
**Tumorstroma des gastroösophagealen Adenokarzinoms:
Einfluss von Makrophagen auf maligne gastroösophageale Epithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dr. med. Fabrice Viol

durchgeführt im

Zentrum für Innere Medizin

I. Medizinische Klinik und Poliklinik

(Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin)

Hamburg, 2026

Erster Gutachter: PD Dr. Jörg Schrader
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Tim Gilberger

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät
für Mathematik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

Tag der Disputation: 19.06.2026

Teile der vorliegenden Dissertation sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Publikation (inklusive zitable Abstracts):

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, L. Tamminga, J. Krause, C. Eggers, J. Izbicki, TS. Clauditz M. Reeh, K. Schulze, J. von Felden, T. Fründt, G. Sauter, S. Huber, A. Lohse, J. Schrader: Macrophages promote disease progression and foster a PDGF-AA dependent resistance towards HER2 targeted therapy in gastroesophageal adenocarcinoma, in Vorbereitung

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, J. Krause, M. Reeh, J. Izbicki, G. Sauter, A. Lohse, S. Huber, J. Schrader: Makrophagen fördern die Krankheitsprogression sowie eine PDGF-AA / PDGFR α -vermittelte Resistenz gegenüber zielgerichteter HER2 Therapie im ösophagealen Adenokarzinom, Z Gastroenterol 2021; 59(08): e256

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, J. Krause, M. Reeh, J. Izbicki, G. Sauter, A. Lohse, S. Huber, T. Fründt, K. Schulze, J. Schrader: Makrophagen vermitteln eine STAT3 abhängige Metastasierung in gastroösophagealen Adenokarzinomen: Z Gastroenterol 2023; 61: e365–e626

Kongressbeiträge:

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, J. Krause, M. Reeh, J. Izbicki, G. Sauter, A. Lohse, S. Huber, T. Fründt, K. Schulze, J. Schrader: Makrophagen vermitteln eine STAT3 abhängige Metastasierung in gastroösophagealen Adenokarzinomen: Viszeralmedizin 2023

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, J. Krause, M. Reeh, J. Izbicki, G. Sauter, A. Lohse, S. Huber, J. Schrader: Makrophagen fördern die Krankheitsprogression sowie eine PDGF-AA / PDGFR α -vermittelte Resistenz gegenüber zielgerichteter HER2 Therapie im ösophagealen Adenokarzinom, Viszeralmedizin 2021

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, L. Tamminga, J. Krause, C. Eggers, J. Izbicki, G. Sauter, S. Huber, J. Schrader: Macrophage derived PDGF-AA and STAT3 activation promotes resistance towards HER2 targeted therapy in gastroesophageal adenocarcinoma, EACR-AACR Basic and Translational Research Conference Tumormicroenvironment, 01.03. - 04.03.2020, Lissabon

F. Viol, T. Amin, M. Fahl, C. Eggers, L. Tamminga, A. Lohse, J. Schrader: Macrophages promote a STAT3 dependent resistance towards HER2 targeted therapy in gastroesophageal adenocarcinoma. 9th Mildred Scheel Cancer Conference, Bonn, 15.5 – 16.05.2019, Ausgezeichnet mit Fellowship Award, Abstract

Für Elea, Lenia und Nadine

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

Zusammenfassung

Das gastroösophageale Adenokarzinom (GEAC) zählt zu den aggressivsten malignen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes und ist mit einer äußerst ungünstigen Prognose verbunden. Aufgrund der biologischen Aggressivität werden etwa 65 % der Patienten erst in einem fortgeschrittenen, inoperablen oder metastasierten Stadium diagnostiziert, was trotz chirurgischer und endoskopischer Fortschritte zu einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 30 % führt. In diesen Stadien steht die palliative Therapie im Vordergrund. Ein wesentliches klinisches Problem stellt dabei die ausgeprägte primäre und erworbene Therapieresistenz des GEAC dar, deren molekulare Mechanismen bislang nur unzureichend verstanden sind. Die Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen ist daher von hoher klinischer Relevanz. Etwa ein Drittel der GEAC-Patienten weist eine Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors 2 (HER2) auf, der als Zielstruktur für eine palliative zielgerichtete Therapie dient. Während die Phase-III-Studie ToGA eine Verlängerung des Gesamtüberlebens durch die Kombination von Chemotherapie und Trastuzumab zeigen konnte, führte die Behandlung mit dem dualen EGFR/HER2-Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib in der TRIO-013/LOGIC-Studie zu keiner relevanten Verbesserung des Gesamtüberlebens. Dieses fehlende Therapieansprechen verdeutlicht die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen. Zahlreiche Studien belegen, dass das Therapieansprechen wesentlich durch die Tumormikroumgebung beeinflusst wird, die neben der extrazellulären Matrix auch Fibroblasten, Endothelzellen und infiltrierende Immunzellen umfasst. Insbesondere für das GEAC ist gut belegt, dass Karzinogenese und Tumorprogression eng mit chronisch-entzündlichen Prozessen verknüpft sind. Tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) stellen hierbei einen zentralen Bestandteil des Tumorstromas dar und können, abhängig vom Tumorstadium, die Tumorprogression, Invasion und Metastasierung fördern. Ihre Rolle bei der Vermittlung von Resistenzen gegenüber zielgerichteten Therapien im GEAC ist bislang jedoch unzureichend charakterisiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung des Einflusses von Makrophagen auf die Tumorprogression sowie auf die Wirksamkeit der HER2-gerichteten Therapie im GEAC. Hierfür wurden zunächst cDNA-Transkriptome von 64 GEAC Patienten hinsichtlich onkogener Expressionsmustern analysiert. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Tissue-Mikroarray (TMA)-Analysen der Einfluss der Makrophagen auf klinisch-pathologische Parameter untersucht. Anschließend wurden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen *in vitro* mittels indirekter Kokultursysteme untersucht. Hierfür wurden die GEAC-Zelllinien PT1590, LN1590, NCI-N87, SKGT4, OE33 und PT6216 mit Makrophagen, die aus THP1-Monozyten und PBMCs hervorgegangen sind, kokultiviert. Diese erhobenen Befunde wurden anschließend erneut mit Hilfe des TMA verifiziert. Es zeigte sich zunächst, dass die makrophagenspezifischen Gene *CD163*, *MSR1* und *NOS2A* signifikant höher in GEAC-Gewebe exprimiert werden, als im gesunden Kontrollgewebe.

Insbesondere GEAC-Patienten, die durch eine hohe Expression dieser Gene charakterisiert waren, zeigten Expressionsmuster, die mit einer erhöhten Tumorprogression und Therapieresistenz assoziiert sind. Darüber hinaus war eine hohe Infiltration CD163- und CD68-positiver Makrophagen mit einem höheren Tumorstadium, einer gesteigerten Proliferation, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, einer stärkeren Dedifferenzierung und einem reduzierten Gesamtüberleben verbunden. In der indirekten Kokultur der GEAC-Zellen mit den THP1- und MDM-Makrophagen konnte bestätigt werden, dass insbesondere die HER2-positiven PT1590-, LN1590- und NCI-N87-Zellen unter dem Einfluss der Makrophagen eine erhöhte Proliferation aufwiesen. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die HER2-positiven Zelllinien PT1590 und NCI-N87 in Anwesenheit der Makrophagen einen nahezu vollständigen Wirkverlust gegenüber dem TKI Lapatinib aufwiesen. Dabei zeigte sich begleitend eine verstärkte Aktivierung der onkogenen Signaltransduktionswege STAT3, AKT und ERK. Insbesondere eine starke STAT3-Aktivierung war unter Lapatinibtherapie und Makrophagenkokultur nachzuweisen. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von STAT3 konnte die Zellen gegenüber Lapatinib wieder sensibilisieren, jedoch die Makrophagen-vermittelte Proliferation nicht aufheben. In einer weiteren Sekretomanalyse konnte PDGF-AA als differenziell sekretierter Faktor der Makrophagen identifiziert werden. Die Stimulation der GEAC-Zelllinie PT1590 mit PDGF-AA führte zu einer erhöhten Proliferation, Lapatinib-Resistenz und zu einer Aktivierung der Signalwege STAT3, AKT und ERK. Durch Neutralisierung des PDGF-AA und durch pharmakologische Inhibition sowie siRNA-vermittelten Knockdown des PDGFR α konnten die Makrophagen-induzierte Proliferation und Lapatinib-Resistenz wieder aufgehoben werden. Darüber hinaus konnte durch die Hemmung des PDGFR α die Makrophagen-vermittelte AKT- und ERK-Aktivierung reduziert werden, während die STAT3-Aktivierung erhalten blieb. Diese Befunde wurden mittels cDNA-Transkriptomanalyse und TMA bestätigt. Dabei zeigte sich zunächst eine deutlich erhöhte Expression von *PDGFA* und *PDGFRA* im GEAC-Gewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe. Diese Expression korrelierte dabei mit der Expression der makrophagenspezifischen *CD68* und *CD163*. Zusätzlich konnte mittels RNAScope-Analyse nachgewiesen werden, dass intratumorale CD68-positive Makrophagen *PDGFA* exprimieren. Insbesondere in den Bereichen mit ausgeprägter Makrophageninfiltration konnte eine starke membranöse PDGFR α -Phosphorylierung nachgewiesen werden. Diese Aktivierung des PDGFR α konnte mit einem erhöhten Tumorstadium und einem reduzierten Gesamtüberleben von GEAC-Patienten korreliert werden. Zusätzlich zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Serum-PDGF-AA und einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit erstmals, dass tumorinfiltrierende Makrophagen über die Freisetzung von PDGF-AA und die Aktivierung eines PDGFR α /AKT/ERK-Signalwegs wesentlich zur Tumorprogression und zur Resistenz gegenüber der HER2-gerichteten Therapie im GEAC beitragen. Eine kombinierte Inhibition von HER2 und PDGFR α könnte daher insbesondere für HER2-resistente GEAC-Patienten eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen.

Abstract

Gastroesophageal adenocarcinoma (GEAC) is among the most aggressive malignant neoplasms of the gastrointestinal tract and is associated with a highly unfavorable prognosis. Due to its biological aggressiveness and nonspecific symptoms, approximately 65 % of patients are diagnosed at an advanced, inoperable, or metastatic stage. Consequently, despite significant advances in surgical and endoscopic techniques, the 5-year overall survival rate remains below 30 %. For these patients, palliative therapy represents the primary treatment option. However, GEAC is characterized by an exceptionally high rate of intrinsic and acquired therapy resistance, representing a major clinical challenge in patient management. Thus, unraveling the molecular mechanisms of resistance to targeted therapies is essential, particularly with regard to development of novel targeted therapeutic strategies. Approximately one third of GEAC patients exhibit overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), which serves as a target for palliative targeted therapy. While the phase III ToGA trial demonstrated an improvement in overall survival with the addition of trastuzumab to chemotherapy, treatment with the dual EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib failed to show a relevant survival benefit in the TRIO-013/LOGIC study. This lack of therapeutic efficacy highlights the urgent need for a better understanding of resistance mechanisms. Numerous studies have demonstrated that therapeutic response is strongly influenced by the tumor microenvironment, which comprises the extracellular matrix as well as fibroblasts, endothelial cells, and infiltrating immune cells. In GEAC, carcinogenesis and tumor progression are closely linked to chronic inflammatory processes. Tumor-associated macrophages (TAMs) represent a key component of the tumor stroma and can promote tumor progression, invasion and metastasis in a stage-dependent manner. However, their role in mediating resistance to targeted therapies in GEAC remains poorly characterized. Therefore, the aim of this study was to investigate the impact of macrophages on tumor progression and on the efficacy of HER2-targeted therapy in GEAC. To this end, cDNA transcriptomes from 64 GEAC patients were analyzed for oncogenic expression patterns and tissue microarray (TMA) analyses were performed to assess the impact of macrophages on clinicopathological parameters. The underlying molecular mechanisms were subsequently investigated *in vitro* using indirect coculture systems. GEAC cell lines (PT1590, LN1590, NCI-N87, SKGT4, OE33, and PT6216) were cocultured with macrophages differentiated from THP-1 monocytes or PBMCs. The experimental findings were further validated using TMA analyses. Macrophage-specific genes (CD163, MSR1, and NOS2A) were found to be significantly upregulated in GEAC tissue compared with normal control tissue. High expression of these genes was associated with expression profiles indicative of enhanced tumor progression and therapy resistance. Moreover, high infiltration of CD163- and CD68-positive macrophages correlated with advanced tumor stage, increased proliferation, lymph node metastasis, poor differentiation

and reduced overall survival. In indirect coculture experiments, HER2-positive GEAC cell lines (PT1590, LN1590, and NCI-N87) exhibited increased proliferation in the presence of macrophages. Furthermore, the HER2-positive cell lines PT1590 and NCI-N87 showed an almost complete loss of sensitivity to lapatinib under macrophage coculture conditions. This was accompanied by enhanced activation of the oncogenic signaling pathways STAT3, AKT, and ERK, with pronounced STAT3 activation observed during lapatinib treatment in the presence of macrophages. siRNA-mediated knockdown of STAT3 restored sensitivity to lapatinib but did not abrogate macrophage-induced proliferation. Secretome analysis identified PDGF-AA as a macrophage-derived factor. Stimulation of the GEAC cell line PT1590 with PDGF-AA resulted in increased proliferation, lapatinib resistance, and activation of STAT3, AKT, and ERK signaling pathways. Neutralization of PDGF-AA, as well as pharmacological inhibition or siRNA-mediated knockdown of PDGFR α , reversed macrophage-induced proliferation and lapatinib resistance. While inhibition of PDGFR α reduced AKT and ERK activation, STAT3 activation remained unaffected. These findings were confirmed by cDNA transcriptome analysis and TMA. Notably, *PDGFA* and *PDGFRA* expression was significantly increased in GEAC tissue and correlated with macrophage markers CD68 and CD163. RNAscope analysis demonstrated *PDGFA* expression in intratumoral CD68-positive macrophages. Strong membranous phosphorylation of PDGFR α was observed particularly in areas with high macrophage infiltration and was associated with advanced tumor stage and reduced overall survival. In addition, elevated serum PDGF-AA levels correlated with advanced disease stage. In summary, this study demonstrates for the first time that tumor-infiltrating macrophages promote tumor progression and resistance to HER2-targeted therapy in GEAC through the release of PDGF-AA and subsequent activation of a PDGFR α /AKT/ERK signaling axis. Combined inhibition of HER2 and PDGFR α may therefore represent a promising therapeutic strategy, particularly for patients with HER2-resistant GEAC.

Abkürzungsverzeichnis

(m/v)	Masse/Volumen Prozent
(v/v)	Volumen/Volumen Prozent
°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
ABC	A denosintriphosphat- b indende C assette
AKT	A kt-Protein Kinase B (Serin/Threonin-Kinase)
APAF1	A poptotic P rotease A ctivating F actor 1
APC	A llo ph ycocyanin
APS	A mmonium p eroxodisulfat
BAD	B cl-2-associated d eath promoter
BAX	B cl-2-associated X protein
BCA	B icinchoninsäure- A ssay
BID	B H3-interacting d omain death agonist
BIM	B cl-2-interacting m ediator of cell death
bp	B asen p aare
BSA	B ovines S erum a lbumin
CAPOX	Capecitabin + O xaliplatin
CCL2	Chemokine (C-C motif) L igand 2
CCL3	Chemokine (C-C motif) L igand 3
CCL20	Chemokine (C-C motif) L igand 20
CD	C luster of D ifferentiation
CDKN2A	C yclin D ependent K inase Inhibitor 2A
CDX	C audal-Type Homeobox (Genfamilie)
CH	C onfoederatio H elvetica (Schweiz, Ländercode)
cDNA	complementary D eoxyribonucleic A cid
cm	C entimeter
CO ₂	C arbon D ioxide
Ct	C ycle t hreshold
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) L igand 2
ddH ₂ O	double d istilled H ₂ O
DAPI	4',6- D iamidin-2-phenylindol
DE	D eutschland
DMSO	D imethylsulfoxide
DMEM	D ulbecco's M odified E agle M edium
DNA	D eoxyribonucleic A cid
DTT	D ithio t hreitol
ECM	E xtracellular C atrix M atrix

EDTA	E thylene d iamine t etraacetic A cid
EGF	E pidermal G rowth F actor
EGFR	E pidermal G rowth F actor R eceptor
ELISA	E nzyme-linked I mmunosorbent A ssay
EMT	E pithelial M esenchymal T ransition
ERBB2	E rb- B 2 Receptor Tyrosine Kinase 2 (HER2)
ERK	E xtracellular Signal- R egulated K inase
ESCC	E sophageal S quamos C ell C arcinoma
FACS	F luorescence- A ctivated C ell S orting
FAM	F luorescein A midite (M odifikation)
FCS	F etal C alf S erum
FC	F low C ytometry
FFPE	F ormalin- F ixed P araffin- E MBEDDED
FITC	F luorescein isothiocyanate
FLOT	F luorouracil, L euovorin, O xaliplatin, T axotere
G	G radung (Differenzierungsgrad)
GAPDH	G lycerinaldehyd-3-phosphat- D ehydrogenase
GEO	G ene E xpression O mnibus
GEAC	G astroesophageal A denocarcinoma
GERD	G astroesophageal R eflux D isease
GSE	G EO S eries
GSM	G EO S ample
GPL	G EO P latform
Grb2	G rowth Factor Receptor- B ound protein 2
Gy	G ray
HE	H ämatoxylin- E osin
HGIN	H igh- G rade I ntraepithelial N eoplasia
HER2	H uman E pidermal Growth R eceptor 2
HLA	H uman L eukocyte A ntigen
HRP	H orseradish P eroxidase
IC50	I nhibitory C oncentration 50%
ICAM	I nter c ellular A dhesion M olecule
IFF	I mmun f luoreszenz f ärbung
IEN	I ntraepitheliale N eoplasie
IL	I nterleukin
IPA	I sopropanol
IT	I talien
JP	J apan
KRAS	K irsten R at S arcoma viral oncogene homolog

L	L ymphgefäßinvasion
LGIN	L ow- G rade I ntraepithelial N eoplasia
LPS	L ipopolysaccharid
MACS	M agnetic A ctivated C ell S orting
MDR	M ultidrug- R esistenz
min	M inuten
mM	m illi M olar
MGB	M inor G roove B inding
MGMT	O ⁶ - M ethylguanin- D N A - M ethyltransferase
MHC	M ajor H istocompatibility C omplex
ml	m illiliter
ml/min	m illiliter pro m inute
MLH1	MutL homolog 1
MMR	M ismatch- R eparatur
mRNA	m essenger R ibonucleic A cid
miRNA	m icro R NA
MSR1	M acrophage S cavenger R eceptor 1
mTORC1/2	M echanistic T arget of R apamycin C omplex 1/2)
MTT	M ethylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
NFκB	N uclear F actor κ B
ncRNA	n ichtkodierende R NA
ng	n anogramm
NSCLC	N on-small cell l ung c ancer
PBS	P hosphate B uffered S aline
PBMC	P eripheral B lood M ononuclear C ells
PCR	P olymerase C hain R eaction
PDGF	P latelet- D erived G rowth F actor
PDGFR	P latelet- D erived G rowth F actor R eceptor
PD-L1	P rogrammed D eath L igand 1
PD-1	P rogrammed D eath 1
PDK	P yruvat- d ehydrogenase- K inase
PE	P hycoerythrin
PFA	P arformaldehyd
PFS	P rogression- F ree S urvival
PIP2	P hosphatidylinositol-4,5- b isphosphat
PIP3	P hosphatidylinositol-3,4,5- t risphosphat
PMA	P horbol-12- M yristat-13- A cetat
PMSF	P henyl m ethylsulfonyl f luorid
PRRs	P attern R ecognition R eceptors
PTEN	P hosphatase and T ensin Homolog deleted on chromosome 10

R	R esektionsrandstatus
RHOJ	R as h omolog family member J
RNA	R ibonucleic A cid
RNA-Seq	R NA- S equencing
RPMI	R oswell P ark M emorial I nstitute
RT	R aum t emperatur
s	S ekunden
SMAD	S mall M others A gainst D ecapentaplegic
SOS	S on of sevenless
STAT3	S ignal T ransducer and A ctivator of T ranscription 3
TAE	T umorassozierte E ndothelzellen
TAFs	T umorassozierte F ibroblasten
TAMs	T umorassozierte M akrophagen
TGF-β	T ransforming G rowth F actor- β
TMA	T issue M icroarray
TLR	T oll- L ike R eceptor
TNM	T umor, N odus, M etastasen
TP53	T umor P rotein 53
UICC	U nion for I nternational C ancer C ontrol
V	V eneninvasion
VCAM	V ascular C ell A dhesion M olecule
WB	W estern B lot
μ	M ikro
μg	M ikrogramm
μl	M ikroliter
μm	M ikrom e ter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Das gastroösophageale Adenokarzinom (GEAC)	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Pathologie und Pathogenese	3
1.1.3 Diagnostik, Therapieoptionen und klinische Herausforderungen . .	6
1.1.4 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) als therapeutisches Ziel im GEAC	10
1.2 Therapieresistenzen in soliden Tumoren	14
1.2.1 Primäre Therapieresistenz	14
1.2.2 Sekundäre Therapieresistenz - Ursache und Auswirkung	18
1.2.3 Mechanismen der HER2-Therapie-Resistenz	20
1.2.4 Einfluss des Tumorstromas auf das Therapieansprechen	22
1.3 Makrophagen als Teil des Tumorstromas	24
1.3.1 Monozyten als Progenitorzellen der Makrophagen	24
1.3.2 Polarisierung und Funktion von Makrophagen	25
1.3.3 Tumorassoziierte Makrophagen	28
1.3.4 Einfluss von Makrophagen auf den Therapieerfolg von Krebserkrankungen	30
1.4 Ziel der Arbeit	32
2 Materialien	34
2.1 Laborgeräte	34
2.2 Verbrauchsmittel	36
2.3 Kit Systeme	37
2.4 Software	37
2.5 Chemikalien, Puffer und Lösungen	38
2.5.1 Chemikalien	38
2.5.2 Puffer und Rezepturen	40
2.6 Zellbiologisches Material	43
2.6.1 Zelllinien	43

