sqb.2005.70.044
- Rodriguez, P. C., Hernandez, C. P., Quiceno, D., Dubinett, S. M., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., . . . Ochoa, A. C. (2005). Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med*, *202*(7), 931-939. doi: 10.1084/jem.20050715
- Romagnuolo, J., Bardou, M., Rahme, E., Joseph, L., Reinhold, C., & Barkun, A. N. (2003). Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med*, *139*(7), 547-557.
- Salem, M. L., El-Naggar, S. A., & Cole, D. J. (2010). Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells in vitro capable of functional antigen presentation to T cells in vivo. *Cell Immunol*, *261*(2), 134-143. doi: 10.1016/j.cellimm.2009.11.011

- Sarmiento, R., & Gasparini, G. (2008). Antiangiogenic metronomic chemotherapy. *Onkologie*, *31*(4), 161-162. doi: 10.1159/000119925
- Sasson, A. R., Hoffman, J. P., Ross, E. A., Kagan, S. A., Pingpank, J. F., & Eisenberg, B. L. (2002). En bloc resection for locally advanced cancer of the pancreas: is it worthwhile? *J Gastrointest Surg*, *6*(2), 147-157; discussion 157-148.
- Sawant, A., Schafer, C. C., Jin, T. H., Zmijewski, J., Tse, H. M., Roth, J., . . . Deshane, J. S. (2013). Enhancement of antitumor immunity in lung cancer by targeting myeloid-derived suppressor cell pathways. *Cancer Res*, *73*(22), 6609-6620. doi: 10.1158/0008-5472.can-13-0987
- Schachter, P. P., Avni, Y., Shimonov, M., Gvirtz, G., Rosen, A., & Czerniak, A. (2000). The impact of laparoscopy and laparoscopic ultrasonography on the management of pancreatic cancer. *Arch Surg*, *135*(11), 1303-1307.
- Scharovsky, O. G., Mainetti, L. E., & Rozados, V. R. (2009). Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol*, *16*(2), 7-15.
- Schlom, J., Arlen, P. M., & Gulley, J. L. (2007). Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clin Cancer Res*, *13*(13), 3776-3782. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-07-0588
- Schniewind, B., Groth, S., Sebens Muerkoster, S., Sipos, B., Schafer, H., Kalthoff, H., . . . Ungefroren, H. (2007). Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function. *Oncogene*, *26*(33), 4850-4862. doi: 10.1038/sj.onc.1210272
- Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., . . . Herman, J. G. (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*, *57*(15), 3126-3130.
- Schutte, M., Hruban, R. H., Hedrick, L., Cho, K. R., Nadasdy, G. M., Weinstein, C. L., . . . Kern, S. E. (1996). DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res*, *56*(11), 2527-2530.
- Seliger, B., Ruiz-Cabello, F., & Garrido, F. (2008). IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res*, *101*, 249-276. doi: 10.1016/s0065-230x(08)00407-7
- Serafini, P., Borrello, I., & Bronte, V. (2006). Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol*, *16*(1), 53-65. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.07.005
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., . . . Borrello, I. (2006). Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*, *203*(12), 2691-2702. doi: 10.1084/jem.20061104
- Seufferlein, T., Porzner, M., Becker, T., Budach, V., Ceyhan, G., Esposito, I., . . . Yekebas, E. (2013). [S3-guideline exocrine pancreatic cancer]. *Z Gastroenterol*, *51*(12), 1395-1440. doi: 10.1055/s-0033-1356220
- Sevko, A., Kremer, V., Falk, C., Umansky, L., Shurin, M. R., Shurin, G. V., & Umansky, V. (2012). Application of paclitaxel in low non-cytotoxic doses supports vaccination with melanoma antigens in normal mice. *Journal of Immunotoxicology*, *9*(3), 275-281. doi: doi:10.3109/1547691X.2012.655343
- Sevko, A., Michels, T., Vrohings, M., Umansky, L., Beckhove, P., Kato, M., . . . Umansky, V. (2013). Antitumor effect of paclitaxel is mediated by inhibition of myeloid-derived suppressor cells and chronic inflammation in the spontaneous melanoma model. *J Immunol*, *190*(5), 2464-2471. doi: 10.4049/jimmunol.1202781
- Sevko, A., Sade-Feldman, M., Kanterman, J., Michels, T., Falk, C. S., Umansky, L., . . . Umansky, V. (2013). Cyclophosphamide promotes chronic inflammation-dependent immunosuppression and prevents antitumor response in melanoma. *J Invest Dermatol*, *133*(6), 1610-1619. doi: 10.1038/jid.2012.444
- Sheng Sow, H., & Mattarollo, S. R. (2013). Combining low-dose or metronomic chemotherapy with anticancer vaccines: A therapeutic opportunity for lymphomas. *Oncoimmunology*, *2*(12), e27058. doi: 10.4161/onci.27058

