



Abschlussbericht zum medizinischen Doktorandenprojekt

## Entschlüsselung der Rolle von myeloiden Immunzellen in der Entstehung von Chemotherapie-Resistenz im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

**Stipendiat: Tobias S. Bröring**

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**AG Gagliani**

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**AG Tintelnot**

Zentrum für Onkologie, II. Medizinische Klinik  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

## Hintergrund

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine verheerende Erkrankung mit insgesamt schlechter Prognose und steigender Inzidenz. Viele Tumoren werden erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem eine Heilung nicht mehr möglich ist. Als hauptsächliche Option auf Heilung gilt derzeit eine operative Entfernung, gefolgt von einer Chemotherapie. Für viele Patienten ergeben sich jedoch keine sinnvollen Resektionsmöglichkeiten, sodass eine palliative Chemotherapie den Therapiestandard darstellt. Ein erheblicher Anteil der Tumoren zeigt jedoch bereits initial eine Resistenz gegenüber der gewählten Chemotherapie. Zusätzlich kann sich auch nach anfänglichem Ansprechen auf die Therapie im Verlauf eine Resistenz entwickeln. In der Folge ist das Überleben dieser Patienten auf wenige Monate begrenzt. Somit ist die Resistenzentwicklung zentral für das Überleben mit Bauchspeicheldrüsenkrebs. Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen im Bauchspeicheldrüsenkrebs spielen metabolische Anpassungen der Krebszellen. Autophagie ist ein zellulärer Prozess, der die benötigte Energie für die Tumorzellen durch den Abbau von defekten Proteinen oder Zellorganellen bereitstellt. Es ist bekannt, dass eine hohe Autophagie-Aktivität häufig zu einer Resistenz gegenüber einer Chemotherapie führt. Wie genau Autophagie reguliert wird, ist allerdings nicht hinreichend verstanden. Da es häufig eine Korrelation zwischen hoher autophagischer Aktivität und dem Vorhandensein vieler myeloider Immunzellen in den Tumoren gibt, nehmen wir an, dass diese Untergruppe von Immunzellen zur Modulation der Autophagie beiträgt.

Unsere zentrale Hypothese in diesem Projekt lautet: „**Tumor-infiltrierende myeloische Zellen beeinflussen die autophagische Aktivität von Bauchspeicheldrüsenkrebs.**“ Ziel dieses Projekts ist es, diese Hypothese zu überprüfen und aufzuschlüsseln, wie die Aktivität der Autophagie moduliert wird. Aus Vorarbeiten wissen wir, dass in Tumoren, in denen eine Chemotherapie effektiv war, weniger myeloide Immunzellen zu finden sind. Andere Arbeitsgruppen konnten einen ähnlichen Phänotyp beschreiben.

Um herauszufinden, wie myeloide Zellen potenziell die Autophagie modulieren, haben wir ein Proteinscreen und mRNA Sequenzierung von murinen Pankreastumoren durchgeführt. Dabei haben wir Tumoren, die auf eine Chemotherapie angesprochen haben (niedrige Autophagie), mit Tumoren verglichen, die nicht auf eine Chemotherapie angesprochen haben (hohe Autophagie). Hierbei konnten wir feststellen, dass neben niedrigeren Frequenzen von myeloiden Zellen auch eine erniedrigte Expression und Proteinkonzentration von High Mobility Group Box 1 (HMGB1) vorlag. HMGB1 ist ein nicht-Histon, Chromatin-assoziiertes Protein mit gewebeabhängiger Rolle in Krebs. Intrazellulär fördert es die chromosomale Stabilität und wirkt tumorsuppressiv, während es extrazellulär Zellüberleben, Migration und Therapieresistenz durch Aktivierung der Autophagie unterstützt. Doch welche Zellen HMGB1 freisetzen und wie es dadurch potenziell Autophagie und Therapieresistenz beeinflusst ist inkomplett verstanden. Wir vermuten, dass HMGB1 von myeloiden Zellen freigesetzt wird, dann an Rezeptoren wie RAGE oder TLR4 auf den Tumorzellen bindet und zu einer Steigerung der autophagischen Aktivität führt.

## Ergebnisse

Um die genauen Quellen von HMGB1 in unserem Modell zu identifizieren, sortierten wir mittels Durchflusszytometrie verschiedene Zelltypen aus murinen Tumoren und führten eine qPCR an diesen durch. Dabei zeigte sich eine hohe Expression von HMGB1 in myeloiden Zellen. Da myeloide Immunzellen sowohl in unserem murinen Modell als auch im humanen Setting über 60% der Tumorinfiltrierenden Immunzellen ausmachen und einen hohen intratumoralen Umsatz haben, wuchs unser Interesse an der Rolle von myeloiden Immunzellen als Quelle von intratumoralem HMGB1 und deren Einfluss auf die Entstehung von Chemotherapie-Resistenz.