2.6.2	Zellkultur Medien und Zusätze	44
2.7	Molekularbiologisches Material	45
2.7.1	TaqMan™ Sonden	45
2.7.2	Small-interfering RNA's	45
2.7.3	RNA-Scope Sonden	45
2.8	Biochemisches Material	46
2.8.1	Antikörper	46
2.8.2	Wachstumsfaktoren und Zytokine	47
2.8.3	Inhibitoren	47
3	Methoden	48
3.1	Histologische Methoden	48
3.1.1	Tissue Microarray	48
3.1.2	Immunhistochemie	49
3.2	Zellbiologische Methoden	50
3.2.1	Zellkultur	50
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
3.2.3	Isolierung mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	51
3.2.4	Zellzahlbestimmung	52
3.2.5	Magnetische Zellseparation	52
3.2.6	Indirekte Kokultur	53
3.2.7	Bestimmung der Zellvitalität	54
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbung	55
3.2.9	Durchflusszytometrie	55
3.3	Molekularbiologische Methoden	56
3.3.1	Isolierung von Ribonukleinsäuren	56
3.3.2	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	57
3.3.3	Reverse Transkription	57
3.3.4	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (TaqMan™)	58
3.3.5	RNA-Interferenz	59
3.3.6	RNAscope	60
3.4	Biochemische Methoden	62
3.4.1	Isolierung von Proteinen aus Ganzzelextrakten	62
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	62
3.4.3	SDS-PAGE	63
3.4.4	Western Blot	63
3.4.5	Densitometrische Quantifizierung	65
3.4.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	65
3.4.7	Antikörper-basierter Multiplex Array	66
3.5	Mikroskopie	67

3.6	Bioinformatische Analysen	67
3.6.1	Gene Expression Omnibus Datenbank	67
3.6.2	Prozessierung und funktionelle Analyse cDNA Microarray	67
3.6.3	Gene-Set-Enrichment-Analyse	68
3.7	Statistische Analysen	69
3.8	Generative künstliche Intelligenz	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Charakterisierung von Makrophagen im GEAC	70
4.1.1	Patienten mit Barrett-Ösophagus und GEAC zeigen erhöhte Expression makrophagen-spezifischer Gene	70
4.1.2	GEAC-Patienten mit starker Expression makrophagen-spezifischer Gene zeigen Gensignaturen maligner Progression	73
4.1.3	Die GEAC-Krankheitsprogression korreliert mit der Menge von CD68+ und CD163+ Makrophagen	78
4.1.4	Eine starke CD68+ und CD163+ Makrophagen Infiltration korreliert mit einem reduziertem Gesamtüberleben von GEAC-Patienten	85
4.2	Einfluss von Makrophagen auf GEAC-Zellen	88
4.2.1	THP-1 Makrophagen fördern die Proliferation von GEAC-Zelllinien	88
4.2.2	Ki67 Proliferationsindex korreliert mit der Anzahl CD68+ und CD163+ Makrophagen in GEAC-Patienten	93
4.2.3	Makrophagen induzieren eine Resistenz gegenüber HER2 zielgerichteter Therapie in GEAC-Zellen	96
4.2.4	Makrophagen Kokultur induziert eine starke STAT3 und AKT Aktivierung in PT1590 und NCI-N87 Zellen	100
4.2.5	PT1590 zeigen Lapatinib Resistenz und STAT3 Aktivierung in Anwesenheit von primären Makrophagen	102
4.3	Einfluss der Makrophagen induzierten STAT3 Aktivierung auf HER2+ GEAC-Zellen	105
4.3.1	Inhibition der STAT3 Aktivierung erhöht das Ansprechen der HER2 Therapie in THP-1 kokultivierten PT1590 Zellen	105
4.4	Charakterisierung Makrophagen-sekretierter Faktoren und ihr Einfluss auf GEAC-Zellen	110
4.4.1	Sekretom-Analyse identifiziert differenziell regulierte Zytokine und Wachstumsfaktoren in THP-1 Makrophagen	110
4.4.2	PDGF-AA induziert Proliferation und vermittelt Lapatinib Resistenz in PT1590 Zellen	112
4.4.3	PDGF-AA induziert die Phosphorylierung von STAT3, AKT und ERK in PT1590 Zellen	118

4.4.4	Inhibition und Knockdown des PDGFR α vermindert die Makrophagen induzierte Proliferation und Lapatinib Resistenz	120
4.4.5	Neutralisierung des löslichen PDGF-AA sensibilisiert PT1590 Zellen gegenüber Lapatinib	127
4.4.6	THP-1 vermittelte AKT und ERK Aktivierung wird durch Inhibition und Knockdown des PDGFR α vermindert	129
4.5	Charakterisierung der STAT3 Signaltransduktion in GEAC-Patienten	132
4.5.1	STAT3 Aktivierung korreliert mit Infiltration CD68+ und CD163+ Makrophagen in GEAC-Patienten	132
4.5.2	p-STAT3/STAT3 Level korrelieren mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen	134
4.5.3	Das mediane Gesamtüberleben der GEAC-Patienten korreliert nicht mit der STAT3 Aktivierung	136
4.6	Charakterisierung der PDGF-AA/PDGFRα Signaltransduktion in GEAC-Patienten	138
4.6.1	Barrett-Ösophagus und GEAC-Patienten zeigen eine erhöhte Expression von PDGFA und PDGFRA	138
4.6.2	CD68+ Makrophagen exprimieren PDGFA und Expression korreliert mit makrophagen-assoziierten Genen in GEAC-Patienten . . .	139
4.6.3	PDGFR α Aktivierung korreliert mit der Menge an CD163+ Makrophagen	141
4.6.4	Membranöse PDGFR α Aktivierung ist mit einer Krankheitsprogression und einem schlechten Gesamtüberleben von GEAC-Patienten assoziiert	143
4.6.5	Erhöhte PDGF-AA Konzentration im Serum von GEAC-Patienten korrelieren mit Krankheitsprogression	150
5	Diskussion	155
5.1	Makrophagen als Progressionsfaktoren im GEAC	155
5.2	Makrophagen und das Tumorstroma als Treiber der Resistenz gegenüber HER2-gerichteten Therapien im GEAC	161
5.3	STAT3 als primärer Signalweg der Makrophagen vermittelten HER2-Therapieresistenz im GEAC	165
5.4	PDGF-AA/PDGFRα als zentraler Mechanismus der Makrophagen-induzierten GEAC-Progression und HER2-Therapieresistenz . . .	170
A	Anhang	i
A.1	Danksagung	i
A.2	Eidesstattliche Erklärung	ii

1. Einleitung

1.1 Das gastroösophageale Adenokarzinom (GEAC)

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Neoplasien der Speiseröhre zählen zu den acht häufigsten Tumorentitäten weltweit und stellen mit 500.000 Sterbefällen pro Jahr die sechshäufigste Ursache krebserkrankter Todesfälle dar. Bei einer Inzidenz mit ca. 570.000 Neuerkrankungen pro Jahr werden 3,2 % aller Krebsdiagnosen auf das Ösophaguskarzinom zurückgeführt [1, 2]. Darüber hinaus ist die Inzidenz nahezu übereinstimmend mit der Anzahl der Sterbefälle pro Jahr, was die hochgradige Letalität des Ösophaguskarzinoms verdeutlicht. In Deutschland erkrankten im Jahre 2018 5.710 Männer und 1.840 Frauen an einem Ösophaguskarzinom. Für das Jahr 2022 werden für Männer 6.300 und für Frauen 2.000 Neuerkrankungen prognostiziert [3]. Histologisch wird das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (ESCC) vom gastroösophagealen Adenokarzinom (GEAC) abgegrenzt. Obwohl das ESCC weltweit die höchste Inzidenz und Prävalenz aufweist, zeigt das GEAC mit einer Steigerungsrate von 3,5 % bis 8,1 % pro Jahr die stärkste Zunahme der Inzidenz unter allen soliden Krebserkrankungen in den westlichen Ländern [4, 5]. Die Inzidenz des GEAC ist in den westlichen Ländern höher als in den östlichen Ländern, wobei Männer etwa dreimal häufiger betroffen sind als Frauen. Das mediane Erkrankungsalter bei der Diagnosestellung liegt bei etwa 67 Jahren für Männer und 73 Jahren für Frauen. Mit 3340 neuen Fällen pro Jahr liegt die Inzidenz des GEAC in Deutschland aktuell bei 4,4 Fällen pro 100.000 Einwohner [6]. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik und der ausgeprägten biologischen Aggressivität des GEAC präsentieren sich mehr als 75 % der Patienten bei Diagnosestellung mit einer bereits fortgeschrittenen und systemischen Erkrankung. Für diese Patienten sind Therapieoptionen limitiert, mit fehlender Möglichkeit der operativen Resektion [7, 8]. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der insgesamt schlechten Prognose des GEAC wider. Denn obwohl das relative 5-Jahres-Überleben im Vergleich zu den Jahren 2001 - 2005 eine Verbesserung um 4,1 % zeigte, zählt das GEAC mit einer aktuellen 5-Jahres-Überlebensrate von 29 % zu den aggressivsten Neoplasien des Gastrointestinaltraktes [9, 10].

Aktuell sind nur wenige Risikofaktoren bekannt, die die Entwicklung eines GEAC begünstigen. Dabei entstehen mehr als 90 % der GEAC sporadisch, sodass nicht-genetische Risikofaktoren den größten Einfluss auf die Tumorentstehung haben. Die gastroösophageale Refluxerkrankung (GERD) ist der Risikofaktor, der am ausführlichsten untersucht

wurde und einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung und Progression des GEAC hat [11]. Dabei führt die GERD unbehandelt zu einer metaplastischen Umwandlung des mehrschichtigen Plattenepithels in ein hochprismatisches Epithel mit Becherzellen. Diese Metaplasie wird auch als Barrett-Ösophagus (BE) bezeichnet und gilt als prädisponierend für ein GEAC [12]. So zeigte sich bei steigender Inzidenz des BE in den letzten 30 Jahren eine gleichzeitige Zunahme der Inzidenz für das GEAC. Eine Sammlung aus retrospektiven Analysen demonstrierte, dass 6 % - 14 % der GERD-Patienten ein BE entwickeln. Von diesen BE-Patienten entwickeln 0,5 % - 1 % ein GEAC [11, 13]. Darüber hinaus wies eine populationsbasierte Fall-Kontroll-Studie ein 43,5-fach höheres Risiko für die Entstehung eines GEAC in Patienten mit starker und anhaltender Refluxsymptomatik nach [14]. Ein weiterer Risikofaktor, der gleichzeitig mit dem Auftreten einer GERD assoziiert ist, ist das Übergewicht. Jedoch konnte Übergewicht als Komponente des metabolischen Syndroms auch als ein unabhängiger Risikofaktor identifiziert werden [15, 16]. In einer systematischen Metaanalyse mehrerer prospektiver Studien wurde festgestellt, dass Übergewicht mit einem um etwa 50 % erhöhten Risiko für die Entwicklung eines GEAC einhergeht [17]. Allerdings zeigte eine große populationsbasierte Fall-Kontroll-Studie aus Dänemark, dass das metabolische Syndrom ein eindeutiger Risikofaktor für die Entwicklung eines BE, jedoch nicht für die Entwicklung eines GEAC ist [18, 19]. Darüber hinaus konnte Übergewicht zuletzt auch als Progressionsfaktor identifiziert werden. So erhöhte sich das Risiko einer neoplastischen Progression vom BE zum GEAC um 6 % pro 5 kg/m² Anstieg des BMI [20]. Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung eines GEAC ist das männliche Geschlecht. In umfangreichen Metaanalysen stellte sich für Männer ein um 46 % höheres Risiko dar, an einem GEAC zu erkranken, als für Frauen [21]. Darüber hinaus zeigten Ergebnisse einer Metaanalyse von individuellen Patientendaten, dass Frauen mit BE ein geringeres Risiko für eine neoplastische Progression aufweisen als Männer [22]. Rauchen und Alkoholkonsum führen als etablierte Risikofaktoren zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Krebserkrankungen. Trotz der stärkeren Assoziation von Rauchen und Alkoholkonsum mit dem ESCC wurde in mehreren Studien auch ein bis zu 3,4-fach bzw. 9,5-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines GEAC nachgewiesen [21, 23]. Weitere Risikofaktoren, die bisher nur unzureichend untersucht wurden, sind z. B. bariatrische Operationen, Veränderungen des Mikrobioms und bestimmte Ernährungsweisen [24, 25]. Als protektive Faktoren gelten neben den üblichen Empfehlungen wie dem Verzicht auf Rauchen, der Reduktion des Alkoholkonsums, einer gesunden Ernährungsweise und regelmäßiger körperlicher Aktivität auch die Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Dieser Zusammenhang konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Dabei ist eine Infektion mit *H. pylori* mit einer Risikoreduktion von bis zu 70 % für die Entwicklung eines GEAC assoziiert. Mögliche Erklärungen hierfür sind unter anderem die Entwicklung einer atrophischen Gastritis, die zu einer verminderten Magensäureproduktion und damit zu einer geringeren Prävalenz der GERD führt [26–32]. Genetische Risikofaktoren wie hereditäre Tumorsyndrome spielen bei der Entwicklung des GEAC nur eine

untergeordnete Rolle, allerdings werden ca. 7 % der GEAC-Fälle als familiär gehäuft eingestuft. Eine spezifisch genetische Prädisposition konnte bislang nicht identifiziert werden [33].

1.1.2 Pathologie und Pathogenese

Die Mukosa der Speiseröhre besteht histologisch wie der gesamte Gastrointestinaltrakt aus einem Epithel, der Lamina propria und der Lamina muscularis mucosae. Das Epithel des Ösophagus ist ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel, das mechanisch besonders widerstandsfähig ist und den Ösophagus vor Reibung und Verletzungen schützt [34]. Darüber hinaus finden sich mehrere unterschiedliche Zelltypen im Gewebe des Ösophagus. Prinzipiell könnte aus diesen vielen unterschiedlichen Zellen eine maligne Neoplasie hervorgehen. Neben Sarkomen, neuroendokrinen Neoplasien, Lymphomen oder Melanomen entfällt jedoch der weitaus größte Anteil der Ösophagus-Neoplasien auf das ESCC und GEAC. ESCC und GEAC unterscheiden sich grundlegend in ihrer Tumorbilogie und Pathogenese, insbesondere hinsichtlich des Zelltyps, aus dem sie hervorgehen. Das ESCC entsteht aus den mehrschichtigen Plattenepithelzellen der Ösophagusschleimhaut und tritt bevorzugt im zervikalen sowie im oberen und mittleren thorakalen Abschnitt der Speiseröhre auf. Im Gegensatz dazu entwickelt sich das GEAC aus drüsenartigen Epithelzellen, die vor allem im distalen Ösophagus und am gastroösophagealen Übergang zu finden sind [35]. In diesem Kapitel werden die Pathologie und die molekularen Mechanismen der Karzinogenese des GEAC detailliert dargestellt. Wie alle Neoplasien ist auch das GEAC eine genetische Erkrankung, die durch die Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen in Kombination mit einem Verlust der genomischen Integrität sowie langanhaltenden inflammatorischen Prozessen entsteht. Durch den wissenschaftlichen Fortschritt in der Genetik, Endoskopie, Chirurgie und Pathologie konnte in den letzten Jahren ein Progressionsmodell der Barrett-Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz beschrieben werden. Der Barrett-Ösophagus stellt die wichtigste Präkanzerose des GEAC dar. Dabei wird das mehrschichtige Plattenepithel der distalen Speiseröhre infolge chronischer GERD (vor allem durch wiederholte Exposition von Säuren und Gallensalzen) durch intestinal metaplastisches Zylinderepithel ersetzt. Dieses neugebildete Gewebe ist anfällig für neoplastische Veränderungen, aus denen sich intraepitheliale Neoplasien (IEN) und in weiterer Folge ein invasives Adenokarzinom entwickeln können [12]. Die IEN zeigen sowohl Architekturveränderungen als auch zytologische Atypien. Sie werden unterteilt in niedriggradige Dysplasien (LGIN) mit milden Atypien wie Hyperchromasie und unregelmäßigen Zellkernen und hochgradige Dysplasien (HGIN) mit ausgeprägten zytologischen Veränderungen wie Verlust der Zellpolarität, deutlicher Hyperchromasie und Anisonukleose. Dabei zeigen LGIN und HGIN ein jährliches Progressionsrisiko bis hin zum GEAC von 1,7 % bzw. 7 % [36, 37]. Insgesamt ist die mehrstufige neoplastische Transformation der Ösophagusschleimhaut gekennzeichnet durch entzündungsbedingte zelluläre Schädigungen, ge-

netische und epigenetische Veränderungen sowie Störungen molekularer Signalwege. Eine der ersten molekularen Veränderungen, die im Rahmen der metaplastischen Umwandlung des Plattenepithels beobachtet werden konnten, ist die erhöhte Expression der *CDX*-Gene (insbesondere *CDX2*). Diese Gene gehören zur Para-Homeobox-Familie und steuern unter physiologischen Bedingungen die Ausbildung des intestinalen Zylinderepithels im Dün- und Dickdarm. In der gesunden Ösophagusmukosa ist *CDX2* hingegen nicht exprimiert. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es bereits vor dem Auftreten der intestinalen Metaplasie im refluxverletzten Plattenepithel zu einer vermehrten *CDX2*-Expression kommt. Auch in humanen Biopsien von entzündetem Ösophagusgewebe wurde eine frühe *CDX2*-Expression nachgewiesen [38–41]. Eine weitere molekulare Veränderung, die mit der Barrett-Metaplasie assoziiert ist, ist eine Aktivierung des Sonic-Hedgehog- und Notch-Signalwegs. Beide Signalwege spielen insbesondere in den frühen Stadien der Metaplasie eine Rolle. Dabei sind sie sowohl an der Ausbildung des intestinalen Phänotyps als auch an der potenziellen malignen Transformation der Barrett-Mukosa beteiligt [41–45].