- Shevchenko, I., Karakhanova, S., Soltek, S., Link, J., Bayry, J., Werner, J., . . . Bazhin, A. V. (2013). Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, *133*(1), 98-107. doi: 10.1002/ijc.27990
- Shi, H., Jiang, J., Ji, J., Shi, M., Cai, Q., Chen, X., . . . Zhang, J. (2014). Anti-angiogenesis participates in antitumor effects of metronomic capecitabine on colon cancer. *Cancer Lett*, *349*(2), 128-135. doi: 10.1016/j.canlet.2014.04.002
- Shih, T., & Lindley, C. (2006). Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther*, *28*(11), 1779-1802. doi: 10.1016/j.clinthera.2006.11.015
- Shurin, G. V., Tourkova, I. L., Kaneno, R., & Shurin, M. R. (2009). Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol*, *183*(1), 137-144. doi: 10.4049/jimmunol.0900734
- Shurin, G. V., Tourkova, I. L., & Shurin, M. R. (2008). Low-dose chemotherapeutic agents regulate small Rho GTPase activity in dendritic cells. *J Immunother*, *31*(5), 491-499. doi: 10.1097/CJI.0b013e318176fae4
- Shurin, M. R. (2013). Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. *Nat Med*, *19*(1), 20-22. doi: 10.1038/nm.3045
- Shurin, M. R. (2013). Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. *Nat Med*, *19*(1), 20-22. doi: 10.1038/nm.3045
- Shurin, M. R., Naiditch, H., Gutkin, D. W., Umansky, V., & Shurin, G. V. (2012). ChemolmmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. *Curr Med Chem*, *19*(12), 1792-1803.
- Shurin, M. R., Yurkovetsky, Z. R., Tourkova, I. L., Balkir, L., & Shurin, G. V. (2002). Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *International Journal of Cancer*, *101*(1), 61-68. doi: 10.1002/ijc.10576
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., . . . Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*, *18*(5), 349-355. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.004
- Sideras, K., Braat, H., Kwekkeboom, J., van Eijck, C. H., Peppelenbosch, M. P., Sleijfer, S., & Bruno, M. (2014). Role of the immune system in pancreatic cancer progression and immune modulating treatment strategies. *Cancer Treat Rev*, *40*(4), 513-522. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.11.005
- Singh, M., & Maitra, A. (2007). Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications. *Pancreatology*, *7*(1), 9-19. doi: 10.1159/000101873
- Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M., & Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, *179*(2), 977-983.
- Sipos, B., Weber, D., Ungefroren, H., Kalthoff, H., Zuhlsdorff, A., Luther, C., . . . Kloppel, G. (2002). Vascular endothelial growth factor mediated angiogenic potential of pancreatic ductal carcinomas enhanced by hypoxia: an in vitro and in vivo study. *Int J Cancer*, *102*(6), 592-600. doi: 10.1002/ijc.10753
- Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., & Zitvogel, L. (2011). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol*, *33*(4), 369-383. doi: 10.1007/s00281-011-0245-0
- Solomayer, E.-F., Feuerer, M., Bai, L., Umansky, V., Beckhove, P., Meyberg, G. C., . . . Diel, I. J. (2003). Influence of Adjuvant Hormone Therapy and Chemotherapy on the Immune System Analysed in the Bone Marrow of Patients with Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, *9*(1), 174-180.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, *9*, 271-296. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
- Stocken, D. D., Buchler, M. W., Dervenis, C., Bassi, C., Jeekel, H., Klinkenbijn, J. H., . . . Neoptolemos, J. P. (2005). Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *92*(8), 1372-1381. doi: 10.1038/sj.bjc.6602513