Um zu bestätigen, dass von myeloiden Zellen freigesetztes HMGB1 einen Effekt auf die von uns in vivo untersuchten Krebszellen hat, überprüften wir den Einfluss von rekombinantem HMGB1 auf das Zellwachstum und die autophagische Aktivität. Dabei zeigte sich, dass eine steigende Konzentration von rekombinantem HMGB1 die Zellproliferation förderte und zu einer Erhöhung der autophagischen Aktivität führte. Um zu untersuchen, ob HMGB1 aus myeloiden Immunzellen die Autophagie in Tumorzellen beeinflusst, führten wir

Kokultur-Experimente durch. Hierfür wurden Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und in der Zellkultur zu Makrophagen differenziert. Wir haben Mäuse verwendet mit entweder einer Defizienz für HMGB1 oder Wildtyp Kontrollmäuse. Wir konnten feststellen, dass die autophagische Aktivität in Tumorzellen, die mit HMGB1-defizienten Makrophagen kultiviert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert war. Um diese Effekte im komplexen Tumormikromilieu in vivo zu untersuchen und zu klären, ob diese Achse auch die Therapieresistenz beeinflusst, verwendeten wir LysMCre+ HMGB1-KO-Mäuse, bei denen HMGB1 gezielt in myeloiden Zellen deletiert wurde. In diesen Mäusen führte die HMGB1-Deletion zu einer erhöhten Sensibilität der Tumoren gegenüber der einer Chemotherapie. Um die metabolischen Veränderungen in Tumoren mit HMGB1-Knockout (Cre+) im Vergleich zur HMGB1-Wildtyp-Kontrolle (Cre-) besser zu verstehen, führten wir denselben Versuch erneut durch. In diesem Fall wurden die Tumoren jedoch bereits 24 Stunden nach der Gabe der Chemotherapie entnommen. Da wir murine Krebszellen mit einem Autophagie-Reporter verwendeten, konnte die autophagische Aktivität durch die Messung von grün- und rot-fluoreszierenden Proteinen in Tumorschnitten mittels Mikroskopie präzise erfasst werden. Dabei zeigte sich, dass die Autophagie in Tumoren von Mäusen mit einem HMGB1-Knockout in myeloiden Immunzellen im Vergleich zu HMGB1-Wildtyp-Mäusen geringer war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletion von HMGB1 in myeloiden Zellen zu einer Sensibilisierung von murinen Pankreastumoren gegenüber einer Chemotherapie führt. Parallel zeigte sich eine Regulation der Autophagie durch HMGB1, was potenziell die erhöhte Sensitivität gegenüber der Chemotherapie von Tumoren in LysMCre+ HMGB1-KO-Mäusen erklären könnte.

### **Ausblick**

Es bleiben noch offene Fragen, wie beispielsweise an welchen Rezeptor HMGB1 bindet, um die Autophagie zu beeinflussen. Außerdem ist aktuell unklar, ob alle myeloiden Immunzellen oder nur eine kleinere, spezifischere Subgruppe diesen Effekt vermittelt. Nicht zuletzt wird es entscheidend sein, nachzuweisen, dass diese Achse auch im humanen Setting eine wichtige Rolle spielt. Um diese Fragen zu beantworten, führen wir derzeit einen CRISPR-Cas9-gestützten knockout verschiedener Rezeptoren von HMGB1 durch. Zur Untersuchung der Rolle von aus myeloiden Immunzellen freigesetztem HMGB1 in menschlichen Tumoren und dessen Beitrag zur Entstehung von Chemotherapie-Resistenz beginnen wir aktuell mit einer Untersuchung des Genexpressionsmuster in Tumorschnitten. Dabei kommt eine neuartige Technologie (spatial transcriptomics) zum Einsatz, die eine detektieren von mRNA mittels Sonden und bildgebenden Verfahren kombiniert. Diese Methode ermöglicht es, die räumliche Organisation und die molekulare Zusammensetzung von Zellen in ihrem natürlichen Kontext zu erfassen. Auf diese Weise können wir die räumliche Anordnung und die Interaktionen zwischen myeloiden Immunzellen und Krebszellen noch genauer untersuchen. Wir planen, die Ergebnisse dieser Experimente nach Abschluss der Untersuchungen zu veröffentlichen.

### **Danksagung**

Unser aufrichtiger Dank gilt der Hamburger Krebsgesellschaft und ihren Förderern für die Unterstützung des beschriebenen Projekts sowie des Promotionsvorhabens des Stipendiaten.