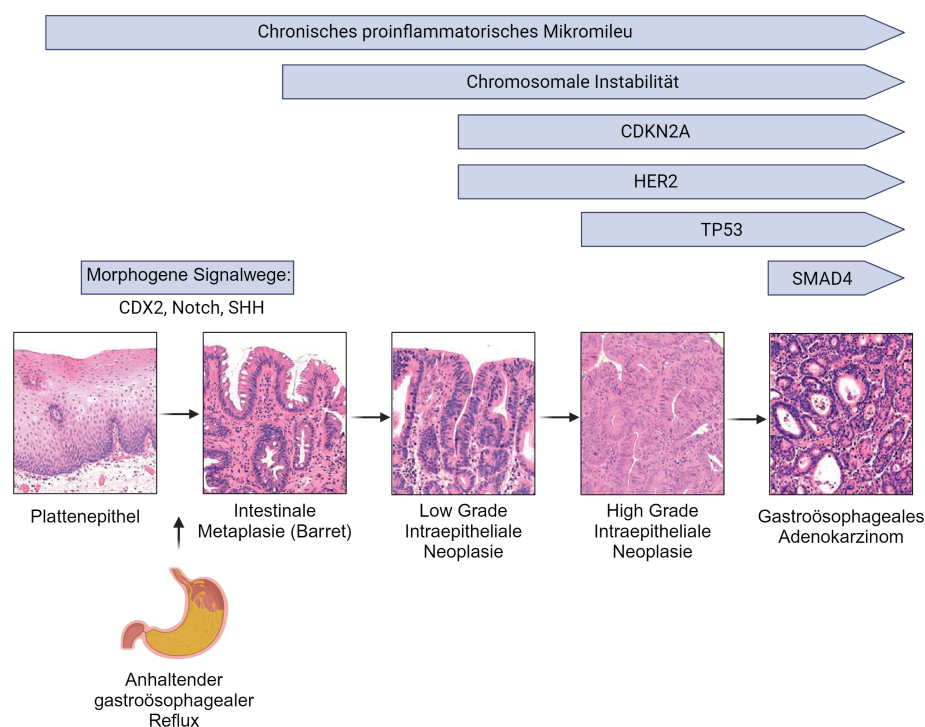


Abbildung 1: Barrett-Dysplasie-Karzinom-Sequenz: Durch den anhaltenden Reflux und das daraus resultierende chronisch proinflammatorische Mikromilieu kommt es durch die Aktivierung von morphogenen Signalwegen (CDX, Notch, SHH) zu einer intestinalen Metaplasie. Durch weitere Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen entwickelt sich aus der Metaplasie eine Low-Grade- und High-Grade-intraepitheliale Neoplasie bis hin zum invasiven gastroösophagealen Adenokarzinom (GEAC) (modifiziert nach [12])

Aktuell wird vermutet, dass der weitere Progress zur LGIN überwiegend durch das chronisch proinflammatorische Mikromilieu vermittelt wird. Die wiederholte Exposition gegenüber Refluxbestandteilen führt zu einer Schädigung des Ösophagusepithels mit Infiltration von Entzündungszellen. Diese eingewanderten Zellen können reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) freisetzen, die wiederum direkte DNA-Schäden verursachen können [46]. Bereits in frühen Stadien wurden chromosomale Instabilitäten und Veränderungen in der Kopienanzahl (Copy Number Alterations) beobachtet, welche die maligne Transformation der Barrett-Mukosa fördern [12, 47]. Zusätzlich führt die Infiltration von Entzündungszellen wie z. B. Makrophagen zu einer Aktivierung von onkogenen Signalwegen wie IL-6/STAT3 [48–50]. Der weitere Verlauf der GEAC-Karzinogenese wird durch die Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen vorangetrieben. Die häufigste molekulare Veränderung, die früh in der Karzinogenese zu beobachten ist, ist die genetische oder epigenetische Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *CDKN2A*. *CDKN2A* kodiert das Protein p16, welches durch die Inhibition von cyclinabhängigen Kinasen im Zellzyklus den Übergang in die S-Phase verhindert. So konnten Sequenzierungs- und Methylierungsanalysen zeigen, dass 82 % der GEAC, 30 % der Dysplasien und 33 % der Metaplasien einen Funktionsverlust von p16 entweder durch Mutation oder Promotormethylierung aufwiesen [51–53]. Ein weiteres zentrales Ereignis in der späteren Progression ist die Inaktivierung des Tumorsuppressors *TP53*. Diese genetische Alteration tritt überwiegend in der späten Phase der Progression auf, insbesondere in HGIN. Der Verlust von p53 führt zu einer Beeinträchtigung der genomischen Integrität und begünstigt die Akkumulation weiterer treibender Mutationen [54–57]. Im weiteren Verlauf, insbesondere in späteren Stadien der GEAC-Karzinogenese, treten Mutationen im TGF- β /SMAD-Signalweg auf. Eine zentrale Rolle spielen dabei die SMAD-Proteine, insbesondere SMAD2 und SMAD4, die als Transkriptionsfaktoren wirken. Dabei führt der Funktionsverlust der SMAD-Proteine zu einer Inaktivierung der initial tumorsuppressiven Wirkung des TGF- β /SMAD-Signalwegs. So konnte in genetischen Analysen eine *SMAD4*-Deletion oder -Mutation in ca. 10 % - 30 % der GEAC Fälle nachgewiesen werden [58–60]. Auch die Aktivierung von Onkogenen spielt in der GEAC-Karzinogenese eine Rolle. Besonders relevant sind Mitglieder der EGFR-Familie (Epidermal growth factor receptor), darunter vor allem der HER2-Rezeptor. Der HER2-Rezeptor ist bei bis zu zwei Dritteln der GEAC überexprimiert und korreliert mit einem fortgeschritteneren Krankheitsstadium. Die HER2-gerichtete Therapie ist aktuell fester Bestandteil der perioperativen und palliativen Behandlung des GEAC [61–63]. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass auch nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) wie microRNAs (miRNAs) eine bedeutende Rolle in der Tumorbilogie des GEAC spielen. So zeigte sich, dass die miRNAs miR-21, miR-196a, miR-192 und der miR-106b 25-Cluster mit der Progression und neoplastischen Transformation des GEAC assoziiert sind [12, 64, 65].

1.1.3 Diagnostik, Therapieoptionen und klinische Herausforderungen

Einer der wesentlichen Gründe für die schlechte klinische Prognose von GEAC-Patienten ist, dass die Krankheit typischerweise in einem lokal fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Dies liegt vor allem daran, dass das GEAC nur unspezifische Symptome verursacht. Eines der ersten Symptome, die von Patienten beschrieben werden, ist die Dysphagie. Initial bei fester Nahrung und wenn weiter fortgeschritten auch bei Flüssigkeiten. Im Verlauf kommen weitere Symptome hinzu, wie unklarer Gewichtsverlust, Schmerzen und Druckgefühl hinter dem Brustbein. Sind diese Symptome bereits aufgetreten, ist die Tumorerkrankung lokal weit fortgeschritten.

Tabelle 1.1: Klinische Klassifikation der GEAC nach der TNM-Klassifikation

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae (m) oder Submukosa (sm)
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Adventitia
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen
T4a	Tumor infiltriert Pleura, Perikard, V. azygos, Zwerchfell oder Peritoneum
T4b	Infiltration Nachbarstrukturen wie Aorta, Wirbelkörper oder Trachea
N- Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 – 2 Lymphknoten
N2	Metastasen in 3 – 6 Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M - Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1.2: Klinische Klassifikation der GEAC nach der UICC-Klassifikation

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Klinisches Stadium – Adenokarzinome			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T1	N1	M0
Stadium IIB	T2	N0	M0
Stadium III	T2,	N1	M0
	T3, T4a	N0, N1	M0
	T1-T4a	N2	M0
Stadium IVA	T4b	N0, N1, N2	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1
pathologisches Stadium – Adenokarzinome			
Stadium IA	pT1a	pN0	M0
Stadium IB	pT1b	pN0	M0
Stadium IIA	pT2	pN0	M0
Stadium IIB	pT1a, pT1b	pN1	M0
Stadium IIIA	pT1	pN2	M0
	pT2	pN1, pN2	M0
	pT3, pT4a	pN0	M0
Stadium IIIB	pT2	pN2	M0
	pT3	pN1, pN2	M0
	pT4a	pN1	M0
Stadium IVA	pT4a	pN2	M0
	pT4b	Jedes pN	M0
	Jedes pT	pN3	M0
Stadium IVB	Jedes pT	Jedes pN	M1

Lokal begrenzte Befunde werden in den meisten Fällen als Zufallsbefund detektiert. In diesem Stadium haben die Patienten in der Regel gar keine Symptome. Wird die Diagnose eines GEAC gestellt, richtet sich die Planung der weiteren Therapie nach der Stadieneinteilung durch die TNM-Klassifikation (T = Tumor, N = Nodus, M = Metastasen) (**Tab 1**). Für die Festlegung der TNM-Klassifikation sind zunächst umfassende Staging-Untersuchungen notwendig, insbesondere ein endoskopischer Ultraschall sowie eine Computertomographie des Halses, des Thorax und des Abdomens. Darüber hinaus sind noch weitere histopathologische Informationen entscheidend für die Therapieplanung. Hier sollte zunächst der Differenzierungsgrad (Grading) nach der aktuellen WHO-Klassifikation bestimmt werden. Zusätzlich sollte die maximale Infiltrationstiefe do-

kumentiert werden: pT1a (m1, m2, m3, m4) bzw. pT1b (sm1, sm2, sm3) unter Angabe der Infiltrationstiefe in Mikrometern. Darüber hinaus ist das Vorliegen einer Lymphgefäß- und/oder Veneninvasion (L0 vs. L1 bzw. V0 vs. V1) zu erfassen. Auf dieser Grundlage erfolgt eine zusammenfassende Einschätzung des Lymphknotenmetastasierungsrisikos (Low Risk vs. High Risk). Mit Hilfe dieser Informationen kann ein Therapiekonzept festgelegt werden. Lokal begrenzte Befunde mit oberflächlicher Submukosainfiltration ohne Risikokriterien (pT1b sm1) mit einer Tiefeninvasion von weniger als 500 µm, fehlender Lymph- und Veneninvasion (L0, V0), guter bis mäßiger Differenzierung (G1/2) und einer Tumorgroße unter 20 mm sowie ohne Nachweis einer Ulzeration können mittels endoskopischer Resektion reseziert werden. Eine operative Ösophagusresektion sollte in Erwägung gezogen werden, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist: Ein Tumorstadium $\geq$ pT2, das Vorliegen einer Lymphgefäßinvasion (L1) oder Veneninvasion (V1), ein schlechter Differenzierungsgrad ($\geq$ G3), eine tiefe Submukosainfiltration von 500 µm oder mehr oder ein Tumorrest am basalen Resektionsrand (R1). Dabei unterscheidet sich die Operationstechnik je nach Lokalisation des Primärtumors. Um eine kurativ intendierte Therapie zu gewährleisten, wird unabhängig von der Operationstechnik eine Lymphadenektomie und eine Resektion mit einem Sicherheitsabstand von 2–4 cm durchgeführt. Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen GEAC (Tumorstadium T3/T4 oder cN1-3) ohne Nachweis einer Fernmetastasierung empfiehlt die aktuelle Leitlinie die Durchführung einer perioperativen Chemotherapie oder neoadjuvanten Radiochemotherapie [66]. Für das GEAC wird am häufigsten gemäß der FLOT4-Studie die perioperative Chemotherapie FLOT (5-Fluoruracil (5-FU)), Leucovorin, Oxaliplatin, Docetaxel) eingesetzt [67]. Wenn das Karzinom im proximalen Ösophagus lokalisiert ist oder absehbar ist, dass eine perioperative Chemotherapie nicht toleriert wird, stellt die neoadjuvante Radiochemotherapie gemäß der CROSS-Studie eine geeignete Behandlungsoption dar [68]. In den letzten Jahren hat die Immuntherapie auch in der perioperativen Behandlung des GEAC zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die KEYNOTE-585-Studie zeigte, dass die Kombination des PD-1-Antikörpers Pembrolizumab mit einer FLOT-Chemotherapie zu höheren pathologischen Ansprechraten führte, jedoch keinen signifikanten Vorteil im progressionsfreien Überleben (PFS) erbrachte [69]. Dagegen konnte die MATTERHORN-Studie durch die Zugabe des PD-L1-Antikörpers Durvalumab zu FLOT eine signifikante Verbesserung des ereignisfreien Überlebens (EFS) nachweisen. Endgültige Daten zu den sekundären Endpunkten PFS und Gesamtüberleben stehen allerdings noch aus, sodass derzeit keine klaren Empfehlungen für eine ergänzende Immuntherapie im perioperativen Setting gemacht werden können [70]. In der palliativen Systemtherapie des GEAC ist der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren hingegen mittlerweile fester Therapiestandard. Für die GEAC-Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose oder im Verlauf eine systemische Erkrankung mit dem Nachweis von Fernmetastasen aufweisen, wird eine palliative Systemtherapie eingeleitet. Für die Auswahl der geeigneten Therapie sind die histopathologischen Prädiktoren CPS (kombinierter positiver Score) und HER2 zu erheben. Der CPS

ist ein immunhistologischer Biomarker zur Bestimmung der PD-L1-Expression zur Einschätzung des potenziellen Nutzens einer PD-1/PD-L1-Immuneckpoint-Inhibition. So empfiehlt die aktuelle Leitlinie als Erstlinientherapie ab einem CPS von ≥ 5 den Einsatz eines Immuneckpoint-Inhibitors zu einer Platin- und Fluoropyrimidinhaltigen (Cisplatin + 5-FU) Chemotherapie. Zeigt sich in der Histologie eine Überexpression des HER2-Rezeptors, wird eine zielgerichtete Therapie mit dem Anti-HER2-Antikörper Trastuzumab in Kombination mit einer Cisplatin-/Fluoropyrimidin-Chemotherapie durchgeführt. Hier zeigte die ToGA-Studie, dass die Ergänzung des HER2-Antikörpers Trastuzumab zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens und des PFS bei Patienten mit HER2-positiven GEAC führte [63]. Bei einem CPS ≤ 5 und fehlendem Nachweis des HER2-Rezeptors wird als Erstlinientherapie eine Platin- und Fluoropyrimid-haltige (Capecitabine + Oxaliplatin (CAPOX)) palliative Systemtherapie durchgeführt [66].

In der palliativen Systemtherapie stellt die Therapieresistenz ein zentrales Problem dar. Während ein Teil der Patienten primär nicht anspricht, entsteht der deutlich größere Anteil der Resistenz im Krankheitsverlauf nach initialer Krankheitskontrolle. Dabei entwickeln fast alle Patienten eine Resistenz gegenüber der Erstlinientherapie innerhalb eines Jahres. Für die Patienten, die eine alleinige Platin- und Fluoropyrimid-haltige Therapie erhalten, zeigte sich in 15 – 30 % der Fälle ein Progress in der ersten radiologischen Beurteilung und somit eine primäre Therapieresistenz. Dabei betrug das mediane PFS nur 5-7 Monate mit einer initialen objektiven Ansprechrate von 30–45 %, somit entwickelt die Mehrzahl der Patienten eine sekundäre Resistenz gegenüber der Erstlinientherapie CAPOX [71, 72]. Auch die Immuntherapie ist mit der Entwicklung von Therapieresistenzen konfrontiert. Dabei zeigte die KEYNOTE-590-Studie, dass 45 % der ESCC/GEAC-Patienten mit einem CPS-Score von > 10 auf die kombinierte Therapie mit Pembrolizumab und einer Platin- und Fluoropyrimid-haltigen Therapie primär ansprechen. Hierbei stellte sich eine PFS von 7,5 Monaten dar. Für Patienten mit einem CPS > 1 und < 10 waren die objektive Ansprechrate und das PFS nochmal deutlich geringer, sodass auch hier von einem hohen Anteil an Primär- und Sekundärresistenzen ausgegangen werden muss [73]. Zeigt der Patient eine Überexpression des HER2-Rezeptors, wird auch in der palliativen Systemtherapie der Anti-HER2-Antikörper Trastuzumab eingesetzt. Diese Therapie ist ebenfalls mit erheblichen Resistenzen verbunden und stellt eine große klinische Herausforderung dar.

1.1.4 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) als therapeutisches Ziel im GEAC

Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2/ERBB2) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR). Diese Familie umfasst die Rezeptoren EGFR, HER2, HER3 und HER4. Alle diese Rezeptoren sind Transmembranrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität. Das *ERBB2*-Gen liegt auf Chromosom 17q21 und kodiert für ein etwa 185 kDa großes Protein, welches strukturell aus drei Hauptdomänen besteht: Einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einfachen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne [74].

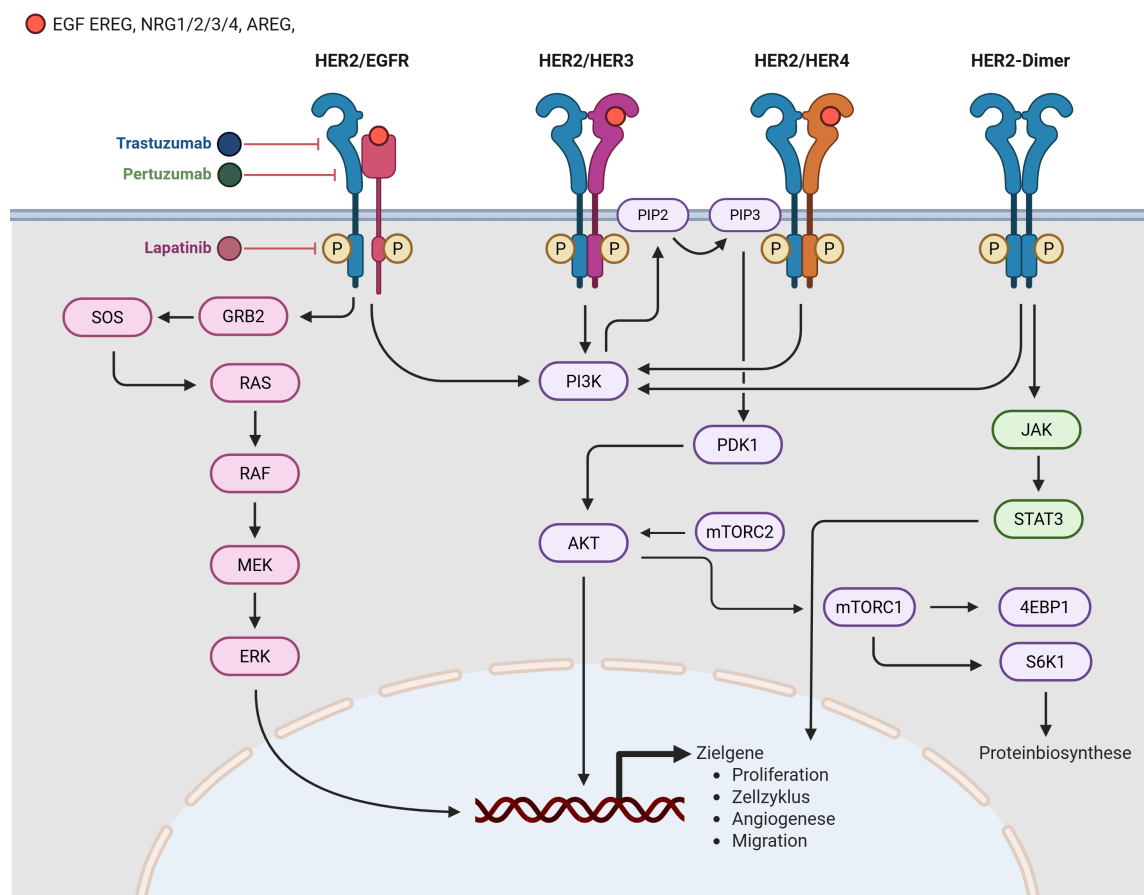


Abbildung 2: Signaltransduktionskaskaden der EGFR/HER2-Rezeptoren: Schematische Darstellung der HER2-Rezeptor-Aktivierung mit den nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden RAS/MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT3. Aufgrund des Fehlens eines eigenen Liganden fungiert HER2 als ligandenunabhängiger, bevorzugter Dimerisierungspartner der übrigen HER-Rezeptoren. Die Dimerisierung der Rezeptor resultiert in eine Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Diese führt letztendlich zur Aktivierung der Signalproteine RAS, PI3K, oder JAK. Die Aktivierung dieser Signalwege führt zur Transkription von Genen, die die Proliferation, die Angiogenese, die Migration und den Zellzyklus beeinflussen. Trastuzumab und Pertuzumab inhibieren vor allem durch Bindung an eine extrazelluläre Domäne die Dimerisierung der Rezeptoren. Lapatinib hemmt die intrazelluläre-Tyrosinkinase-Domäne. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [75])