- Stojanovic, A., Correia, M. P., & Cerwenka, A. (2013). Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*, *6*(2), 135-146. doi: 10.1007/s12307-012-0125-8
- Strausberg, R. L. (2005). Tumor microenvironments, the immune system and cancer survival. *Genome Biol*, *6*(3), 211. doi: 10.1186/gb-2005-6-3-211
- Sultana, A., Smith, C. T., Cunningham, D., Starling, N., Neoptolemos, J. P., & Ghaneh, P. (2007). Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *25*(18), 2607-2615. doi: 10.1200/jco.2006.09.2551
- Sumida, K., Wakita, D., Narita, Y., Masuko, K., Terada, S., Watanabe, K., . . . Nishimura, T. (2012). Anti-IL-6 receptor mAb eliminates myeloid-derived suppressor cells and inhibits tumor growth by enhancing T-cell responses. *Eur J Immunol*, *42*(8), 2060-2072. doi: 10.1002/eji.201142335
- Sutlu, T., & Alici, E. (2009). Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*, *266*(2), 154-181. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02121.x
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R., & Albelda, S. M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*, *11*(18), 6713-6721. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-05-0883
- Tagliamonte, M., Petrizzo, A., Napolitano, M., Luciano, A., Rea, D., Barbieri, A., . . . Buonaguro, L. (2016). A novel multi-drug metronomic chemotherapy significantly delays tumor growth in mice. *Journal of Translational Medicine*, *14*, 58. doi: 10.1186/s12967-016-0812-1
- Talamini, R., Polesel, J., Gallus, S., Dal Maso, L., Zucchetto, A., Negri, E., . . . La Vecchia, C. (2010). Tobacco smoking, alcohol consumption and pancreatic cancer risk: A case-control study in Italy. *European Journal of Cancer*, *46*(2), 370-376. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.09.002>
- Talmadge, J. E., & Gabrilovich, D. I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*, *13*(10), 739-752. doi: 10.1038/nrc3581
- Tan, M. C., Goedegebuure, P. S., Belt, B. A., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W. E., . . . Linehan, D. C. (2009). Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol*, *182*(3), 1746-1755.
- Tanaka, F., Yamaguchi, H., Ohta, M., Mashino, K., Sonoda, H., Sadanaga, N., . . . Mori, M. (2002). Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo. *Int J Cancer*, *101*(3), 265-269. doi: 10.1002/ijc.10597
- Tanaka, H., Matsushima, H., Mizumoto, N., & Takashima, A. (2009). Classification of chemotherapeutic agents based on their differential in vitro effects on dendritic cells. *Cancer Res*, *69*(17), 6978-6986. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-1101
- Tassi, E., Gavazzi, F., Albarello, L., Senyukov, V., Longhi, R., Dellabona, P., . . . Protti, M. P. (2008). Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J Immunol*, *181*(9), 6595-6603.
- Tersmette, A. C., Petersen, G. M., Offerhaus, G. J., Falatko, F. C., Brune, K. A., Goggins, M., . . . Hruban, R. H. (2001). Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *7*(3), 738-744.
- Tjomsland, V., Sandstrom, P., Spangeus, A., Messmer, D., Emilsson, J., Falkmer, U., . . . Larsson, M. (2010). Pancreatic adenocarcinoma exerts systemic effects on the peripheral blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells: an indicator of disease severity? *BMC Cancer*, *10*, 87. doi: 10.1186/1471-2407-10-87
- Tjomsland, V., Spangeus, A., Sandstrom, P., Borch, K., Messmer, D., & Larsson, M. (2010). Semi mature blood dendritic cells exist in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma owing to inflammatory factors released from the tumor. *PLoS One*, *5*(10), e13441. doi: 10.1371/journal.pone.0013441
- Tong, A. W., Papayoti, M. H., Netto, G., Armstrong, D. T., Ordonez, G., Lawson, J. M., & Stone, M. J. (2001). Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, *7*(3), 691-703.