Im Vergleich zu den anderen EGFR-Rezeptoren hat HER2 selbst keinen eigenen endogenen Liganden. Stattdessen bildet HER2 mit den anderen Mitgliedern der EGFR-Familie Heterodimere. Alle Mitglieder der EGFR-Familie sind an Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Angiogenese oder Migration beteiligt. Bindet ein Ligand beispielsweise an den HER3-Rezeptor, dimerisiert dieser mit dem HER2-Rezeptor und die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne wird autophosphoryliert mit anschließender Aktivierung nachgeschalteter Signalwege wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)-Signalweg, dem Rat Sarcoma/Mitogen-Activated Protein Kinase (RAS/MAPK)-Signalweg oder dem Januskinase/STAT3 (JAK/STAT)-Signalweg [75, 76]. Durch die Phosphorylierung der Tyrosinkinase-Domäne der HER2/HER3- oder HER2/EGFR-Heterodimere entstehen SH2-Domänen, die Andockstellen für die Signalproteine Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2), PI3K oder JAK darstellen. Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs wird durch die Phosphorylierung und Aktivierung von PI3K initiiert. Aktiviertes PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Zellmembran zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). PIP₃ dient als Lipidanker für Proteine mit einer PH-Domäne wie die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) und AKT. Dabei rekrutiert PIP₃ PDK1 und AKT an die Zellmembran und PDK1 phosphoryliert das Threonin-308-Residuum von AKT. Eine zweite Phosphorylierung durch mechanistic Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) am Serin 473 aktiviert AKT vollständig. AKT selbst kann wiederum weitere Signalproteine aktivieren, wie den mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC 1), welcher die Proteinbiosynthese steigert [77, 78]. Zusätzlich kann AKT viele weitere zelluläre Prozesse beeinflussen, wie die Aktivierung von Cyclin D1, wodurch die G1-S-Phasen-Progression und die Inaktivierung proapoptotischer Proteine wie Bcl-2-associated death promoter (BAD) oder Caspase 9 [79]. Ein weiterer wichtiger Signalweg, der durch die HER2-Rezeptoren aktiviert wird, ist der RAS/MAPK-Signalweg. Dieser wird durch die Bindung von Grb2 an die SH2-Domäne der phosphorylierten Tyrosinkinase-Domäne des HER2-Rezeptors initiiert. Dadurch wird der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Son of Sevenless (SOS) an Grb2 gekoppelt und rekrutiert das kleine GTP-bindende Protein RAS. Hier vermittelt SOS den Austausch von GDP gegen GTP an RAS, welches daraufhin aktiviert wird [80, 81]. Das aktivierte RAS bindet und aktiviert wiederum die RAF-Kinasen, welche anschließend die Kinasen MEK und ERK aktivieren. Aktiviertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern, phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von Genen wie Cyclin D1 fördern, welche wiederum die Zellproliferation fördern [82, 83]. Auch der JAK/STAT3-Signalweg kann, wenn auch nicht vorwiegend, durch HER2-Rezeptoren aktiviert werden. Dabei binden die JAK an die Tyrosinkinase-Domäne des HER2-Rezeptors und gelangen dadurch in räumliche Nähe und phosphorylieren sich gegenseitig an Tyrosinresten. Anschließend bindet STAT3 über SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine der JAK und es kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3. Phosphoryliertes STAT3 bildet Homodimere (STAT3-STAT3) oder Heterodimere (z. B. STAT3-STAT1)

und transloziert in den Zellkern und fungiert selbst als Transkriptionsfaktor und induziert die Expression von Genen, die insbesondere an der Apoptose, der Proliferation, der Invasion und Migration und der Immunmodulation beteiligt sind [84–86]. Bei Tumorerkrankungen wie dem Mammakarzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom oder Bronchialkarzinom ist eine HER2-Überexpression oder HER2-Genamplifikation häufig zu beobachten. Diese Überexpression kann letztendlich auch zu einer ligandenunabhängigen HER2-Rezeptor-Homodimerisierung führen und dadurch vermehrt die oben beschriebenen Signalwege aktivieren. Durch diese Signalwege kontrolliert HER2 eine Vielzahl biologischer Prozesse und kann bei übermäßiger oder aberranter Aktivität zu maligner Transformation führen [76]. Die HER2-Genamplifikation wurde erstmals Anfang der 1980er-Jahre im Mammakarzinom beschrieben [87, 88]. In den folgenden Jahren belegten zahlreiche umfangreiche Studien die zentrale Rolle des HER2-Rezeptors in der Karzinogenese, was die Entwicklung einer der ersten zielgerichteten Krebstherapien ermöglichte. Die Überexpression des HER2-Rezeptors zeigt sich in ca. 20 - 30 % aller Mammakarzinome. Diese Tumoren zeigen einen aggressiveren Verlauf und ein erhöhtes Rezidivrisiko im Vergleich zu HER2-negativen Mammakarzinomen. Seitdem gilt der HER2-Status als zentraler prognostischer und prädiktiver Marker beim Mammakarzinom [89]. So führte die Entdeckung der HER2-Überexpression zur Entwicklung zielgerichteter monoklonaler Antikörper und TKI, die die HER2-vermittelte Signaltransduktion gezielt hemmen [90]. Zu den wichtigsten Substanzen gehören: Trastuzumab, Pertuzumab, Ado-Trastuzumab-Emtansin, Lapatinib, Neratinib und Afatinib. Trastuzumab hemmt die Funktion des HER2-Rezeptors durch Bindung an der extrazellulären Subdomäne IV. Hierdurch stabilisiert Trastuzumab den Rezeptor in einer nicht-dimerisierenden Konformation und hemmt so die HER2-Homodimerisierung. Zusätzlich fördert Trastuzumab die Rezeptorinternalisierung und -degradation sowie die Induktion einer „antibody-dependent cellular cytotoxicity“ (ADCC). Insgesamt führen diese Mechanismen zur verminderten Aktivität der nachgeschalteten Signalwege PI3K/AKT und RAS/MAPK [91]. Der duale TKI Lapatinib hemmt die intrazellulären Kinasedomänen des HER2- und EGFR-Rezeptors. In der Regel führt die Homo- und Heterodimerisierung der HER2- und EGFR-Rezeptoren zur Aktivierung einer intrazellulären ATP-Bindungsstelle mit anschließender Autophosphorylierung von Tyrosinresten und Rekrutierung von Adapterproteinen (z. B. Grb2, PI3K). Lapatinib bindet kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinasedomäne von HER2 und EGFR. Dadurch wird die Phosphorylierung der Tyrosinreste verhindert und die nachgeschaltete Signaltransduktion blockiert [92]. Die Einführung dieser HER2-gerichteten Therapien hat die Überlebensraten der Mammakarzinom-Patienten signifikant verbessert. So zeigte die multizentrische randomisierte Phase-III-Studie, dass durch die Ergänzung der Chemotherapie mit Trastuzumab die krankheitsfreie Überlebensrate von ungefähr 75 % auf 84 % nach 5 Jahren erhöht wurde [93]. Mittlerweile konnte durch große Metaanalysen demonstriert werden, dass mit adjuvanter Trastuzumab-Therapie das Sterberisiko der Mammakarzinompatienten um 44 % reduziert werden konnte [94]. Erste Untersuchungen, die eine HER2-Überexpression

im GEAC nachweisen konnten, wurden Ende der 1980er-Jahre durchgeführt. Neuere Studien konnten bestätigen, dass ca. 30 % der GEAC eine HER2-Überexpression aufweisen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der HER2-Expression beim GEAC und dem Mammakarzinom besteht in der ausgeprägten Heterogenität der HER2-Expression im GEAC. Während beim Mammakarzinom in der Regel eine homogene und vollständig membranäre IHC-Färbung des HER2-Rezeptors beobachtet wird, zeigt das GEAC häufig heterogene Expressionsmuster mit fokal begrenzter oder unvollständiger basolateraler Membranfärbung. Diese heterogene Verteilung des HER2-Rezeptors ist einer der Gründe, warum weiterhin Uneinigkeit über die prognostische Relevanz der HER2-Überexpression im GEAC besteht. Viele Studien zeigten, dass die HER2-Überexpression mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert und mit einem erhöhten Sterberisiko assoziiert ist. Andere Autoren konnten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen HER2-Status und Prognose feststellen, sodass die prognostische Bedeutung von HER2 beim GEAC weiterhin kontrovers diskutiert wird [95]. Nichtsdestotrotz führte der Nachweis der HER2-Überexpression zur Einführung einer HER2-zielgerichteten Therapie im GEAC. Dabei ist Trastuzumab als Erstlinientherapie in Kombination mit einer Platin- und Fluoropyrimidinhaltigen Chemotherapie als palliative Systemtherapie für Patienten mit einem HER2-positiven und metastasierten oder lokal fortgeschrittenen, nicht kurativ behandelbaren GEAC zugelassen. Wie bereits oben beschrieben, demonstrierte die multizentrische Phase-III-Studie ToGA eine signifikante Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens um 2,7 Monate durch die zusätzliche Gabe von Trastuzumab zur Standard-Chemotherapie. Für den Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Lapatinib konnte die TRIO-013/LOGiC-Studie zwar einen numerischen Vorteil im medianen Gesamtüberleben (12,2 vs. 10,5 Monate) und PFS zeigen, aber dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant [63]. Lapatinib zeigte als Monotherapie lediglich eine objektive Ansprechrates von 9 %. In Kombination mit CAPOX konnte die Ansprechrates jedoch auf 53 % gesteigert werden und lag damit deutlich über der alleinigen Therapie mit CAPOX (39 %). Insgesamt erwies sich die Hinzunahme von Lapatinib als nicht ausreichend wirksam, um einen signifikanten Überlebensvorteil zu erzielen. Dabei zeigt insbesondere die niedrige Ansprechrates von Lapatinib, dass ein erheblicher Teil der GEAC-Tumore eine intrinsische Therapieresistenz aufweist. Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen könnte neue therapeutische Strategien ermöglichen und die Behandlung von GEAC-Patienten verbessern.

1.2 Therapieresistenzen in soliden Tumoren

Eine wesentliche klinische Herausforderung in der Behandlung von Tumorerkrankungen ist das Auftreten von Therapieresistenzen. Dabei beschreibt die Therapieresistenz die Unempfindlichkeit oder mangelnde Ansprechbarkeit von Tumorzellen auf eine oder mehrere therapeutische Maßnahmen, wie Chemotherapie, Strahlentherapie, zielgerichtete Therapien oder Immuntherapien. Diese Resistenz tritt entweder schon vor Beginn der Therapie auf (primäre Resistenz) oder nach initialem Therapieerfolg (sekundäre Resistenz) und führt zu einer deutlich schlechteren Prognose für die Patienten [96]. In diesem Kapitel werden die verschiedenen Mechanismen von Therapieresistenzen bei Tumoren dargestellt, darunter intrinsische und erworbene Resistenzmechanismen. Darüber hinaus wird die Rolle der Tumormikroumgebung, der Tumorerheterogenität sowie der Tumoplastizität im Rahmen der Therapieresistenz diskutiert.

1.2.1 Primäre Therapieresistenz

Die primäre Therapieresistenz oder intrinsische Resistenz wird durch endogene Faktoren vermittelt, die in Tumorzellen oder -geweben bereits vor Einleitung der Therapie vorhanden sind. Diese Faktoren verschaffen den Krebszellen Überlebensvorteile und eine Anpassungsfähigkeit an den primären therapeutischen Stress. Hier werden vor allem genetische und nichtgenetische Ursachen differenziert.

Genetische Ursachen: Eine zentrale Ursache einer bereits vorbestehenden Resistenz gegenüber Chemotherapien, aber auch gegenüber zielgerichteten Therapien und Immuntherapien sind genetische Veränderungen. Dabei können Mutationen in Genen auftreten, die die Wirkung von Medikamenten von Beginn an blockieren. Bereits vor 30 Jahren zeigten Studien zu Mutationen im *TP53*-Gen erste Hinweise, dass bestehende genetische Veränderungen der Tumorzellen zu einem geringeren Ansprechen gegenüber Chemotherapien führen. Nachdem erste Studien lediglich eine Korrelation zwischen einer *TP53*-Mutation und einem verringerten Ansprechen auf Chemotherapien wie Doxorubicin demonstrieren [97, 98], konnten Chin *et al.*, erstmals zeigen, dass p53 als Tumorsuppressor die Expression von Multi-Drug-Resistance-(MDR-)Proteinen wie dem ATP-Binding-Cassette-Transporter B1 (*ABCB1*) reguliert. So führt ein p53-Funktionsverlust zu einer deutlichen Überexpression des *ABCB1*-Gens [99, 100]. MDR-Proteine sind Transmembranproteine, die ATP-abhängig aktiv Chemotherapeutika aus der Zelle hinaus transportieren können und somit die intrazelluläre Akkumulation der Zytostatika deutlich reduzieren [101, 102]. Darüber hinaus kann eine Mutation im *TP53*-Gen zu einer fehlenden Apoptoseinduktion führen. Die meisten chemotherapeutischen Wirkstoffe verursachen DNA-Schäden oder Replikationsstress, die über eine p53-abhängige Aktivierung proapoptotischer Signale wie Bcl-2-assoziierten X-Proteins (BAX) oder BH3-interagierenden Domänen-

Todesagonisten (BID) die Apoptose auslösen [103, 104]. So kann der p53-Verlust zu einem Überleben der Tumorzellen führen, trotz massiver DNA-Schäden [105]. Eine weitere Mutation, die primär zu einer Chemotherapieresistenz führt, ist eine genetische Deletion von Phosphatase and Tensin Homolog deleted on chromosome 10 (PTEN). PTEN reguliert die Aktivität des PI3K/AKT-Signalwegs durch die Dephosphorylierung von PIP3 mit konsekutiver Überaktivierung von AKT [106, 107]. Zahlreiche Studien belegen, dass die Überaktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs eine primäre Resistenz gegenüber Platin-derivaten (z. B. Cisplatin, Oxaliplatin), Antimetaboliten (z. B. 5-FU), Topoisomerase-Hemmern (z. B. Etoposid, Doxorubicin) sowie Mikrotubuli-Inhibitoren (z. B. Paclitaxel) vermittelt [108–115]. Dabei konnte eine PTEN-Deletion bereits in vielen Krebsentitäten wie dem Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Bronchialkarzinom und Glioblastom nachgewiesen werden [116]. Neben der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika kann der PTEN-Verlust und die damit verbundene AKT-Überaktivierung auch die Effektivität zielgerichteter Therapien wie der EGFR-TKIs Erlotinib und Gefitinib verringern [117–120]. Weitere Mutationen, die insbesondere die Wirksamkeit zielgerichteter Therapien beeinflussen, betreffen Gene des nachgeschalteten EGFR-Signalwegs. Eine der ersten Mutationen, die in diesem Kontext identifiziert wurden, ist die aktivierende Mutation des Onkogens Kirsten-Rat-Sarkom-Virus (KRAS). Das KRAS-Protein gehört zur RAS-Familie kleiner GTP-bindender Proteine und ist Teil der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade. Die Aktivierung des Rezeptor-Tyrosinkinase-Signals (z. B. EGFR, FGFR, HER2) induziert die Aktivierung des KRAS-Proteins, indem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) den Austausch von GDP gegen GTP katalysieren. Die Mutationen des KRAS-Proteins verhindern die GTP-Hydrolyse und das KRAS-Protein bleibt dauerhaft aktiv mit konstitutiver Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege, auch ohne Ligandenbindung an EGFR oder andere Rezeptoren. Typischerweise treten Punktmutationen an den Codons 12, 13 oder 61 (G12D, G12V, G13D, Q61R) auf und führen damit zu einer primären Resistenz gegen die EGFR-Antikörper Cetuximab, Panitumumab und Necitumumab [121–124]. Eine weitere bekannte Mutation im RAS-Signalweg ist die BRAF-V600E-Punktmutation, die ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung der RAS-RAF-MEK-ERK-Signalkaskade führt und somit eine vergleichbare Primärresistenz vermittelt [125, 126]. Neben den klassischen Chemotherapien und den zielgerichteten Therapien sind auch Immuntherapien von primären Therapieresistenzen betroffen. Die Immuntherapie beschreibt eine Behandlungsstrategie, bei der das körpereigene Immunsystem gezielt aktiviert wird, um Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. In der Regel exprimieren Tumorzellen tumorassoziierte Neoantigene, die von zytotoxischen T-Zellen über MHC-I-Moleküle erkannt werden. Gleichzeitig können Tumorzellen jedoch co-inhibitorische Rezeptoren und Liganden wie Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) exprimieren, die an den PD-1-Rezeptor auf T-Zellen binden, deren Aktivität hemmen und zu einer T-Zell-Erschöpfung führen [127, 128]. Durch Mutationen im β 2-Mikroglobulin, einer funktionellen Untereinheit des MHC-I-Komplexes, kann keine stabile Antigenpräsentation erfolgen, sodass tumorassoziierte Neoantigene

den zytotoxischen T-Zellen nicht mehr präsentiert werden. In der Folge entziehen sich die Tumorzellen der immunologischen Erkennung und sind dadurch primär gegenüber Immuntherapien resistent [129]. Eine weitere Mutation, die zu einer intrinsischen Resistenz gegenüber Immuncheckpoint-Inhibitoren führt, betrifft die Gene *JAK1* und *JAK2*. Durch den Funktionsverlust dieser Signalproteine verlieren Tumorzellen die Fähigkeit, als Antwort auf Interferon- γ PD-L1 zu exprimieren. Dadurch entfällt der immunregulatorische Angriffspunkt und die Immuntherapie bleibt wirkungslos [130]. Neben diesen genetischen Ursachen für eine primäre Therapieresistenz existieren noch weitere nicht-genetische Ursachen.

Nichtgenetische Ursachen Einer der am häufigsten vorkommenden nichtgenetischen Gründe für eine primäre Therapieresistenz gegenüber Chemotherapien, zielgerichteten Therapien und Immuntherapien sind epigenetische Veränderungen des Genoms. Die Epigenetik beschreibt Modifikationen der Genexpression ohne Veränderungen der DNA-Sequenz [131]. Epigenetische Mechanismen sind dynamisch und reversibel. Sie umfassen DNA-Methylierungen (z. B. an CpG-Inseln), Histon-Modifikationen (z. B. Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung), Chromatin-Remodelling (Veränderungen der Nukleosomenstruktur) und ncRNAs (z. B. miRNAs, lncRNAs). Diese epigenetischen Mechanismen können das Ansprechen auf Therapien in vielfältiger Weise beeinflussen [132]. So zeigte sich beispielsweise, dass die Methylierung der Promotorregion des Enzyms O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) zu einem besseren Ansprechen auf eine Therapie mit Temozolomid führt. Temozolomid gehört zur Gruppe der Alkylanzien und alkyliert bzw. methyliert die DNA von Tumorzellen an bestimmten Stellen. Infolgedessen ist die Replikation der Tumorzellen gestört, was letztlich zur Apoptose führt. Diese Veränderungen der DNA können jedoch durch bestimmte Enzyme wie MGMT wieder repariert werden. In den meisten Fällen ist die Promotorregion des MGMT-Gens methyliert, wodurch die Genexpression von MGMT reduziert ist. Kommt es jedoch zu einer DNA-Demethylierung der MGMT-Promotorregion, zeigen Tumoren eine erhöhte MGMT-Aktivität und sind primär resistent gegenüber Alkylantien wie Temozolomid [133–135]. Neben der Demethylierung von bestimmten Promotorregionen kann auch eine Hypermethylierung das Ansprechen auf Therapien beeinflussen. So zeigte sich, dass die Hypermethylierung des Promotors des DNA-Mismatch-Reparaturproteins 1 (MLH1) eine Resistenz gegenüber Cisplatin und 5-FU vermittelt. Die Schädigung der DNA durch alkylierende Zytostatika wird unter anderem durch DNA-Reparaturenzyme des Mismatch-Reparatur-Systems (MMR) detektiert wodurch die betroffenen Zellen normalerweise eliminiert werden. Durch die Hypermethylierung werden diese Enzyme nicht in ausreichender Menge exprimiert und die Tumorzellen überleben die Chemotherapie [136–138]. Auch die Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien kann epigenetische Ursachen haben. So führt die Histon-Deacetylierung der Promotorregion des pro-apoptotischen Proteins Bcl2-interacting mediator of cell death (BIM) aufgrund der daraus resultierenden fehlenden proapoptotischen Antwort zu einer

Resistenz gegenüber den EGFR-TKI Gefitinib und Erlotinib [139–141]. Darüber hinaus können ncRNA die Expression bestimmter Gene so beeinflussen, dass hierdurch Therapieresistenzen entstehen. So zeigte sich, dass die miRNAs miR-221/222 und miR-30b/c die mRNA des Apoptose-auslösenden Faktors 1 (APAF-1) degradieren können und dadurch die Bildung des Apoptosoms verhindert wird. Dieser Protein-Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion der intrinsischen Apoptose, die als Folge einer Behandlung mit TKI wie Gefitinib oder auch nach Chemotherapien mit Cisplatin und 5-FU ausgelöst wird [142–144].

Neben epigenetischen Ursachen für eine primäre Therapieresistenz können Tumorzellen auch durch eine initial bereits bestehende hohe Expression von Genen charakterisiert sein, die eine Therapieresistenz vermitteln. Hier spielen die bereits oben genannten MDR-Proteine eine zentrale Rolle. Diese ATP-getriebenen Effluxpumpen können Chemotherapeutika und viele TKI aktiv aus der Zelle hinausbefördern und somit das initiale Ansprechen auf Therapien deutlich reduzieren [145–147]. Weitere nichtgenetische Ursachen einer primären Therapieresistenz können auch durch eine unzureichende Penetration der Medikamente in das Tumorgewebe erklärt werden. Dabei kann die erhöhte Steifigkeit der tumorassoziierten extrazellären Matrix (EZM) die Tumorzellen vor Wirkstoffen schützen [148, 149]. Neben der EZM können auch zelluläre Bestandteile der Tumormikroumgebung eine physikalische Barriere schaffen. So zeigte sich, dass tumorassoziierte Fibroblasten (TAFs) durch die Freisetzung von EZM-Molekülen und selbst durch die Einkapselung des Tumors eine physikalische Barriere bilden und dadurch die Chemotherapie nicht in das Tumorgewebe eindringen kann [150]. Weitere Veränderungen des Mikromilieus können ebenfalls die Effektivität bestimmter Substanzklassen beeinflussen. So sind hypoxische Tumoreale primär unempfindlich gegenüber Strahlen- und Chemotherapie. In der Regel verursacht die Strahlentherapie DNA-Schäden durch die Bildung von ROS. Darüber hinaus kann Sauerstoff diese DNA-Schäden durch die Bildung stabiler Peroxide fixieren. Dadurch sind die Zellen weniger in der Lage die entstandenen Schäden zu reparieren. In hypoxischen Tumoren führt der Mangel an Sauerstoff dazu, dass durch ionisierende Strahlung weniger ROS entstehen und die DNA-Schäden weniger effektiv fixiert werden. Dadurch können die Tumorzellen die geschädigte DNA besser reparieren und die Wirkung der Strahlentherapie ist deutlich reduziert [151–154].

1.2.2 Sekundäre Therapieresistenz - Ursache und Auswirkung

Die sekundäre Therapie beschreibt die Unempfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber einer therapeutischen Maßnahme nach initialem Therapieerfolg. Das bedeutet, dass die Tumorzellen zunächst gut auf eine Therapie ansprechen, jedoch im weiteren Verlauf Mechanismen entwickeln, die zu einer Therapieresistenz führen. Dabei ist der Anteil der sekundären Therapieresistenzen deutlich höher als der der primären Therapieresistenzen [155, 156]. Auch hier können prinzipiell genetische und nicht-genetische Ursachen differenziert werden. Allerdings vermitteln die genetischen Veränderungen der Tumorzellen erst unter dem Selektionsdruck der Therapie eine erworbene Resistenz. Hier spielt die intratumorale Heterogenität eine zentrale Rolle [157]. Diese beschreibt, dass Tumorzellen innerhalb eines Tumors untereinander große Unterschiede aufweisen können. Dabei können die Zellen sich genetisch, epigenetisch, phänotypisch und funktionell voneinander unterscheiden. Zusätzlich kann es innerhalb eines Tumors auch Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikromilieus geben. So können bestimmte Bereiche des Tumors hypoxische Areale aufweisen, während andere Bereiche durch eine ausgeprägte Angiogenese charakterisiert sind. Darüber hinaus kann es innerhalb von Tumoren auch Unterschiede in der Infiltration von Immunzellen geben und dadurch z. B. Einfluss auf die Effektivität von Immuntherapien nehmen [158–161]. Eine der häufigsten Ursachen erworbener Therapieresistenz ist die Anwesenheit einer kleinen Tumorzellpopulation mit genetischen Alterationen, die ein vermindertes Ansprechen auf die Behandlung vermitteln. Durch die begonnene Therapie und den Selektionsdruck der Therapie kann diese Tumorzellpopulation expandieren und eine sekundäre Therapieresistenz vermitteln [157]. So zeigte sich z.B. in einem Modell des EGFR-mutierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC), dass die In-Frame Deletion in Exon 19 und die L858R Mutation in Exon 21 die Tumorzellen initial suszeptibel auf die EGFR-TKI Erlotinib und Gefitinib machen [162, 163]. Allerdings zeigen ca. 50 % der Patienten innerhalb eines Jahres einen Progress, der durch die Anwesenheit von Tumorzellen mit einer EGFR-T70M-Mutation zu erklären ist [164–166]. Diese Mutation führt zu einer erhöhten Bindungsaffinität der Kinase gegenüber ATP, sodass Erlotinib oder Gefitinib als kompetitive ATP-Inhibitoren ihre Wirkung verlieren. Dadurch wird die EGFR-T70M-mutierte Zellpopulation selektiert und vermittelt somit die sekundäre Therapieresistenz [167, 168]. Neben genetisch unterschiedlichen Zellpopulationen existieren auch Tumorzellen, die durch eine ausgeprägte Plastizität charakterisiert sind. So können beispielsweise einzelne Subpopulationen durch einen veränderten Phänotyp (wie z. B. einen Stammzellphänotyp, einen Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT)-Phänotyp oder einen quieszenten/langsam proliferierenden Phänotyp) weniger auf eine Therapie ansprechen [169]. Dieser Phänotyp kann dabei durch die Therapie selbst induziert sein. So zeigte sich, dass z. B. die Behandlung von Bronchialkarzinomzellen mit dem EGFR-TKI Gefitinib zu einer EMT und konsekutiver Gefitinib-Resistenz führt. Dabei zeigten die Gefitinib-resistenten Zellen eine Aktivierung des Notch-1-Signalwegs, welcher in den

Bronchialkarzinomzellen eine EMT induzierte [170, 171]. Die EMT ist ein hochkonservierter embryologischer Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre apiko-basale Polarität und epithelialen Marker verlieren und gleichzeitig mesenchymale Eigenschaften wie erhöhte Motilität und Invasivität erwerben. Dieser Phänotyp wurde bereits in mehreren Studien mit einer erworbenen Therapieresistenz assoziiert [172]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte dabei erstmals einen potenziellen Mechanismus entschlüsseln, wie die EMT eine Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika vermittelt. So zeigten sie Autoren, dass die kleine GTPase Ras Homolog Family Member J (RHOJ) in EMT-Tumorzellen eine Verbesserung der DNA-Schadensantwort und weniger therapieinduzierte Apoptose vermittelt [173] (**Abb. 3**).

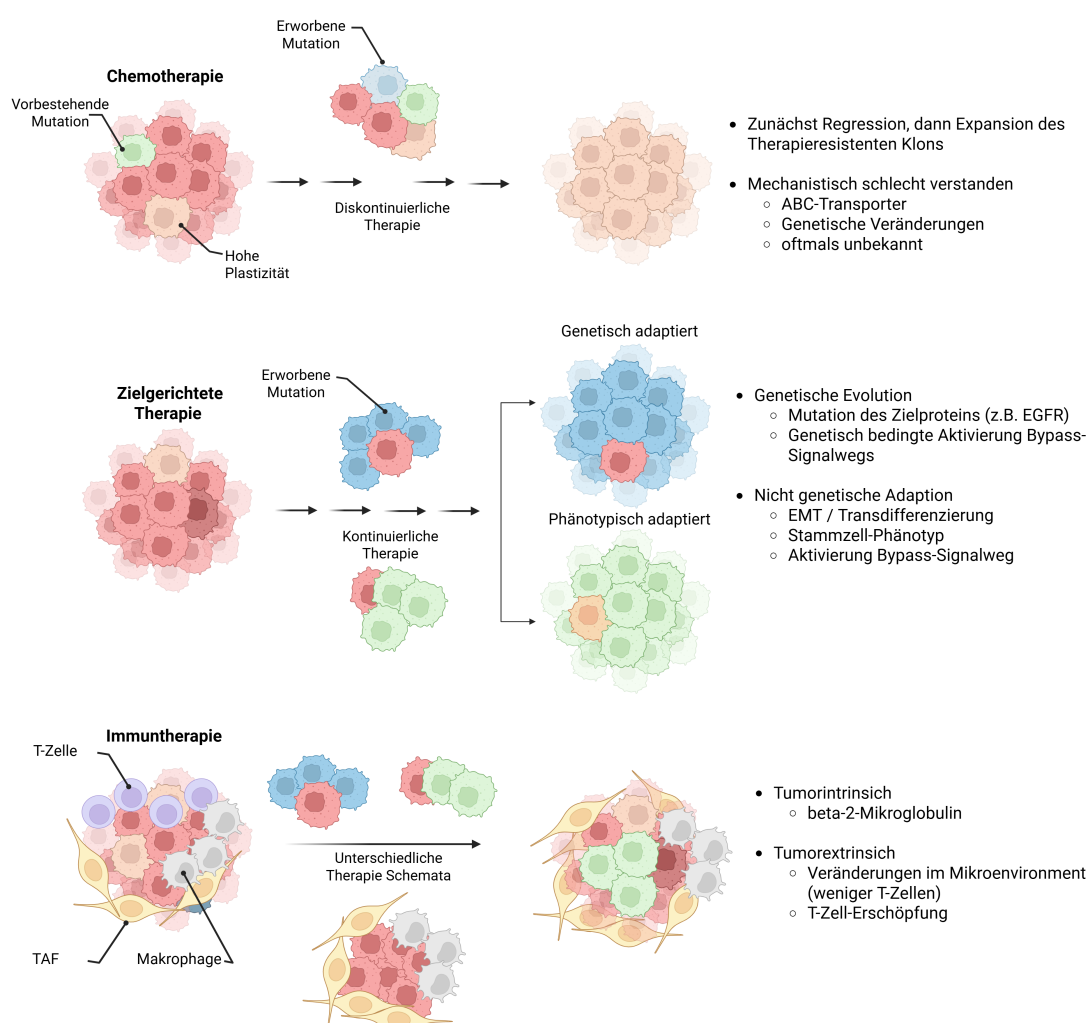


Abbildung 3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen molekularen Mechanismen sekundärer Therapiereistenzen: **Chemotherapie:** Sekundäre Chemotherapie-Resistenzen sind bis heute unzureichend verstanden. Durch die zugrunde liegende intratumorale Heterogenität kann die Chemotherapie selbst im Sinne eines Selektionsdrucks Zellen selektieren, welche nach diskontinuierlicher Therapie zu einer erneuten Progression führen. Hier spielen genetische Veränderungen, zelluläre Plastizität sowie ABC-Transporter eine entscheidende Rolle. **Zielgerichtete Therapie:** Durch eine genetische Adaption der Tumorzellen, z. B. durch eine erworbene Mutation innerhalb der therapeutischen Zielstruktur, entfalten die Tumorzellen eine sekundäre Therapieresistenz. Darüber hinaus können Phänotypen wie Stammzellen und EMT-Zellen eine Resistenz vermitteln. Ebenso kann die Aktivierung sogenannter Bypass-Signale die Wirkung zielgerichteter Therapien beeinflussen. **Immuntherapie:** Hier können tumorintrinsic Mechanismen, z. B. die Mutation des Beta-2-Mikroglobulins als Bestandteil des MHC-I-Rezeptors, die Effektivität der Immuntherapie beeinflussen. tumorextrinsic Mechanismen beschreiben die Veränderung des Mikroenvironment, z. B. durch weniger Effektor-T-Zellen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [157]).

Darüber hinaus ist die EMT sehr eng mit den Eigenschaften von Tumorstammzellen verknüpft [174]. Diese Zellen sind eine funktionell definierte Subpopulation mit der Fähigkeit zur Tumorinitiierung und zur Selbsterneuerung und können somit den Tumor langfristig aufrechterhalten. Tumorstammzellen besitzen mehrere intrinsische Schutzmechanismen, die sie sowohl gegen Chemotherapien als auch gegen zielgerichtete Therapien und Immuntherapien schützen. Diese umfassen eine niedrige Proliferationsrate, eine erhöhte Expression von ABC-Transportern, erhöhte Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), hochaktive DNA-Reparaturmechanismen sowie eine intrinsische Apoptoseresistenz. Darüber hinaus sind Tumorstammzellen in spezialisierten Nischen lokalisiert und dadurch durch die Tumormikroumgebung vor Therapien geschützt [175–178].

Neben den auf dem Prinzip der intratumoralen Heterogenität beruhenden Prinzipien der sekundären Therapieresistenz, gibt es noch weitere Mechanismen die vor allem die Therapieresistenz gegenüber TKI erklären. Hier spielt die alternative Aktivierung sogenannter Bypass-Signalwege eine zentrale Rolle. Während bestimmte TKI einen ganz bestimmten Signalweg hemmen, sind die vielen Tumoren nicht vollständig abhängig von dem blockierten Target und können z.B. über Freisetzung autokrine Wachstumsfaktoren parallele Signalwege wie z.N (PI3K, MAPK, SRC, AXL, FGFR) aktivieren und somit die Wirkung des TKI umgehen [179–181]. So konnte eine Studie z. B. nachweisen, dass eine kompensatorische Aktivierung eines c-MET/PI3K/AKT-Signalwegs in Bronchialkarzinomzellen die Resistenz gegenüber den EGFR-TKI Gefitinib und Erlotinib vermittelt [182]. Dabei konnte eine weitere Studie demonstrieren, dass der MET-spezifische Ligand Hepatocyte growth factor (HGF) diesen Signalweg aktivieren kann und somit die Gefitinib Resistenz vermittelt [183].

Erworbene Resistenzmechanismen gegenüber Immuntherapien umfassen tumorintrinsische sowie tumorextrinsische Mechanismen. Dabei konnten Zaretsky *et al.*, durch Ganzexom-Sequenzierungen von Patienten mit erworbener Resistenz Mutationen im Beta-2-Mikroglobulin als Teil des MHC-I-Komplex nachweisen. Dadurch verlieren die CD8-positiven T-Zellen die Fähigkeit Tumorzellen über den MHC-I-Rezeptor zu erkennen [184]. Letztendlich kann auch eine veränderte Zusammensetzung des Tumormikroenvironment das Ansprechen auf Immuntherapien deutlich beeinflussen. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden in **Kapitel 1.2.4** beschrieben.

1.2.3 Mechanismen der HER2-Therapie-Resistenz

Die Entdeckung des HER2-Rezeptors als therapeutische Zielstruktur in der Behandlung von HER2-überexprimierenden Tumorerkrankungen hat zu einer deutlichen Verbesserung des Gesamtüberlebens geführt. Allerdings entwickeln viele Patienten trotz der erheblichen Fortschritte der HER2-gerichteten Therapien eine primäre oder erworbene Therapieresistenz. Dabei konnten bereits viele unterschiedliche Mechanismen der Resistenz entschlüsselt werden [185]. Einer der zentralen Resistenzmechanismen betrifft strukturelle Verän-

derungen des HER2-Rezeptors selbst. Dabei stellt die trunkierte HER2-Isoform p95HER2 ein N-terminal verkürztes, membranständiges HER2-Fragment dar, welches die Bindungsaffinität von Trastuzumab gegenüber HER2 reduziert und die intrazelluläre Kinasaktivität erhöht. Diese Eigenschaften tragen wesentlich zur Resistenzentwicklung und zu einer ungünstigeren Prognose bei [186, 187]. Entsteht diese trunkierte HER2-Form durch die proteolytische Spaltung durch MMPs, wird eine etwa 110 kDa große extrazelluläre Domäne in das Serum freigesetzt. Dort kann sie HER2-spezifische Antikörper wie Trastuzumab binden und dadurch deren Wirkung neutralisieren [188, 189]. Ferner können Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne die Wirksamkeit HER2-spezifischer TKI wie Lapatinib und Neratinib beeinträchtigen. So zeigte sich, dass die Tumorprogression bei zunächst Neratinib-sensiblen Mammakarzinom-Patienten durch die erworbene HER2-T798I-Mutation zu erklären ist [190]. Ein weiterer interessanter Mechanismus der HER2-Resistenz ist die Hochregulation der MUC-Glykoproteine. Diese besitzen EGF-ähnliche Untereinheiten und können dadurch die Bindungsdomäne des HER2-Rezeptors maskieren und somit die Effektivität von HER2-Antikörpern wie Trastuzumab reduzieren [191]. Zudem kann auch der Verlust der HER2-Expression die Sensitivität gegenüber Lapatinib und Trastuzumab vermindern. Dieser Verlust ist insbesondere bei GEAC-Patienten zu beobachten. Hier zeigte eine multizentrische Beobachtungsstudie, dass etwa 60 % der GEAC-Patienten mit Progress unter einer HER2-spezifischen Therapie einen Verlust der HER2-Expression aufwiesen [192]. Einer der häufigsten Mechanismen der erworbenen Therapieresistenz ist die kompensatorische Hochregulation anderer proliferativer Rezeptoren wie EGFR, MET, FGFR1-3 und β 2-Adrenozeptor [193]. Insbesondere für das GEAC scheint die Koexpression des MET-Rezeptors mit gleichzeitiger PI3K/AKT-Aktivierung das Ansprechen auf Trastuzumab und Lapatinib deutlich zu reduzieren [194–197]. Neben der Hochregulation kann der HER2-Rezeptor auch ligandenunabhängig mit anderen Rezeptoren, die nicht aus der EGFR-Familie stammen, heterodimerisieren und somit die Bindung therapeutischer HER2-Antikörper verhindern [198–200]. Rezeptorunabhängige Mechanismen sind HER2-Therapieresistenz und umfassen Veränderungen der intrazellulären Signalkaskaden. So führt der Verlust von PTEN durch eine Deletion zu einer Überaktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und dadurch zu einer Resistenz gegenüber Trastuzumab. Diese Mutationen können in bis zu 67 % in HER2-positiven GEAC-Patienten nachgewiesen werden und reduzieren signifikant das Gesamtüberleben [193, 201–203]. Auch aktivierende Mutationen des Signalproteins PI3K führen insbesondere bei HER2-positiven GEAC-Patienten zu einer Resistenz gegenüber Lapatinib und Trastuzumab und dadurch zu einem verkürzten progressionsfreien Überleben [204, 205]. Aber auch die Aktivierung alternativer Signalwege wie IL-6/STAT3, Src, Notch und IL-8/CXCR8 kann die Effektivität von Trastuzumab und Lapatinib beeinflussen [206–210]. Letztendlich kann auch die phänotypische Plastizität HER2-positiver Tumorzellen die Wirksamkeit der HER2-gerichteten Therapie beeinflussen. Studien zeigen, dass Tumorzellen, die eine EMT durchlaufen oder Stammzeleigenschaften erwerben, die Effektivität der HER2-Therapie

deutlich beeinträchtigen können [211–213]. Darüber hinaus weisen mehrere Arbeiten darauf hin, dass auch nicht-neoplastische Zellen des Tumorstromas mit HER2-gerichteten Therapien interferieren und so zur Resistenzentwicklung beitragen.

1.2.4 Einfluss des Tumorstromas auf das Therapieansprechen

Neben tumorintrinsic Mechanismen der erworbenen Therapieresistenz kann auch das nicht-neoplastische Tumorstroma die Effektivität antitumoraler Therapien maßgeblich beeinflussen. Das Tumorstroma umfasst sämtliche nicht-neoplastischen Bestandteile eines Tumors, die die Tumorzellen strukturell, metabolisch und funktionell umgeben. Es setzt sich aus verschiedenen zellulären Komponenten zusammen, darunter Fibroblasten und myofibroblastische Zellen, Endothelzellen sowie Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen. Darüber hinaus umfasst das Tumorstroma nicht-zelluläre Bestandteile wie die EZM sowie lösliche Faktoren, darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren und Metabolite. Jede dieser stromalen Komponenten kann durch direkte und indirekte Interaktionen mit den Tumorzellen die Effektivität von Chemotherapien und zielgerichteten Therapien modulieren und somit zur Entwicklung einer erworbenen Therapieresistenz beitragen [214]. TAFs stellen in vielen soliden Tumoren neben Makrophagen den dominierenden Stromazelltyp dar und konnten schon in vielen Tumorentitäten wie Pankreaskarzinomen, Kolorektalkarzinomen, Mammakarzinomen und Bronchialkarzinomen mit der Entwicklung von Therapieresistenzen in Verbindung gebracht werden [214]. So können TAFs neben der bereits oben beschriebenen Remodellierung der EZM auch durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie TGF- β , HGF und IL-6 den Therapieerfolg deutlich reduzieren. So zeigten die Autoren Straussmann *et al.*, dass Fibroblasten durch die Sekretion von HGF mit anschließender Aktivierung des MET-Rezeptors und der Signalwege MAPK und PI3K/AKT das Ansprechen auf die RAF-Inhibitoren signifikant vermindern [215]. Fibroblasten können aber auch über die Freisetzung von IL-6 einen EMT-Phänotyp in Bronchialkarzinomzellen induzieren, der mit einer verminderten Sensitivität gegenüber Cisplatin einhergeht [216]. Darüber hinaus können Fibroblasten hohe Mengen an IL-8 sezernieren, welches über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs eine erhöhte Expression von ABC-Transportern vermittelt und dadurch die intrazelluläre Akkumulation sowie die Wirksamkeit platinbasierter Chemotherapien reduziert [217]. Zusätzlich, aber noch weit weniger erforscht, ist die Fähigkeit von Fibroblasten, metabolische Prozesse in Tumorzellen zu reprogrammieren und dadurch Therapieresistenzen zu vermitteln [218, 219]. Darüber hinaus können Fibroblasten epigenetische Programme in Tumorzellen modulieren sowie über die Freisetzung von Exosomen spezifische Signalwege aktivieren, wodurch das Ansprechen auf antitumorale Therapien zusätzlich beeinflusst werden kann [220, 221]. Ein weiterer Stromazelltyp, der nicht dem Immunmikromilieu zuzuordnen ist, sind die tumorassoziierten Endothelzellen (TAE). Diese Endothelzellen kleiden die innere Oberfläche der Blutgefäße innerhalb eines Tumors aus. Das TAE zeichnen sich durch eine hohe

angiogene Aktivität aus und können unter anderem durch die Freisetzung von VEGF das Ansprechen auf zytostatische Therapien vermindern [222]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TAE durch eine erhöhte Expression verschiedener ABC-Transporter charakterisiert sind, was zu einer verminderten intrazellulären Akkumulation und damit zu einer reduzierten Wirksamkeit zahlreicher Therapeutika führt. Darüber hinaus ist die Expression des ABC1-Transporters mit einer Aktivierung des AKT-Signalwegs verbunden, die eine gesteigerte VEGF-Sekretion zur Folge hat und somit zur Therapieresistenz gegenüber VEGF-Inhibitoren beiträgt [223, 224]. Weitere Zellen des stromalen Tumormikroenvironment sind tumorassoziierte Adipozyten, mesenchymale Stammzellen und myeloide Suppressorzellen. Alle diese Zellen können durch die Freisetzung von löslichen Faktoren, durch die Modulation der EZM und auch durch metabolische Reprogrammierung die Tumorzellen so beeinflussen, dass sie weniger gut auf Therapien ansprechen.

Neben der stromalen Komponente des Tumorstromas stellen Immunzellen, darunter Effektor-T-Zellen, regulatorische T-Zellen (Tregs) und tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), einen wesentlichen Bestandteil der Tumormikroumgebung dar. Vor allem Tregs können durch ihre immunsuppressive Wirkung einen deutlichen Einfluss auf die Tumorzellen nehmen. Dabei konnte eine hohe Dichte infiltrierender Tregs mit einer schlechten Prognose sowie erhöhten Raten von Chemotherapieresistenzen beim Melanom, Glioblastom, Kolorektalkarzinom und Bronchialkarzinom assoziiert werden [214]. So führt z. B. die Behandlung von Kolorektalkarzinomzellen mit 5-FU zu einer NF κ B-abhängigen Freisetzung von CCL20 mit anschließender Rekrutierung CD4⁺Foxp3⁺ Tregs. Die Anwesenheit dieser Tregs führt wiederum über eine Induktion von BCL2 zu einer Resistenz gegenüber 5'FU [181]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Glioblastom-Patienten nach Krankheitsprogress unter anti-angiogenetischer Therapie mit anti-VEGF erhöhte intratumorale Mengen an Foxp3⁺CD4⁺ Tregs aufwiesen. Dabei führt die anti-VEGF-Therapie über eine hypoxische Mikroumgebung zu erhöhten Mengen an Glutamat, welches wiederum zur Expansion von Tregs führt. Eine CD25-abhängige Blockade der Tregs führte dabei zu einem erneuten Ansprechen auf die anti-VEGF-Therapie [225]. Aber auch durch die Inhibition der Effektor-Funktionen von CD8⁺ T-Zellen können Tregs die Effektivität von Immuntherapien deutlich vermindern [226]. Die dominierenden Immunzelltypen innerhalb des Tumorstromas stellen die TAMs dar. Ihre Herkunft, Polarisierung und ihr Einfluss auf die Tumorprogression und Therapieresistenz werden in **Kapitel 1.3** dargestellt.