- Tongu, M., Harashima, N., Monma, H., Inao, T., Yamada, T., Kawauchi, H., & Harada, M. (2013). Metronomic chemotherapy with low-dose cyclophosphamide plus gemcitabine can induce anti-tumor T cell immunity in vivo. *Cancer Immunol Immunother*, *62*(2), 383-391. doi: 10.1007/s00262-012-1343-0
- Torimura, T., Iwamoto, H., Nakamura, T., Koga, H., Ueno, T., Kerbel, R. S., & Sata, M. (2013). Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma. *Transl Oncol*, *6*(5), 511-519.
- Tran Cao, H. S., Bouvet, M., Kaushal, S., Keleman, A., Romney, E., Kim, G., . . . Katz, M. H. G. (2010). Metronomic Gemcitabine in Combination with Sunitinib Inhibits Multisite Metastasis and Increases Survival in an Orthotopic Model of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Ther*, *9*(7), 2068-2078. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0201
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, *47*, 187-376.
- Ueno, H., Kosuge, T., Matsuyama, Y., Yamamoto, J., Nakao, A., Egawa, S., . . . Kanemitsu, K. (2009). A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer*, *101*(6), 908-915. doi: 10.1038/sj.bjc.6605256
- van der Gaag, N. A., Rauws, E. A., van Eijck, C. H., Bruno, M. J., van der Harst, E., Kubben, F. J., . . . Gouma, D. J. (2010). Preoperative biliary drainage for cancer of the head of the pancreas. *N Engl J Med*, *362*(2), 129-137. doi: 10.1056/NEJMoa0903230
- Van Laethem, J. L., Hammel, P., Mornex, F., Azria, D., Van Tienhoven, G., Vergauwe, P., . . . Haustermans, K. (2010). Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR phase II study. *J Clin Oncol*, *28*(29), 4450-4456. doi: 10.1200/jco.2010.30.3446
- Viehl, C. T., Moore, T. T., Liyanage, U. K., Frey, D. M., Ehlers, J. P., Eberlein, T. J., . . . Linehan, D. C. (2006). Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice. *Ann Surg Oncol*, *13*(9), 1252-1258. doi: 10.1245/s10434-006-9015-y
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, *378*(9791), 607-620. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., . . . Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*, *70*(8), 3052-3061. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-3690
- Vollmer, C. M., Drebin, J. A., Middleton, W. D., Teefey, S. A., Linehan, D. C., Soper, N. J., . . . Strasberg, S. M. (2002). Utility of staging laparoscopy in subsets of peripancreatic and biliary malignancies. *Ann Surg*, *235*(1), 1-7.
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., . . . Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*, *369*(18), 1691-1703. doi: 10.1056/NEJMoa1304369
- von Marschall, Z., Cramer, T., Hocker, M., Burde, R., Plath, T., Schirner, M., . . . Rosewicz, S. (2000). De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology*, *119*(5), 1358-1372.
- Wachsmann, M. B., Pop, L. M., & Vitetta, E. S. (2012). Pancreatic ductal adenocarcinoma: a review of immunologic aspects. *J Investig Med*, *60*(4), 643-663. doi: 10.231/JIM.0b013e31824a4d79
- Wachsmann, M. B., Pop, L. M., & Vitetta, E. S. (2012). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Review of Immunologic Aspects. *J Investig Med*, *60*(4), 643-663. doi: 10.231/JIM.0b013e31824a4d79
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Buchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*, *91*(5), 586-594. doi: 10.1002/bjs.4484
- Walker, P. R., Saas, P., & Dietrich, P. Y. (1997). Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol*, *158*(10), 4521-4524.

- Walter, C. U., Biller, B. J., Lana, S. E., Bachand, A. M., & Dow, S. W. (2006). Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *J Vet Intern Med*, *20*(2), 342-347.
- Wang, C., Wu, H., Xiong, J., Zhou, F., Tao, J., Liu, T., . . . Gou, S. (2008). Pancreaticoduodenectomy with vascular resection for local advanced pancreatic head cancer: a single center retrospective study. *J Gastrointest Surg*, *12*(12), 2183-2190. doi: 10.1007/s11605-008-0621-9
- Wang, J., Lou, P., Lesniewski, R., & Henkin, J. (2003). Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anticancer Drugs*, *14*(1), 13-19.
- Warshaw, A. L., & Fernandez-del Castillo, C. (1992). Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med*, *326*(7), 455-465. doi: 10.1056/nejm199202133260706
- Watowich, S. S., & Liu, Y. J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev*, *238*(1), 76-92. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00949.x
- Wei, S., Kryczek, I., & Zou, W. (2006). Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*, *108*(2), 426-431. doi: 10.1182/blood-2006-01-0177
- Wennerberg, E., Sarhan, D., Carlsten, M., Kaminsky, V. O., D'Arcy, P., Zhivotovsky, B., . . . Lundqvist, A. (2013). Doxorubicin sensitizes human tumor cells to NK cell- and T-cell-mediated killing by augmented TRAIL receptor signaling. *Int J Cancer*, *133*(7), 1643-1652. doi: 10.1002/ijc.28163
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., . . . Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, *322*(5899), 271-275. doi: 10.1126/science.1160062
- Wittekind, C., & Bertolini, J. (2010). TNM system 2010. *Der Onkologe*, *16*(2), 175-180. doi: 10.1007/s00761-009-1776-z
- Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., & Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol*, *166*(12), 7282-7289.
- Yamamoto, T., Yanagimoto, H., Satoi, S., Toyokawa, H., Yamao, J., Kim, S., . . . Kwon, A. H. (2012). Circulating myeloid dendritic cells as prognostic factors in patients with pancreatic cancer who have undergone surgical resection. *J Surg Res*, *173*(2), 299-308. doi: 10.1016/j.jss.2010.09.027
- Yao, X., Ahmadzadeh, M., Lu, Y.-C., Liewehr, D. J., Dudley, M. E., Liu, F., . . . Robbins, P. F. (2012). Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood*, *119*(24), 5688-5696. doi: 10.1182/blood-2011-10-386482
- Yapp, D. T., Wong, M. Q., Kyle, A. H., Valdez, S. M., Tso, J., Yung, A., . . . Ng, S. S. W. (2016). The differential effects of metronomic gemcitabine and antiangiogenic treatment in patient-derived xenografts of pancreatic cancer: treatment effects on metabolism, vascular function, cell proliferation, and tumor growth. *Angiogenesis*, *19*, 229-244. doi: 10.1007/s10456-016-9503-z
- Yip, D., Karapetis, C., Strickland, A., Steer, C. B., & Goldstein, D. (2006). Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*(3), Cd002093. doi: 10.1002/14651858.CD002093.pub2
- Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M., & Gabilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, *181*(8), 5791-5802.
- Zaidi, M. R., & Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res*, *17*(19), 6118-6124. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-11-0482
- Zhao, H.-Y., Ooyama, A., Yamamoto, M., Ikeda, R., Haraguchi, M., Tabata, S., . . . Akiyama, S.-i. Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in human colon cancer KM12C cells. *Cancer Lett*, *270*(1), 156-163. doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.045
- Zhao, J., Cao, Y., Lei, Z., Yang, Z., Zhang, B., & Huang, B. (2010). Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res*, *70*(12), 4850-4858. doi: 10.1158/0008-5472.can-10-0283

- Zheng, L., Xue, J., Jaffee, E. M., & Habtezion, A. (2013). Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, *144*(6), 1230-1240. doi: 10.1053/j.gastro.2012.12.042
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, *8*(1), 59-73. doi: 10.1038/nri2216
- Zitvogel, L., Kepp, O., Senovilla, L., Menger, L., Chaput, N., & Kroemer, G. (2010). Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res*, *16*(12), 3100-3104. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-2891
- Zocchi, M. R., & Poggi, A. (2004). Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense. *Front Biosci*, *9*, 2588-2604.
- Zoglmeier, C., Bauer, H., Norenberg, D., Wedekind, G., Bittner, P., Sandholzer, N., . . . Bourquin, C. (2011). CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res*, *17*(7), 1765-1775. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-2672