1.3 Makrophagen als Teil des Tumorstromas

1.3.1 Monozyten als Progenitorzellen der Makrophagen

Monozyten haben einen Durchmesser von 5 - 20 μm und zirkulieren vor allem im Blut. Sie stellen insgesamt 10 % der Leukozytenpopulation dar und sind als Teil des angeborenen Immunsystems an der Elimination von Krankheitserregern durch Phagozytose, Antigenpräsentation und Aktivierung des Komplementsystems beteiligt [227]. Darüber hinaus spielen sie eine wesentliche Rolle in der Immunregulation und Aufrechterhaltung der Gewebeshomöostase. Monozyten sind eine der zentralen Komponenten des mononukleären Phagozytensystems, zu dem sie gemeinsam mit Makrophagen und konventionellen dendritischen Zellen gehören. Monozyten differenzieren sich im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen der myeloischen Linie und dienen als Vorläuferzellen für verschiedene differenzierte Zellen, insbesondere für Makrophagen. Typischerweise werden sie in drei Subtypen unterteilt: klassische ($\text{CD14}^{++} \text{CD16}^{-}$), intermediäre ($\text{CD14}^{++} \text{CD16}^{+}$) und nicht-klassische Monozyten ($\text{CD14}^{+} \text{CD16}^{++}$), wobei jede Population unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweist [228]. Klassische Monozyten machen ungefähr 90 % der im Blut zirkulierenden Monozyten aus. Diese sind vor allem inflammatorisch aktiv und werden in großer Zahl bei Infektionen oder Gewebeschädigungen mobilisiert. Intermediäre und nicht-klassische Monozyten sind stärker an der Gewebshomöostase, Gefäßüberwachung und Immunregulation beteiligt [229]. Die Migration von Monozyten in das periphere Gewebe wird durch ein Netzwerk aus Chemokinen (z.B. CCL2, CCL3, CX3CL1) und Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1) vermittelt. Dort angekommen, differenzieren sie abhängig vom lokalen Zytokin-Milieu und mikrobiellen Signalen zu Makrophagen oder dendritischen Zellen [230, 231]

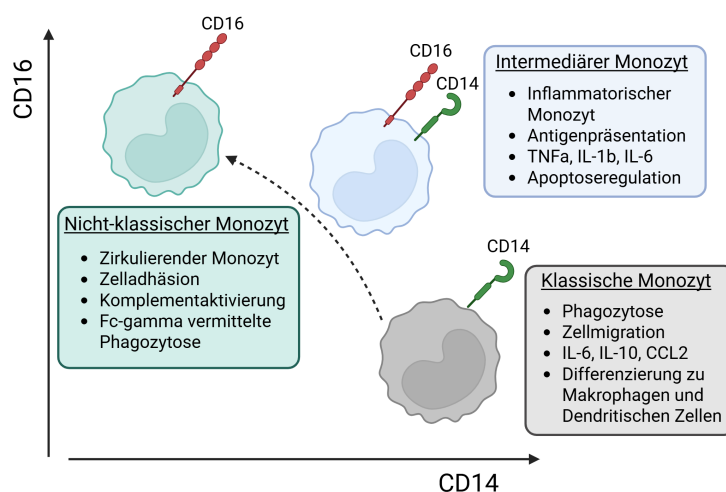


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Monozyten Subtypen: Die Monozyten-Subtypen werden durch ihrer unterschiedliche Expression der Oberflächenrezeptoren CD16 und CD14 differenziert. Die Subtypen kommen in unterschiedlichen Mengen im Blut vor und haben verschiedene Funktionen. Der klassische Monozyt migriert vor allem in das Gewebe und differenziert sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [232])

1.3.2 Polarisierung und Funktion von Makrophagen

Durch das Migrieren der Monozyten in das periphere Gewebe differenzieren diese zu Makrophagen. Dabei stellen Makrophagen hochplastische Zellen des angeborenen Immunsystems dar, die eine zentrale Rolle in der Immunabwehr, Geweberegeneration und Entzündungsprozessen spielen. Neben den Makrophagen, die aus den zirkulierenden Monozyten entstehen, müssen diese entwicklungsbiologisch von den residenten Makrophagen unterschieden werden. Diese werden je nach ihrer Lokalisation unterschiedlich benannt. So werden Makrophagen im Gehirn als Mikroglia, in der Leber als Kupffer-Sternzellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, im Knochen als Osteoklasten, im Knorpelgewebe als Chondroklasten und im Bindegewebe als Histiozyten bezeichnet [233, 234].

Eine zentrale Funktion von Makrophagen ist die Phagozytose. Diese beschreibt die Aufnahme und intrazelluläre Degradation von Pathogenen, apoptotischen Zellen, Zelltrümmern und Fremdmaterial [235]. Dieser Prozess wird durch eine Vielzahl von Rezeptoren vermittelt, darunter Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs) wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs), Scavenger-Rezeptoren und Opsonin-Rezeptoren (z.B. $\text{Fc}\gamma\text{R}$ und Komplementrezeptoren), welche Antigene erkennen und binden können. So kann z. B. der TLR-4 bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien erkennen, welches neben der Internalisierung des Mikroorganismus auch zu einer Aktivierung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalwegs und zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt [236, 237].

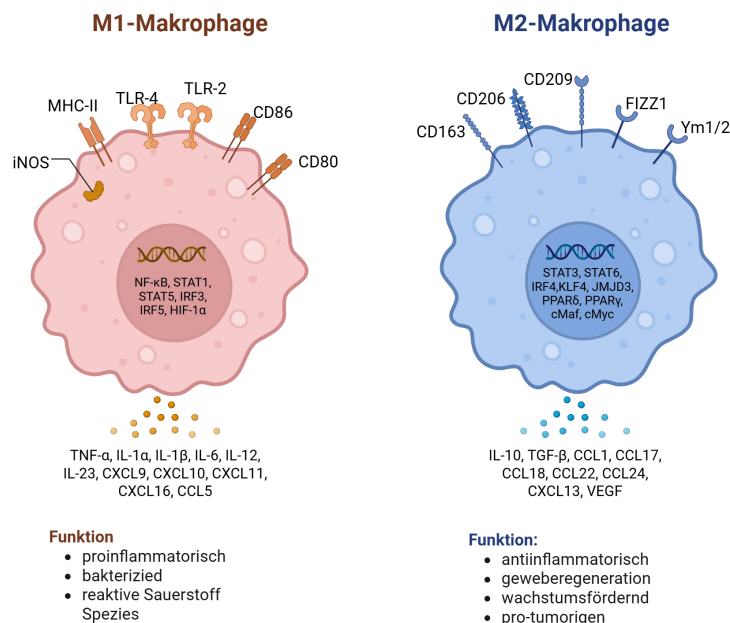


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Eigenschaften und Funktionen von M1- und M2-Makrophagen: M1-Makrophagen sind durch Expression der Oberflächenmarker iNOS, MHC-II, TLR-4 und CD86 charakterisiert. Sie zeichnen sich durch einen proinflammatorischen Phänotyp aus und sekretieren Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 und IL-1 β . M2-Makrophagen bilden die Oberflächenmoleküle CD204, CD163, FIZZ1 und CD206. Sie wirken über die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF geweberegenerierend und protumorigen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [238]).

Die phagozytierten Antigene werden anschließend in Phagosomen eingeschlossen, die sich durch die Fusion mit Lysosomen zu Phagolysosomen entwickeln. Innerhalb dieser Phagolysosomen werden die aufgenommenen Antigenpartikel durch hydrolytische Enzyme und ROS degradiert, was neben der Elimination pathogener Mikroorganismen auch zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase durch die kontinuierliche Beseitigung zellulärer Trümmer führt [239, 240].

Eng verknüpft mit der Phagozytose ist die Fähigkeit der Makrophagen zur Antigenpräsentation, insbesondere über Major Histocompatibility Complex II (MHC-Klasse-II)-Moleküle. Nach der proteolytischen Degradierung phagozytierter Antigene in den Phagolysosomen werden Peptidfragmente auf der Zelloberfläche präsentiert, wo sie von CD4⁺-T-Zellen erkannt werden. Dadurch nehmen Makrophagen eine Schlüsselrolle als antigenpräsentierende Zellen ein, insbesondere im Rahmen der Initiierung und Modulation adaptiver Immunantworten. Zusätzlich exprimieren aktivierte Makrophagen kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86, die für die vollständige Aktivierung naiver T-Zellen essenziell sind [241]. Makrophagen sind zudem in der Lage, durch die Sekretion von C1q, C2, C3 und Faktor B das Komplementsystem zu aktivieren und zu regulieren [242, 243]. Darüber hinaus steuern sie die Immunantwort durch die Freisetzung unterschiedlicher proinflammatorischer und antiinflammatorischer Signalmoleküle.

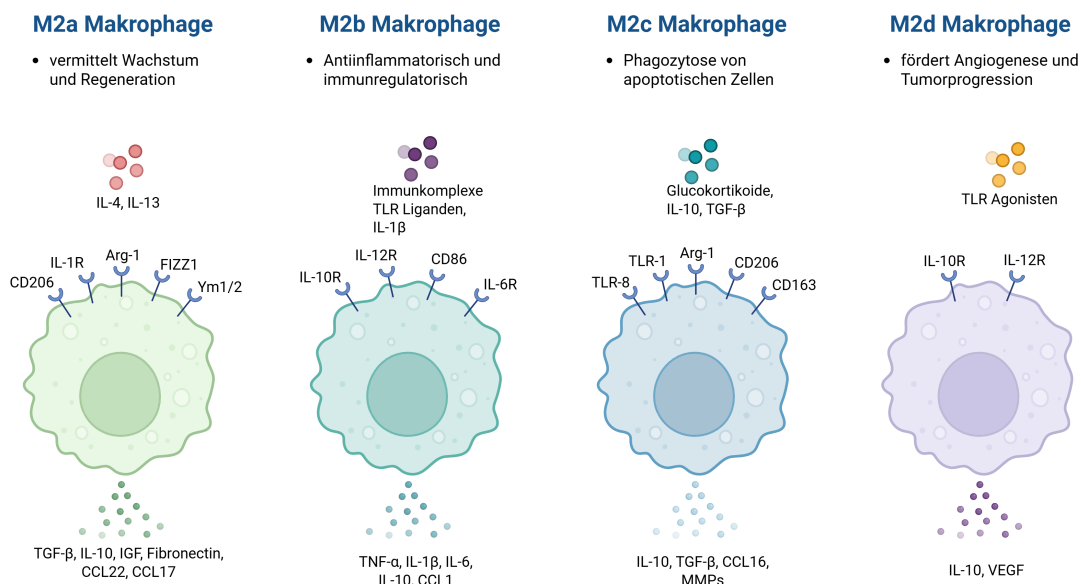


Abbildung 6: Schematische Darstellung der M2-Makrophagen-Polarisierung: M2-Makrophagen können je nach Funktion und Zytokinprofil in weitere Subtypen differenziert werden. M2a-Makrophagen fördern Regeneration und Wachstum durch die Freisetzung von u. a. TGF- β , IL-10 und IGF. M2b-Makrophagen regulieren durch die Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen die Immunantwort. M2c-Makrophagen fördern durch die Freisetzung von IL-10 die Immuntoleranz und Gewebestabilisierung. M2d-Makrophagen fördern das immunsuppressive Mikroenvironment von Tumoren und fördern Angiogenese und Proliferation. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [238]).

Makrophagen üben aber nicht zu jeder Zeit die gleichen Funktionen aus. Ihr Phänotyp hängt stark vom immunologischen Kontext sowie von den Signalen des lokalen Mikromilieus ab. Dabei wird historisch zwischen der klassischen (M1-) und der alternativen (M2-) Aktivierung unterschieden [244]. Naive Makrophagen differenzieren durch die Einwirkung von Interferon γ (IFN- γ) und mikrobielle Stimuli wie LPS in klassische M1-Makrophagen. Diese sind vor allem durch ihre Sekretion von proinflammatorischen Molekülen wie z. B. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 und IL-23 und durch ihre gesteigerte mikrobizide Aktivität charakterisiert. Durch ihre Expression der MHC-II-Moleküle sind die M1-Makrophagen vornehmlich an der Antigenpräsentation beteiligt. Hierdurch fördern sie eine Th1-Antwort und somit die Abwehr von Pathogenen und die Aktivierung adaptiver Immunantworten. Demgegenüber erfolgt die alternative Aktivierung (M2) insbesondere durch IL-4 und IL-13. M2-Makrophagen zeigen eine antiinflammatorische und gewebereparative Funktion. Durch die erhöhte Bildung von Arginase-1, CD206 (Mannoserezeptor) und IL-10 spielen M2-Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Wundheilung, Angiogenese und Immunsuppression [245, 246] (**Abb. 5**). Diese strikt binären Aktivierungszustände bilden jedoch nicht die physiologische Situation ab. Die unterschiedlichen Aktivierungszustände der Makrophagen sind vielmehr durch ein kontinuierliches Spektrum funktioneller Zustände charakterisiert. Makrophagen zeigen eine ausgeprägte Plastizität, wodurch sie dynamisch auf Veränderungen im Gewebe und auf unterschiedliche Zytokin- oder Stoffwechselsignale reagieren können. Um diese Plastizität noch etwas besser abzubilden, wurde der M2-Phänotyp noch in weitere Subtypen differenziert. Hier werden die M2a-, M2b-, M2c- und M2d-Makrophagen unterschieden [247]. M2a-Makrophagen werden klassischerweise durch die Zytokine IL-4 und IL-13 aktiviert und fördern durch die Sekretion von Wachstumsstimuli wie TGF- β , IGF oder Fibronectin die Geweberegeneration. Zusätzlich regulieren und hemmen sie die proinflammatorischen M1-Antworten. M2b-Makrophagen werden durch Immunkomplexe und TLR-Liganden aktiviert und regulieren durch die Freisetzung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Signalmolekülen wie TNF- α und IL-10 die Immunantwort. M2c-Makrophagen werden durch IL-10, TGF- β oder Glukokortikoide aktiviert und sind durch Förderung der Immuntoleranz und Gewebestabilisierung vornehmlich an der Auflösung der Entzündung beteiligt. Darüber hinaus phagozytieren sie effektiv apoptotische Zellen [248]. Die M2d-Makrophagen werden innerhalb dieser Gruppe als die protumorigenen Makrophagen klassifiziert. Sie werden durch TLR-Liganden, IL-6 und das hypoxische Tumor-Mikromilieu aktiviert und bilden große Mengen an VEGF und IL-10 und können durch die Steigerung der Angiogenese, das Unterdrücken zytotoxischer T-Zellen sowie die Vermittlung immunsuppressiver Prozesse das Tumorstadium fördern [249] (**Abb. 6**).

1.3.3 Tumorassoziierte Makrophagen

TAMs sind Bestandteil des nicht-neoplastischen Tumorstromas und stellen neben den TAFs die am häufigsten vorkommende Zellpopulation innerhalb des Stromas dar [250]. Aktuell wird noch angenommen, dass TAMs sich überwiegend aus zirkulierenden, im Knochenmark gebildeten Monozyten entwickeln [251]. Dabei können Tumorzellen selbst über die Freisetzung von Chemokinen wie CSF-1, MCP-1/CCL2 und IL-8/CXCL8 die Monozyten in das intratumorale Gewebe rekrutieren [252, 253]. Neuere Untersuchungen diskutieren zudem, dass TAMs auch aus Monozyten hervorgehen können, die durch eine extramedulläre Hämatopoese in der Milz gebildet werden. Dabei lautet die Hypothese, dass die Milz als Reservoir fungiert und somit eine rasche Mobilisierung von Monozyten zum Tumor ermöglicht [254, 255]. Sobald die rekrutierten Monozyten in das Gewebe extravasieren, differenzieren sie unter dem Einfluss der Tumormikroumgebung zu Makrophagen.

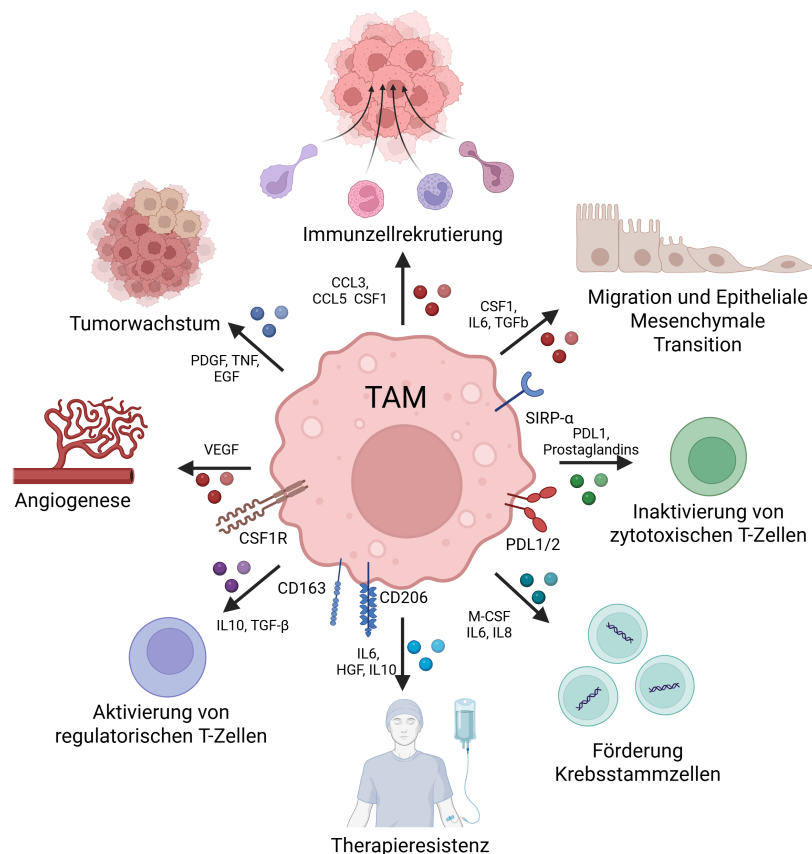


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Funktionen von tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) in der Karzinogenese: TAMs zeichnen sich durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wie CD206, CD163, CSF1R und PDL1/2 aus. Darüber hinaus können sie multiple Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren freisetzen. Sowohl durch direkten als indirekten Kontakt zu Tumorzellen können sie das Tumorstromawachstum, die Angiogenese, die Therapieresistenz, die Migration und Invasion fördern. Zusätzlich können sie Immunzellen rekrutieren und durch die Aktivierung regulatorischer T-Zellen ein immunsuppressives Milieu schaffen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [256])

Initial ist man davon ausgegangen, dass Makrophagen ausschließlich antitumorale Eigenschaften besitzen und das Tumorgewebe infiltrieren, um die Tumorzellen zu phagozytieren und zu zerstören [257–260]. Inzwischen haben jedoch umfangreiche Untersuchungen zeigen können, dass TAMs vornehmlich protumorale Eigenschaften aufweisen. Dabei konnten Analysen sehr gut demonstrieren, dass die Tumormikroumgebung TAMs so beeinflussen kann, dass sie zu tumorfördernden Zellen umprogrammiert werden [250, 261]. Wie bereits oben beschrieben weisen Makrophagen eine ausgeprägte Plastizität auf. Über einen langen Zeitraum ist man davon ausgegangen, dass TAMs durch ihre immunsuppressiven bzw. immunregulatorischen Eigenschaften vornehmlich M2-polarisierte Makrophagen darstellen. Allerdings zeigen TAMs in der Regel kein reines M1- oder M2-Profil. Ihre phänotypische und funktionelle Heterogenität lässt sich daher mit diesem binären Klassifikationssystem nur unzureichend abbilden. Auch das erweiterte Klassifikationsmodell zur Unterteilung der M2-Makrophagen bildet die Komplexität der Makrophagen nur unzureichend ab [262, 263]. Neuere Transkriptomanalysen belegen, dass TAM-Subpopulationen gleichzeitig Genexpressionsmuster beider Aktivierungszustände (M1 und M2) aufweisen können. Darüber hinaus exprimieren TAMs teilweise Gene, die nicht den klassischen Signaturen der M2-Aktivierung entsprechen, was die enorme Plastizität und kontextabhängige Funktion dieser Zellpopulation unterstreicht [264–267]. TAMs können durch verschiedene Mechanismen die Tumorprogression fördern. TAMs können durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen wie IL-10, IL-6, EGF, PDGF, VEGF und HGF die Karzinogenese und das Tumorstadium beeinflussen [268]. Zum Beispiel können TAMs über die Sekretion von HGF das Wachstum und die Therapieresistenz gegenüber Sorafenib von hepatozellulären Karzinomzellen fördern [269]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TAMs durch die Freisetzung von Adrenomedullin und eine konsekutive Aktivierung des eNOS-Signalwegs das Wachstum von Melanomzellen fördern [270]. Darüber hinaus können TAMs über Notch-, Wnt- und Hedgehog-Signalwege die Aufrechterhaltung von Krebsstammzellen und deren Nischen begünstigen und somit zum Tumorstadium und zur Selbsterneuerung beitragen [271–274]. Ein weiterer Mechanismus, über den TAMs zur malignen Progression beitragen, ist die Förderung von Invasion und Metastasierung. Durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Cathepsinen und Urokinase-Plasminogenaktivator degradieren TAMs die EZM und erleichtern somit die Invasion von Tumorzellen in die EZM [275–278]. Zudem induzieren TAMs über die Sekretion von TGF- β und IL-6 eine EMT, wodurch die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen weiter gesteigert wird [279–281]. Eine wichtige Voraussetzung für Tumorstadium und Metastasierung ist die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff über Angiogenese. Dabei können TAMs die Neubildung von intratumoralen Blutgefäßen durch die Sekretion von proangiogenen Faktoren (VEGF, PDGF und FGF2) stimulieren [282–284]. Neben ihrer Rolle in der Förderung des Tumorstadiums und der Angiogenese tragen TAMs auch wesentlich zur Immunevasion des Tumors bei. Durch verschiedene Mechanismen unterdrücken sie die adaptive Immunantwort und

schaffen so ein immunsuppressives Mikromilieu, das das Tumorwachstum zusätzlich begünstigt. So können TAMs durch die Expression von PD-L1, die Sekretion von IL-10 und TGF- β sowie die Rekrutierung Tregs die Aktivität zytotoxischer CD8-T-Zellen hemmen [285, 286]. TAMs haben auch eine direkte klinische Relevanz für Tumorpatienten und deren Prognose. Neben ihren protumorigenen Eigenschaften beeinflussen sie maßgeblich das Ansprechen auf tumorspezifische Therapien.