IV. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.5.1 TNM-Klassifikation UICC 2010	22
Tab. 1.1.5.2 Stadieneinteilung	23
Tab. 1.1.6.1 Klinische Kriterien zur Differentialdiagnose von Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis	24
Tab. 1.1.7.1 Diagnostik	25
Tab. 1.2.3.1 Zytokine	46
Tab. 2.1.1.1 Mäuse	67
Tab. 2.1.2.1 Pankreaskarzinomzellen	67
Tab. 2.1.3.1 Anästhetika	67
Tab. 2.1.4.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika	67
Tab. 2.1.5.1 Chemotherapeutika	67
Tab. 2.1.6.1 Laborgeräte	68
Tab. 2.1.7.1.1 Antikörper	70
Tab. 2.1.8.1 Blockingsubstanz, Compensations Beads, BD Cytometer Setup und Tracking Beads	70
Tab. 2.1.9.1 Antikörper für die magnetische Separation	70
Tab. 2.1.10.1 Kommerzielle Standardtests (Kits)	71
Tab. 2.1.11.1 Chemikalien und Reagenzien	71
Tab. 2.1.12.1 Verbrauchsmaterialien	72
Tab. 2.1.13.1 Lösungen, Puffer, Medien	72
Tab. 2.1.14.1 Konzentrationen von Gemcitabin und 5 FU in vitro und in vivo	73
Tab. 2.1.15.1 Software	73
Tab. 2.2.3.1.2.1 Behandlung nach Gewicht	77
Tab. 2.2.5.1.1 Zielpopulationen und die spezifischen Antikörper/Achsen zur Identifikation	81

V. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.2.5.1 Immunoediting	49
Abb. 1.2.6.1 Immunsuppressive Mechanismen in der Tumormikroumgebung.....	50
Abb. 1.3.8.1 Übersicht zu den Effekten der metronomischen Chemotherapie	64
Abb. 1.4.1 Übersicht Behandlungs-/Therapiegruppen	66
Abb. 2.2.6.2.3.1 Verteilung und Konzentration der Proben des Zytotoxizitätsexperiments auf der 12-well Platte	86
Abb. 3.1.1 Einfluss der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf das Tumorwachstum der an Pankreaskarzinom erkrankten Mäuse.....	90
Abb. 3.1.2 Einfluss der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf die Metastasierung der an Pankreaskarzinom erkrankten Mäuse.....	91
Abb. 3.2.1 Geschlechtsspezifischer Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest der Milzzellen gesunder Mäuse nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	94
Abb. 3.3.1.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software.	97
Abb. 3.3.2.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der CD4 ⁺ -T-Zell Subpopulationen, sowie der NK- und NKT-Zellen aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software.....	98
Abb. 3.3.3.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Makrophagen und MDSC aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software.	99
Abb. 3.3.4.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der DZ-Zellen aus den Milzen und Tumoren mittels FlowJo-Software.	101
Abb. 3.3.5.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der B-Zellpopulationen, den T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	102
Abb. 3.3.5.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	103
Abb. 3.3.5.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.....	104
Abb. 3.3.5.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	105
Abb. 3.3.5.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-, NKT- und Treg-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	107
Abb. 3.3.5.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b ⁺ Gr ⁺ -Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	108
Abb. 3.3.5.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ ⁺ und deren Subpopulationen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	109
Abb. 3.3.6.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der B-Zellpopulationen, den T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	111
Abb. 3.3.6.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.....	112
Abb. 3.3.6.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.....	113

Abb. 3.3.6.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-Zellen, NKT-Zellen und Treg-Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	115
Abb. 3.3.6.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b ⁺ Gr ⁺ -Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	116
Abb. 3.3.6.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	117
Abb. 3.3.6.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, in vivo	118
Abb. 3.3.7.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	119
Abb. 3.3.7.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	120
Abb. 3.3.7.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	121
Abb. 3.3.7.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-Zellen, NKT-Zellen und Treg-Zellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	124
Abb. 3.3.7.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b ⁺ Gr ⁺ -Zellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	125
Abb. 3.3.7.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU.	126
Abb. 3.3.7.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse, in vivo	127
Abb. 3.3.8.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen, der B-Zellpopulationen, der T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	128
Abb. 3.3.8.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	129
Abb. 3.3.8.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, der CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	130
Abb. 3.3.8.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der NK-Zellen, NKT-Zellen und Treg-Zellen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	132
Abb. 3.3.8.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und CD11b ⁺ Gr ⁺ -Zellen aus den Milzen von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	133
Abb. 3.3.8.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der DZ und deren Subpopulationen aus den Tumoren von tumortragenden Mäusen nach Verabreichung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin.	134
Abb. 3.3.8.4.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Tumoren der Mäuse, in vivo	135
Abb. 3.4.1.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD3 ⁺ -Zellen, B-Zellen und CD4/CD8 Ratio aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	137

Abb. 3.4.1.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	138
Abb. 3.4.1.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.....	139
Abb. 3.4.1.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	140
Abb. 3.4.1.1.5 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	141
Abb. 3.4.1.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und den NKT-Zellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	142
Abb. 3.4.1.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und MDSC aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	143
Abb. 3.4.1.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen der DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	144
Abb. 3.4.1.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU.	145
Abb. 3.4.1.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Milzen gesunder Mäuse, in vitro	146
Abb. 3.4.2.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD3 ⁺ -Zellen, B-Zellen und CD4/CD8 Ratio aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	147
Abb. 3.4.2.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	148
Abb. 3.4.2.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	149
Abb. 3.4.2.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	150
Abb. 3.4.2.1.5 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	151
Abb. 3.4.2.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und den NKT-Zellen aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	152
Abb. 3.4.2.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen und MDSC aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	153
Abb. 3.4.2.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen der DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	154
Abb. 3.4.2.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells) und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen gesunder	

Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin.	155
Abb. 3.4.2.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Milzen der gesunden Mäuse, in vitro.....	156
Abb. 3.5.1.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozyten, B-Zellen und der CD4/CD8 Ratio aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.....	158
Abb. 3.5.1.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zellpopulationen, der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.	159
Abb. 3.5.1.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ - T-Zellpopulationen, der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.	160
Abb. 3.5.1.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.	161
Abb. 3.5.1.1.5 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen und der MFI der CD69 ⁺ -Zellpopulationen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.	162
Abb. 3.5.1.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Leukozyten, der T-Zell-Subpopulationen, NK-Zellen und den NKT-Zellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.....	163
Abb. 3.5.1.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen, der MDSC und deren Subpopulationen granulozytäre und monozytäre MDSC aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.....	164
Abb. 3.5.1.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells), CD80 ⁺ /CD86 ⁻ und CD80 ⁺ CD86 ⁺ -Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.	165
Abb. 3.5.1.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells), CD80 ⁺ /CD86 ⁻ und CD80 ⁺ CD86 ⁺ -Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum 5 FU.	166
Abb. 3.5.1.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, in vitro	167
Abb. 3.5.2.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozyten, der B-Zellen, CD4/CD8 Ratio, CD4 ⁺ -T-Zellpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	168
Abb. 3.5.2.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD4 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	169
Abb. 3.5.2.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zellpopulationen, der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	170
Abb. 3.5.2.1.4 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD8 ⁺ -T-Zell-Subpopulationen, CD69 ⁺ -Zellpopulationen und deren MFI aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	171
Abb. 3.5.2.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Leukozyten, der T-Zell-Subpopulationen, NK-Zellen und den NKT-Zellen aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	173
Abb. 3.5.2.3.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Makrophagen, der MDSC und deren Subpopulationen granulozytäre und monozytäre MDSC aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	174

Abb. 3.5.2.4.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte cDZ (mature cells), CD80 ⁺ /CD86 ⁻ - und CD80 ⁺ CD86 ⁺ -Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	175
Abb. 3.5.2.4.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Subpopulationen von DZ aus den mononukleären Zellen (MNC), ausgereifte pDZ (mature cells), CD80 ⁺ /CD86 ⁻ - und CD80 ⁺ CD86 ⁺ -Zellpopulationen und die MFI von CD80 und CD86 aus den Milzen tumortragender Mäuse, nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie mit dem Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin.	176
Abb. 3.5.2.4.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Immunzellen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, in vitro	177
Abb. 3.6.1.1 Auswertungsstrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der lebenden und toten CD45 ⁺ -Zellen und der CD45 ⁻ -Zellen im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T- und NK-Zellen mittels FlowJo-Software.....	179
Abb. 3.6.2.1.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der toten Panc02-Zellen, der CD107 ⁺ -Zellen (Marker für Degranulation) und der CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen.	180
Abb. 3.6.2.1.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107 ⁺ -Zellen der NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen.	181
Abb. 3.6.2.1.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107 ⁺ -Zellen der NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen und des Geschlechts.	182
Abb. 3.6.2.2.1 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der toten Panc02-Zellen und der CD107 ⁺ -Zellen der CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen.	183
Abb. 3.6.2.2.2 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107 ⁺ -Zellen der NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen.	184
Abb. 3.6.2.2.3 Quantifizierung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD107 ⁺ -Zellen der NK- und CD8 ⁺ -T-Zellen aus den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse nach der Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin im Hinblick auf die Zytotoxizität der CD8 ⁺ -T-Zellen und NK-Zellen und des Geschlechts.	185
Abb. 3.7.1.1 Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums 5 FU, in vivo.	188
Abb. 3.7.2.1 Bestimmung der Zytokine unter Angabe der jeweiligen Konzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse nach Behandlung mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie des Standard-Chemotherapeutikums Gemcitabin, in vivo.	189
Abb. 3.7.2.2 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Zytokinkonzentration im Blutserum der tumortragenden Mäuse.....	190
Abb. 3.7.3.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen und Tumoren der Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	192
Abb. 3.7.3.1.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Milzen der tumortragenden Mäuse, nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	193
Abb. 3.7.3.2.1 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Tumoren der Mäuse (Tils der tumortragenden Mäuse), nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	195
Abb. 3.7.3.2.2 Bestimmung der Zytokine und deren jeweilige Konzentration in den Mediumüberständen aus den Tumoren der Mäuse (Tils der tumortragenden Mäuse), nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	196

Abb. 3.7.3.2.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Milzen der tumortragenden Mäuse.....	197
Abb. 3.7.3.2.4 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Milzen der tumortragenden Mäuse	198
Abb. 3.7.3.2.5 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse.....	198
Abb. 3.7.3.2.6 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit Gemcitabin auf die Zytokinkonzentration in den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse	198
Abb. 3.8.1 Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf die jeweilige Konzentration von IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	200
Abb. 3.8.2 Untersuchung der Mediumüberstände von Tumorzellen der Mäuse auf die jeweilige Konzentration von IFN- γ nach Therapie mit konventioneller und metronomischer Chemotherapie der Standard-Chemotherapeutika 5 FU und Gemcitabin.	201
Abb. 3.8.3 Immunmodulierende Effekte der konventionellen und metronomischen Chemotherapie mit 5 FU und Gemcitabin auf IFN- γ in den Mediumüberständen der Tumoren der Mäuse	202
Abb. 4.1.1 Eigenschaften der konventionellen und metronomischen Chemotherapie	205
Abb. 4.2.1 Entwicklung der TumorgroÙe der konventionellen Chemotherapie (MTD) im Vergleich zur metronomischen Chemotherapie auf längere Zeit betrachtet	210
Abb. 4.4.1 Effektorzelltypisierung	217
Abb. 4.5.1 Mechanismen der MDSC-vermittelten Immunsuppression in lymphoiden Organen und im Tumor	223
Abb. 4.5.2 Die Rolle der MDSC während des Tumorwachstums und der Metastasierung	225
Abb. 4.7.1.1 Chemotherapie-induzierte Immunzell-vermittelte Hemmung der Anti-Tumor-Wirksamkeit.....	232
Abb. 4.7.3.1 Anti-Tumor- und Pro-Tumor-Aktivitäten von IFN- γ	235

VI. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Von ganzem Herzen bedanke ich mich für die intensive, exzellente und sehr freundliche Betreuung und Unterstützung in jeder Phase meiner Promotion. Besonders bedanken möchte ich mich für die Korrektur meiner Arbeit und die bereichernde, sehr gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz, vom Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Korrektur meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. Svetlana Karakhanova danke ich von ganzem Herzen für ihr großes Engagement und ihre unermüdliche, wertvolle und inspirierende Unterstützung. Vielen Dank für die immer freundliche und geduldige Betreuung während der Durchführung meiner Projekte.

Insbesondere Henriette Bunge, Katharina von Ahn und Moritz Heinrich danke ich für die außergewöhnliche, sehr gute Zusammenarbeit, die immer gewährte Hilfsbereitschaft und die tolle, gemeinsame Zeit im Labor.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe (Tina Maxelon, Inna Schwarting, Markus Herbst, Andreas Mathes, Jasmin Fritz und Caroline Maier) für die stete Hilfsbereitschaft, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei meinen großartigen Eltern möchte ich mich ganz besonders für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums und der Dissertation bedanken.