1.3.4 Einfluss von Makrophagen auf den Therapieerfolg von Krebserkrankungen

Makrophagen können einen erheblichen Einfluss auf das Ansprechen von Chemotherapien, Strahlentherapien, zielgerichteten Therapien und Immuntherapien nehmen. Umfangreiche präklinische und klinische Studien konnten zeigen, dass die Infiltrationsdichte von TAMs in soliden Tumoren mit einer deutlich schlechteren Prognose zusammenhängt. Diese Beobachtung konnte über viele Krebsentitäten hinweg bestätigt werden. Neben ihrem direkten Einfluss auf das Tumorwachstum lässt sich die schlechte Prognose auch durch die Makrophagen-vermittelte Therapieresistenz erklären. Dabei können TAMs Therapieresistenzen über die Freisetzung von löslichen Überlebens- bzw. anti-apoptotischen Faktoren vermitteln. Darüber hinaus können TAMs auch über direkten Zellkontakt und über die Veränderung der EZM die Effektivität einer tumorspezifischen Therapie reduzieren [287, 288].

Chemotherapeutische Wirkstoffe induzieren in der Regel DNA-Schäden, insbesondere in Zellen, die eine hohe Proliferationsrate aufweisen. Die Wirkstoffe umfassen dabei Alkylanzien (z. B. Cisplatin), Antimetabolite (z. B. 5-FU), Topoisomerase-Hemmer (z. B. Doxorubicin) und Mitosehemmer (z. B. Paclitaxel) [289, 290]. TAMs sind dazu in der Lage, mit der Wirkung all dieser Substanzen zu interferieren. So können TAMs durch die Freisetzung von Cathepsinen die Effektivität von Mitosehemmern wie Paclitaxel reduzieren [291, 292]. Darüber hinaus sind TAMs über verschiedene Mechanismen mit der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Alkylanzien wie Cisplatin assoziiert. So zeigten Untersuchungen, dass TAMs z. B. über die Sekretion von exosomaler Mikro-RNA (miR-223) die Expression von PTEN reduzieren und somit den PI3K/AKT-Signalweg dauerhaft aktivieren und die durch Cisplatin induzierte Apoptose hemmen [293]. Auch können Makrophagen durch die Freisetzung der Chemokine CCL17 und CCL22 über die Aktivierung des CCR4-Rezeptors eine membranständige Rekrutierung und funktionelle Aktivierung des Multidrug-Resistance-assoziierten Transportproteins MRP1 (ABCC1) induzieren, was den Efflux von 5-Fluorouracil aus Tumorzellen fördert [294]. Zudem können viele weitere proinflammatorische, von TAMs freigesetzte Zytokine und Chemokine wie IL-6, CCL5 und CCL20 Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika induzieren [295–297]. Neben den klassischen Chemotherapien können TAMs auch die Effektivität von strahlentherapeutischen Krebsbehandlungen beeinflussen. Dabei kann die Strahlentherapie selbst die Rekrutierung

sowie die Polarisierung von Makrophagen fördern, welche wiederum über die Sekretion von Überlebensfaktoren (z. B. IL-6, TNF- α , EGF) das Überleben bestrahlter Tumorzellen fördern. So konnte eine Studie von Akkari *et al.*, zeigen, dass die Makrophagen-Depletion durch CSF1R-Inhibition die Effektivität der Strahlentherapie von Glioblastomtumoren verbessert [298]. Auch zielgerichtete Therapien mit Antikörpern und TKI werden durch TAMs beeinflusst. In Kopf-Hals-Tumoren führte die Sekretion von CCL15 durch TAMs zu einer Aktivierung des CCR1-NF- κ B-Signalswegs und dadurch zu einer Resistenz gegenüber dem EGFR-TKI Gefitinib [299]. TAMs können auch die Wirksamkeit des JAK-Inhibitors Ruxolitinib herabsetzen. Dabei resultiert die Behandlung mit Ruxolitinib in einer vermehrten Produktion von Cyclooxygenase 2 in den Makrophagen mit anschließender Freisetzung von Prostaglandin E2. Dieses wiederum wirkt parakrin auf die Tumorzellen und führt zu einem geringeren Ansprechen auf Ruxolitinib [300]. Neben den TKI können TAMs auch die Effektivität von Antikörpern reduzieren. Der monoklonale Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab hemmt die Neoangiogenese und dadurch das Tumorwachstum. In Anwesenheit von Bevacizumab polarisieren Makrophagen in einen M2b-Phänotyp, welcher erhöhte Mengen an TNF- α sekretiert und dadurch die Wirksamkeit von Bevacizumab bei Mammakarzinomen reduziert [301]. Durch die Immuntherapie konnte ein erheblicher Fortschritt in der Behandlung zahlreicher Tumorerkrankungen erzielt werden. Jedoch wird die Effektivität deutlich durch das immunsuppressive Tumorstroma limitiert, in dem TAMs eine zentrale Rolle spielen. Dabei können TAMs die Infiltration von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen hemmen und dadurch die Wirksamkeit der Anti-Programmed-Death-1-(Anti-PD-1-)Therapie aufheben. Darüber hinaus können TAMs durch die Sekretion von CCL20 Tregs rekrutieren und diese induzieren die Erschöpfung der CD8-positiven T-Zellen und somit den Wirkverlust der anti-PD-1-Therapie [288, 302, 303] .

Insgesamt können Makrophagen, die als infiltrierende Stromazellen in nahezu allen soliden Tumoren vorkommen, entscheidend den Behandlungserfolg unterschiedlicher Therapiestrategien beeinflussen.

1.4 Ziel der Arbeit

Trotz bedeutender wissenschaftlicher Fortschritte in der Genetik, Epigenetik und Zellbiologie bleibt die Prognose des GEAC äußerst schlecht. Die klinische Herausforderung bei der Behandlung dieser Tumorerkrankung umfasst sowohl die biologische Aggressivität als auch die ausgeprägte Neigung zur Entwicklung von Therapieresistenzen. Dabei präsentieren sich mehr als die Hälfte der GEAC-Patienten in einem fortgeschrittenen, metastasierten Stadium. Für diese Patientengruppe besteht häufig nur noch die Möglichkeit einer palliativen Systemtherapie. Obwohl bei einem relevanten Anteil der Patienten eine Überexpression von HER2 vorliegt, ist das klinische Ansprechen auf HER2-gerichtete Therapien heterogen und häufig nur von begrenzter Dauer. Dies weist darauf hin, dass weitere, bislang nicht ausreichend verstandene Mechanismen das therapeutische Ansprechen maßgeblich beeinflussen. Das nicht-neoplastische Tumorstroma trägt wesentlich zur Modulation der Eigenschaften von Tumorzellen bei. Dabei spielen neben stromalen und vaskulären Komponenten insbesondere infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen eine zentrale Rolle. Für das GEAC ist bekannt, dass chronisch-entzündliche Prozesse wesentlich zur Tumorentstehung und -progression beitragen. TAMs stellen hierbei eine der dominierenden Immunzellpopulationen dar und können, abhängig von ihrem funktionellen Phänotyp, pro-tumorigene Effekte vermitteln. Ihre Bedeutung für die Progression des GEAC sowie für die Wirksamkeit zielgerichteter Therapien ist jedoch bislang nur unzureichend untersucht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Stromafaktoren die wachstumshemmende Wirkung des dualen HER2/EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitors Lapatinib herabgesetzt wird. Folglich lässt sich eine zentrale Rolle des Tumorstromas für die Effektivität therapeutischer Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren ableiten. Die Aufklärung dieser kausalen Zusammenhänge besitzt sowohl diagnostischen als auch therapeutischen und prognostischen klinischen Nutzen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von TAMs auf die GEAC-Tumorprogression und Therapieresistenz untersucht. Zentrale Hypothese dieser Arbeit war, dass TAMs maßgeblich zur Tumorprogression des GEAC sowie zur Vermittlung einer Resistenz gegenüber HER2-gerichteten Therapien beitragen. Aufbauend auf dieser Hypothese verfolgte die vorliegende Arbeit drei übergeordnete Ziele:

1. Analyse der Expression makrophagenspezifischer Gene mithilfe eines cDNA-Mikroarrays sowie die Identifikation onkogener Expressionsmuster in GEAC-Patienten,
2. die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Makrophageninfiltration, klinisch-pathologischen Parametern und dem Gesamtüberleben sowie
3. die funktionelle Charakterisierung makrophagenvermittelter Effekte auf Tumorproliferation und Therapieansprechen in experimentellen *in-vitro*-Kokulturmodellen.

Hierzu wurde zunächst ein öffentlich zugänglicher cDNA-Mikroarray-Datensatz analysiert,

der 64 GEAC-Patientenproben sowie 15 Proben aus Barrett-Mukosa und 28 Proben aus Normalgewebe umfasste. Dieser diente als „Discovery Set“ und wurde sowohl zur Hypothesengenerierung als auch zur Analyse der Expression makrophagenspezifischer Gene genutzt. Die erhobenen Befunde wurden anschließend mittels Tissue-Mikroarray-(TMA)-Analysen von 360 GEAC-Patienten („Validation Set“) verifiziert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Makrophageninfiltration auf klinisch-pathologische Parameter (Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung, Grading, Fernmetastasierung und Gesamtüberleben) untersucht. Anschließend erfolgten mechanistische Untersuchungen in einem indirekten *in vitro*-Kokultursystem von Makrophagen und GEAC-Zellen, in denen der Einfluss makrophagensekretierter Faktoren auf die Proliferation, die Aktivierung onkogener Signalwege sowie das Ansprechen auf HER2-gerichtete Therapien analysiert wurde. Abschließend erfolgte eine erneute Validierung der experimentellen Ergebnisse im cDNA-Mikroarray („Discovery Set“) sowie im TMA („Validation Set“) (**Abb. 8**).

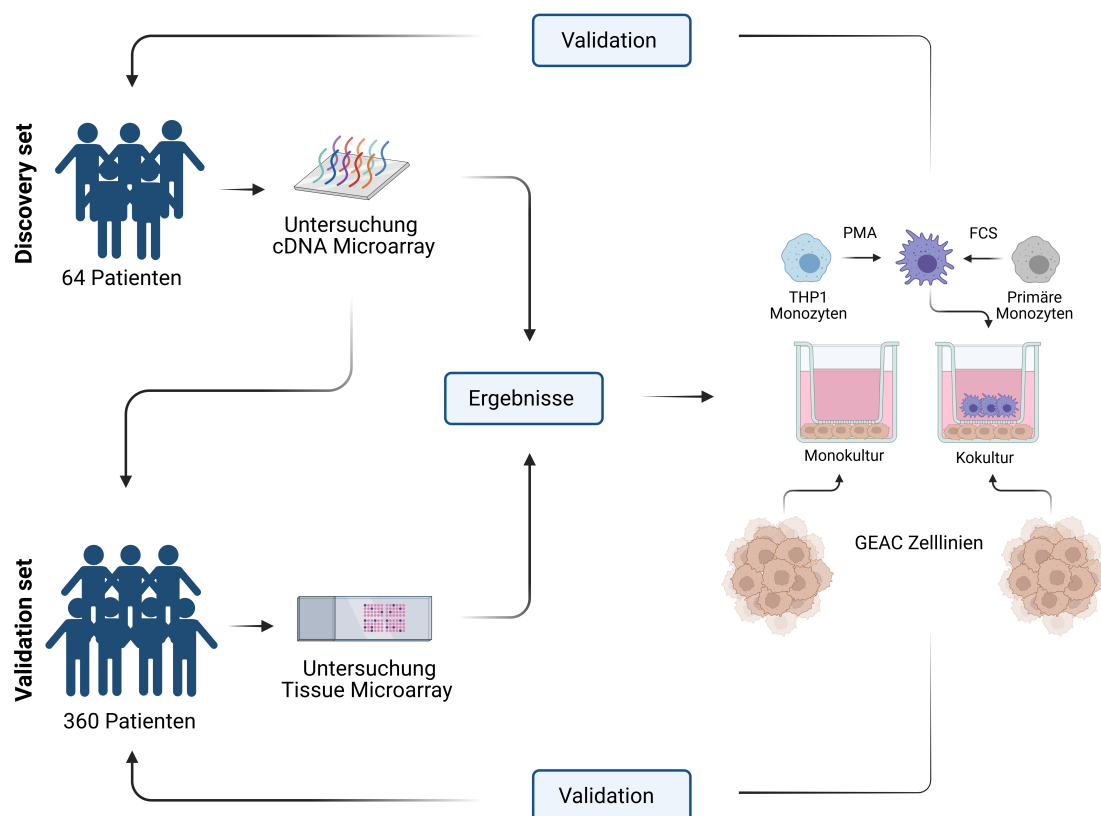


Abbildung 8: Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens des vorliegenden Projektes: Zu Hypothesengenerierung und Untersuchung der Expression makrophagen-spezifischer Gene diente ein cDNA-Mikroarray von 64 GEAC-Patienten als 'Discovery Set'. Diese erhobenen Befunde wurden anschließend in einem Tissue Mikroarray (TMA) von 360 GEAC-Patienten verifiziert und zusätzlich der Einfluss der Makrophageninfiltration auf die klinisch-pathologischen Parameter untersucht. Anschließend wurden diese Befunde in einem *in-vitro* indirekten Kokultursystem mechanistisch weiter untersucht und daraufhin erneut im 'Discovery Set' und 'Validation Set' validiert.

2. Materialien

2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Zentrifugen	
Biofuge B	Heraeus, Hanau, DE
Rotanta 460 S	Hettich, Tuttlingen, DE
Zentrifuge, MiniStar silverline	VWR, Darmstadt, DE
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Inkubatoren	
Brutschrank Modell BD 260	Binder, Tuttlingen, DE
GFL 1001 Wasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Heizblock Dri-Block DB-3D	Techne, Staffordshire, UK
MCO-19AIC CO2 Incubator	Sanyo Denki, Osaka, JP
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, DE
Kühlgeräte	
4 °C-Kühlschrank Sikafröst	Siemens, München, DE
-20 °C-Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, CH
-80 °C-Gefriertruhe Ultra Low	Sanyo Denki, Osaka, JP
196 °C-Stickstofftank	CBS, Michigan, US
Messgeräte	
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Hämozytometer, Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Mikroplattenlesegerät InfiniteF50	Tecan, Männedorf, CH
Nanodrop 2000, Spektralphotometer	Thermo Scientific, Schwerte, DE
pH-Meter S20 - SevenEasy™ pH	Mettler Toledo, Gießen, DE
ViiA 7 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, DE

Mikroskope

Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microimaging, Jena, DE
BH2	Olympus, Hamburg, DE
Digitales Mikroskop BZ-9000	KEYENCE, Neu-Isenburg, DE
ICS Standard 25	Carl Zeiss Microimaging, Jena, DE
Wiluvert	Helmut Hundt, Wetzlar, DE

Sicherheitswerkbänke

HERA safe KS 12	Heraeus, Hanau, DE
MSC-Advantage Klasse II	Thermo Scientific, Schwerte, DE

Waagen

A200S Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Laborwaage 822	Kern, Balingen-Frommern, DE

Pipetten

Eppendorf Research 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Multipette E3/E3x	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, DE

Andere Geräte

Autoklav VX-120	Systemec, Wetzlar, DE
Flockeneismaschine AF-10	Scotsman Ice Systems, Frimont, IT
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC	Vacuubrand, Wertheim, DE
Kipprollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen, DE
Laborschüttler	Edmund Bühler, Tübingen, DE
Magnetrührer mit Heizblock	Sigma-Aldrich, München, DE
Magnetständer MACS Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen, DE
PowerPac Basic Netzteil	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Ultraschallstab Sonopuls HD2070	Bandelin, Berlin, DE
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, US
Vortex VF2 Janke	Kunkel, Staufen, DE
Western Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US

2.2 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Hersteller
Alufolie	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Blutentnahmekanüle Multifly	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Combitips advanced (0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
CryoPure Gefäß 1,0 ml weiß	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Dako Pen	Dako, Hamburg, DE
Deckgläschen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
EASYstrainer, 40 / 100 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Entsorgungsbeutel	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FACS-Röhrchen	Sterilin, London, UK
Flachbodenplatten (96-Well, 24-Well, 12-Well, 6-Well)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Injekt Einmalspritzen 20 ml	B.Braun, Melsungen, DE
MACS LS Säule	Mitlenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Mikrotitertestplatte 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mikroreaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
MicroAMP Fast optical 96-Well	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Monovetten 9 ml, Kalium EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Nitril Schutzhandschuhe	Ansell, München, DE
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare Europe, München, DE
Klebefolie, optisch klar, qPCR	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Parafilm „M“	Brand, Wertheim, DE
Pasteurpipetten 230 mm, Glas	Hein Herenz, Hamburg, DE
PCR Gefäß Biosphere Multiply	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Spritzenfilter, 0,22 µm, steril	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Skalpell	Feather, Osaka, JP
Transwelleinsätze, 0,4 µm (6-Well, 24-Well)	Sarstedt, Nümbrecht, DE

Whatman-3MM Filterpapier	FE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz, DE
Zellkulturflaschen Vent. Cap (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber 25 mm	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.3 Kit Systeme

Kit	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim, DE
Nucleospin RNA	Macherey Nagel, Düren, DE
DuoSet ELISA PDGF-AA	RD Systems, Minneapolis, US
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Human XL Cytokine Array Kit	RD Systems, Minneapolis, US
TaqMan™ Fast Reagent Starter Kit	Thermo Scientific, Schwerte, DE
RNAscope® 2.5 HD Duplex Detection Kit	Advanced Cell Diagnostics, Newark, US

2.4 Software

Software	Hersteller
Axiovision 4.6	Carl Zeiss, Jena, DE
BD FACSDiva v8.0.3 Software	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FlowJo v10.0.8	Flowjo LLC, Oregon, US
EvolutionCapt	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
i control™ Microplate Reader	Roche, Basel, CH
Gimp 2.10	Das GIMP-Team
GraphPad 6.01	GraphPad Software, San Diego, US
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband, NIH, Maryland, US
Microsoft Excel 365	Microsoft Corporation, Redmond, US
Microsoft Powerpoint 365	Microsoft Corporation, Redmond, US
ViiA™ 7 Software v1.2.4	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
ChatGPT Version 5	OpenAI, Inc, San Francisco

2.5 Chemikalien, Puffer und Lösungen

2.5.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
2-Propanol (Isopropanol, IPA)	Sigma-Aldrich, München, DE
Acrylamid/Bis-acrylamid, 30%	Sigma-Aldrich, München, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, DE
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	GE Healthcare Europe, München, DE
Biocoll	Biochrom, Berlin, DE
Benzamidin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA, Pasching, AT
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fetales Kälberserum (FCS) 10 %	GE Healthcare Europe, München, DE
FACSFlow Sheath Fluid, 20 l	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FACSRinse Solution, 5 l	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Fc Block™ Reagent	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FluorSave Reagent	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, DE
Grams Kristallviolett-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Leupeptin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Methylthiazolyldiphenyl- tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, München, DE
Nagellack Pro Shine	Manhattan, Paris, FR
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumorthovanadat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Paraformaldehyd 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PageRuler™	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	GE Healthcare Europe, München, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, DE
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, München, DE
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Darmstadt, DE
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-Medium	Life Technologies, Darmstadt, DE
Salzsäure 1,0 M	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
SuperSignal™ West Dura	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Chemilumineszenz-Substrat	
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Tris base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma-Aldrich, München, DE
Triton	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DE
Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)	Entsalzungsanlage des Hauses
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE

2.5.2 Puffer und Rezepturen

Puffer / Lösung	Rezeptur
Allgemeine Puffer und Lösungen	
PBS (10x)	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ 1:10 verdünnen für PBS (1x)
Grundpuffer Lyse	50 mM HEPES 150 mM NaCl 50 mM NaF 2 mM EDTA 1 % (v/v) Triton x-100 10 % (v/v) Glycerol
Lysepuffer	10 mM Benzamidin 2 mM Natriumorthovanadat 1 µg/ml Leupeptin 3,4 µg/ml Aprotinin 1 mM PMSF in Grundpuffer Lyse
MTT Lösung	5 mg/ml MTT in PBS (1x)
Durchflusszytometrie	
FACS	0,5 % (m/v) BSA 0,5 mM EDTA in PBS (1x)
Blockpuffer	20 % (v/v) Fc Block Reagenz in FACS Puffer
Permeabilisierungspuffer	0,1 % Triton X-100 in FACS Puffer
Fixierlösung	2 % (v/v) PFA in PBS (1x)

Magnetische Zellseparation

MACS	0.5 % (m/v) BSA 2 mM EDTA in PBS (1x)
------	---

Western Blot

Trenngel Stocklösung (12 %)	1,5 M Tris base pH 8,8 0,1 % (m/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol
Sammelgel Stocklösung	1,5 M Tris base pH 6,8 0,1 % (m/v) SDS
Laufpuffer (10x)	35 mM Tris base 1,9 M Glycin 250 mM SDS 1:10 verdünnen für Laufpuffer (1x)
TBS (10x)	100 mM Tris base 1,5 M NaCl pH mit HCl auf 7,6 einstellen 1:10 verdünnen für TBS (1x)
TBST	TBS (1x) 0,05 % (v/v) Tween-20
Blotpuffer (10X)	35 mM Tris base 1,9 M Glycin 1:10 verdünnen 20 % (v/v) Methanol für Blotpuffer (1x)
Ladepuffer (4x)	50 ml Lysepuffer 0,005 % (m/v) Bromphenolblau 2,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Blocklösung	5 % (m/v) Milchpulver in TBST

Immunfluoreszenz

Fixierlösung	4 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS (1x)
Permeabilisierungspuffer	0,3 % (v/v) Tween-20 in PBS (1x)
Blocklösung	10 % (m/v) BSA 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS (1x)
Antikörper-Grundlösung	1 % (m/v) BSA 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS (1x)
Waschpuffer	0,1 % (m/v) BSA 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS (1x)
Kernfärbelösung	0,1 % (v/v) Hoechst33258 in Antikörpergrundlösung

Antikörper Multiplex Array

Array Puffer (1x)	4 ml Array Buffer 4 8 ml Array Buffer 6
Antikörperstocklösung	Detection Antibody Cocktail in 200 µl ddH ₂ O
Antikörperlösung	120 µl Antikörperstocklösung in 6 ml Array Puffer (1x)
Waschpuffer (1x)	40 ml Wash Buffer Concentrate in 960 ml ddH ₂ O
Entwicklungslösung	1 ml Chemi Reagent 1 1 ml Chemi Reagent 2
Streptavidin-HRP (1x)	10 % (v/v) Streptavidin-HRP Stocklösung in Array Buffer 6

2.6 Zellbiologisches Material

2.6.1 Zelllinien

Zelllinie	Information
HER2 positive gastroösophageale Epithelzellen	
NCI-N87	Isoliert aus einer Lebermetastase eines gastrischen tubulären Adenokarzinoms. Das Alter des männlichen Patienten ist unbekannt. Gut differenziert, G2 (UICC)
PT1590	Isoliert aus einem ösophagealen Adenokarzinom. Das Alter der weiblichen Patientin ist unbekannt. Schlecht differenziert, G4 (UICC)
LN1590	Isoliert aus einer Lymphknotenmetastase eines ösophagealen Adenokarzinoms. Das Alter der weiblichen Patientin ist unbekannt. Schlecht differenziert, G4 (UICC)
HER2 negative gastroösophageale Epithelzellen	
SKGT4	Isoliert aus dem ösophagealen Adenokarzinoms eines 86 Jahre alten kaukasischen Mannes. Gut differenziert, G2 (UICC)
OE33	Isoliert aus dem ösophagealen Adenokarzinom einer 73 Jahre alten kaukasischen Frau. Schlecht differenziert, G4 (UICC)
PT6216	Isoliert aus dem ösophagealen Adenokarzinoms eines 46 Jahre alten Mannes. Moderat differenziert, G3 (UICC)
Monozyten	
THP-1	Isoliert aus dem Blut eines an akuter monozytären Leukämie erkrankten 1-jährigen Jungen. Alle monozytären Funktionen sind erhalten.

2.6.2 Zellkultur Medien und Zusätze

Zelllinie	Medium
Erhaltungskultur	
NCI-N87	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen/Strep
PT1590	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen/Strep
LN1590	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen/Strep
SKGT4	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen/Strep
PT6216	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen/Strep
THP-1	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Pen/Strep
Kokulturversuche	
NCI-N87	
PT1590	
LN1590	RPMI 1640
SKGT4	10 % (v/v) FCS
PT6216	1 % (v/v) Pen/Strep
co	
THP-1	
Stimulierungsversuche	
PT1590	RPMI 1640
co	1 % (v/v) FCS
THP-1	1 % (v/v) Pen/Strep

2.7 Molekularbiologisches Material

2.7.1 TaqMan™ Sonden

Alle TaqMan™ Sonden wurden bei Thermofischer Scientific erworben und verfügen über das 6-Carboxyfluorescein / Minor groove binding (FAM/MGB) Reportersystem.

TaqMan™ Sonde	Bindungslokalisation	Assay-ID
PDGFA	Chr.7: 497245-520668 Exon 2 - 3	Hs00964426 m1
PDGFRA	Chr.4: 54229097-54298245 Exon 15 - 17	Hs00998018 m1
STAT3	Chr.17: 42313324 - 42388505 Exon 14 - 15	Hs00374280 m1

2.7.2 Small-interfering RNA's

Alle siRNA's wurden bei Thermofischer Scientific erworben und sind validiert und qualitätskontrolliert. Die siRNA's für STAT3 und PDGFRA wurden in Form der 'stealth' Konfiguration erworben.

siRNA	Stockkonzentration	siRNA-ID
STAT3	20 µM	HSS110279
PDGFRA	20 µM	HSS107751
Negative control siRNA	50 µM	AM4635

2.7.3 RNA-Scope Sonden

Alle RNA-Scope Sonden wurden bei ASC Biotechnie erworben und sind validiert und qualitätskontrolliert.

Sonde	Zielregion/Kanal	Accession Nr.
CD68	367 - 1149 / C2	NM001040059.1
PDGFA	942 - 1881 / C1	NM033023.4

2.8 Biochemisches Material

2.8.1 Antikörper

Spezifität	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper			
AKT	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
CD68	Hase/IgG	1:150 (TMA)	Cell Signaling
CD163 (D6U1J)	Hase/IgG	1:100 (TMA)	Cell Signaling
Cyclin D1	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Cyclin E1	Maus/IgG1	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Erk1/2	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
HSP90	Hase/polyklonal	1:2500 (WB)	Cell Signaling
iNOS	Hase/IgG	1:600 (TMA)	Cell Signaling
pAKT	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
PARP	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
pSTAT3	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
pERK1/2	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
pSTAT3 D3A7	Hase/IgG	1:100 (TMA)	Cell Signaling
STAT3	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
STAT3 124H6	Maus/IgG2a	1:100 (TMA)	Cell Signaling
		1:400 (IFF)	
Ki67	Maus/IgG1	1:100 (TMA)	Dako Omnis
		1:100 (IFF)	
p-PDGFR α	Hase/polyklonal	1:1000 (WB)	Cell Signaling
		1:100 (TMA)	
PDGFR α	Maus/IgG1	1:1000 (WB)	Santa Cruz
HER2/ErbB2	Maus/IgG1	1:1000 (WB)	Cell Signaling
Sekundärantikörper			
Hase IgG-HRP	Ziege/polyklonal	1:5000 (WB)	Cell Signaling
Maus IgG-HRP	Pferd/polyklonal	1:5000 (WB)	Cell Signaling
Maus IgG-Alexa Fluor 555	Ziege/polyklonal	1:500 (IFF)	Thermo Fischer
Maus IgG-Alexa Fluor 488	Ziege/polyklonal	1:500 (IFF)	Thermo Fischer
Hase IgG-Alexa Fluor 488	Ziege/polyklonal	1:500 (IFF)	Thermo Fischer

Antikörper für Durchflusszytometrie

CD14-PE	Human/IgG1	1:50 (FC)	Miltenyi Biotec
---------	------------	-----------	-----------------

2.8.2 Wachstumsfaktoren und Zytokine

Faktor	Stockkonzentration	Hersteller
CCL3	1 mg/ml	PeproTech
CXCL8	1 mg/ml	PeproTech
CCL19	1 mg/ml	PeproTech
CCL20	1 mg/ml	PeproTech
EGF	1 mg/ml	PeproTech
Osteopontin	1 mg/ml	PeproTech
PDGF-AA	1 mg/ml	PeproTech
Rantes	1 mg/ml	PeproTech

2.8.3 Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden bei Absource Diagnostics GmbH erworben. Die Arbeitskonzentration stellt die durch Dosis-Wirkungs-Experimente ermittelte IC50 dar.

Inhibitor	Stockkonzentration	Arbeitskonzentration
Crenolanib	10 mM	PT1590: 0,5 µM
Lapatinib	10 mM	PT1590, LN1590: 2 µM NCI-N87: 0.5 µM
Nappabucasin	10 mM	PT1590: 0,5 µM

3. Methoden

3.1 Histologische Methoden

3.1.1 Tissue Microarray

Das Tissue-Microarray-Verfahren stellt eine Hochdurchsatzmethode dar, die es ermöglicht, auf Proteinebene eine Vielzahl von Gewebeproben simultan zu untersuchen. Man erhält histomorphologische Information über die Proteinexpression und über die räumliche Verteilung des Proteins. Insbesondere bei der Untersuchung von Tumorgewebe, das über eine ausgeprägte intratumorale Heterogenität verfügt, ist die Information über die räumliche Verteilung des Proteins von großer Bedeutung. Der TMA wurde vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt. Hierfür wurden Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebe von 398 Patienten mit einem pathologisch diagnostizierten GEAC verwendet. Für die Auswahl tumorrepräsentativer Bereiche wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Nach der Auswahl geeigneter Bereiche wurden anschließend mit Hilfe eines automatischen Stanzsystems Gewebezyylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus dem Donorblock entnommen und in einen aus Paraffin bestehenden Empfängerblock überführt.

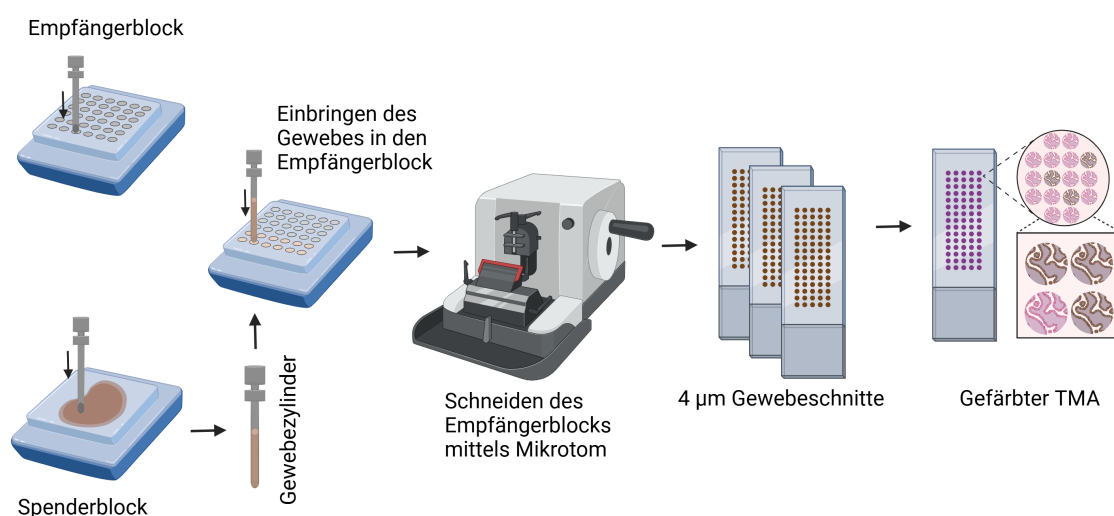


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Tissue Microarray-Konstruktion: Mit Hilfe eines Gewebezyinders werden repräsentative Tumorbereiche ausgestanzt und in einen Paraffin-Empfängerblock überführt. In diesen wurden zuvor mit der gleichen Stanze dazu kongruente Säulen gestanzt. Aus diesem TMA-Block können 4 µm dicke Gewebeschnitte mit einem Mikrotom angefertigt und anschließend histochemisch gefärbt werden. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [304])

Daraufhin wurde der TMA Block für 10 min bei 60 °C erhitzt um die Gewebezylinder mit dem Paraffin zu verschmelzen. Dies sorgt für eine höhere Stabilität und ermöglicht ein sicheres Schneiden. Im Anschluss konnte der TMA für das Schneiden von 4 µm dicken Schnitten mit einem Mikrotom verwendet werden (**Abb. 8**).

3.1.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode zur spezifischen Markierung und Detektion von Proteinen in Gewebeproben mittels Antikörpern. Die oben beschriebenen Gewebeschnitte des TMA wurden für die weitere Verarbeitung zunächst entparaffiniert. Dieser Prozess beschreibt die Rückführung der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte in ein wässriges Milieu. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst jeweils dreimal für fünf Minuten mit reinem Xylol inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 % und 50 %iges Ethanol) für jeweils fünf Minuten. Nachdem die Gewebeschnitte dreimal für 5 min in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen wurden, erfolgte das hitzeinduzierte Antigen-Retrieval. Durch die Fixierung der Gewebe in Formalin und die Einbettung in Paraffin werden die zu färbenden Antigene mit vielen anderen Proteinen quervernetzt und sind dadurch für viele Antikörper nicht mehr zugänglich. Hierfür wurden die Gewebeschnitte für 15 min in TrisEDTA-Puffer in der Mikrowelle bei 900 Watt gekocht. Anschließend wurden die Objektträger rasch auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte das Blockieren endogener Peroxidasen durch die Inkubation der Gewebeschnitte in 0,3 % Wasserstoffperoxid für 10 Min. Nachdem die Schnitte dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen worden waren, konnten die Gewebeschnitte mit den Primärantikörpern (CD68, CD163, iNOS, STAT3, p-STAT3 und p-PDGFR α) inkubiert werden. Hierfür wurden die Antikörper wie in Kapitel 2.8.1 in PBS-T verdünnt und mit den Gewebeschnitten versetzt und anschließend über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer mit dem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert (EnVision-+-System-HRP anti mouse/rabbit). Nachdem die Gewebeschnitte erneut dreimal für 5 min in PBS-T gewaschen wurden, erfolgte die Substratreaktion (AEC-Substrat-Chromogen) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach der Entwicklung des Signals wurde die Reaktion in Leitungswasser gestoppt. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Meyers Haemalaun für 5 min, gefolgt von einer kurzzeitigen Differenzierung in Leitungswasser. Nachdem die Gewebeschnitte in aufsteigenden Ethanolen dehydriert wurden, folgte abschließend die Versiegelung der Gewebeschnitte im VectaMount-Eindeckmedium.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden routinemäßig in 75 cm² Zellkulturflaschen und 12 ml Zellkulturmedium (**siehe 2.6.2**) kultiviert. Die Arbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank mit autoklavierten und sterilen Materialien statt. Für die Erhaltungskultur wurden die Zelllinien bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % - 90 % passagiert. Dabei wurde zunächst das Zellkulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe der Serinprotease Trypsin wird das Ablösen der adhären Zellen vom Flaschenboden ermöglicht. Nachdem das Ablösen der Zellen im Mikroskop bestätigt wurde, konnte die Zellsuspension in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Die Inhibition des Trypsins wurde durch Zugabe eines äquivalenten Volumens vorgewärmten Zellkulturmediums erreicht. Anschließend wurden die Zellen bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde abschließend in einem Verhältnis von 1:5 in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die THP-1-Makrophagen werden als Suspensionkultur in Form von Monozyten kultiviert. Alle zwei Wochen wurden die Monozyten wie oben beschrieben passagiert. Da die Zellen in Suspension gehalten werden, konnte hier auf die Zugabe von Trypsin verzichtet werden. Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % Humidität kultiviert.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Alle Zellen wurden im flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert. Da das Auftauen der Zellen einen außerordentlich stressvollen Prozess darstellt, müssen die Zellen sehr schnell und vorsichtig aufgetaut werden. Zunächst wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und vorgewärmtes Medium wurde tröpfchenweise in das Kryogefäß überführt. Nachdem das gefrorene Zellpellet vollständig resuspendiert war, wurde die Zellsuspension in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 ml vorgewärmtem Medium durchmischt. Daraufhin wurde die Zellsuspension für 5 min bei 400 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Abschließend konnte das Zellpellet in 12 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt werden. Durch die Bildung von Eiskristallen, die zu einer mechanischen Lyse der Zellen führen kann, muss das Einfrieren von Zellen im Vergleich zum Auftauen sehr langsam erfolgen. Dies wird durch die Zugabe von kryoprotektiven Substanzen erreicht. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 % DMSO (v/v) in FCS resuspendiert und pro Kryogefäß wurden 1 ml Zellsuspension überführt. Die Kryogefäße wurden in einen Cool-Cell-Behälter überführt und für 24 h bei -80 °C eingefroren und daraufhin bei -196 °C gelagert.

3.2.3 Isolierung mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Für die indirekte Kokultur der GEAC-Zellen mit naiven Makrophagen, wurden zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Spendern isoliert. Für alle Spender lag eine schriftliche Einwilligung vor. Zu Beginn erfolgte die strukturierte Blutentnahme nach den üblichen hygienischen Standards. Es wurden pro Experiment vier große EDTA-Monovetten Blut abgenommen. Daraufhin wurde das Blut aus jeweils zwei Monovetten in ein 50-ml-Reaktionsgefäß zusammengeführt und mit PBS auf 35 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 15 ml des Separationsmediums (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) mit dem verdünnten Blut überschichtet und bei 600 g für 20 min zentrifugiert. (**Abb. 10A**).

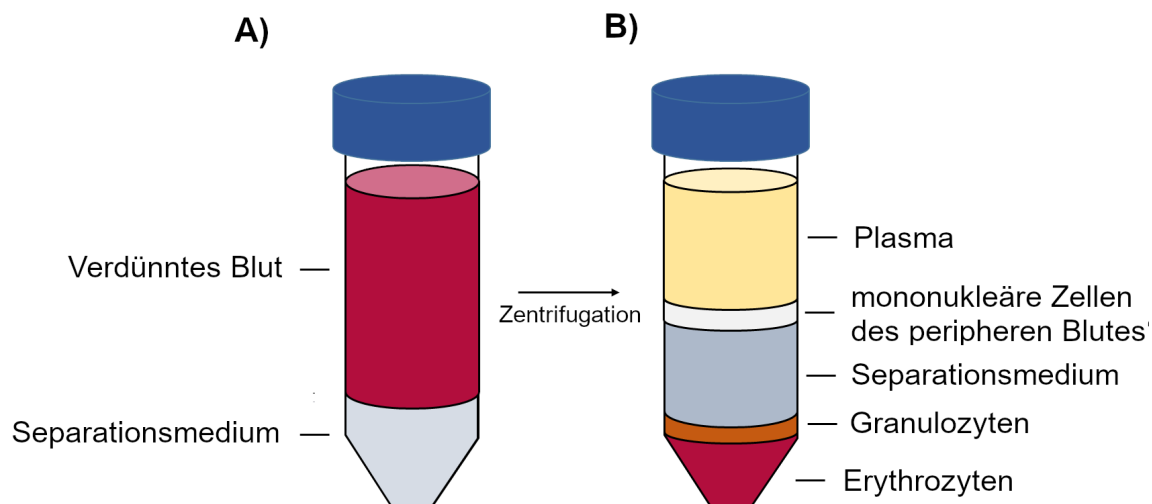


Abbildung 10: Schema der Dichtegradientenzentrifugation: **A)** In einem 50 ml Reaktionsgefäß werden 15 ml Separationsmedium vorgelegt. Dieses wird sehr langsam mit verdünntem Blut überschichtet und anschließend zentrifugiert. **B)** Nach der Zentrifugation entstehen durch die unterschiedlichen Dichten Phasenringe. Ein Phasenring enthält die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welche für die weiteren Experimente genutzt werden.

Die Zentrifugation erfolgte bei niedriger Beschleunigung und ohne Bremse. Durch die Zugabe des Separationsmediums und der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation resultieren Phasenringe, die die PBMC von den Erythrozyten und Granulozyten abtrennen (**Abb. 10B**). Das ermöglicht im weiteren Schritt das sichere Isolieren des Interphase-Rings mit einer sterilen Pipette. Die isolierten PBMC wurden daraufhin in ein neues 50-ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 50 ml PBS durchmischt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die PBMC wurden drei weitere Male wie oben beschrieben gewaschen. Abschließend konnte das Pellet in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und die Zellzahl der PBMC bestimmt werden.

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte manuell mittels Neubauer Zählkammer. Nachdem die Zellen von der Zellkulturflasche oder einem Well einer Zellkulturplatte in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 400 g zentrifugiert wurden, konnte das Pellet mit frischen Zellkulturmedium resuspendiert werden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Trypan Blau Lösung 1:10 (v/v) verdünnt und 10 µl der Verdünnung in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Trypan Blau ist ein anionischer Bisazofarbstoff, der nicht von vitalen Zellen aufgenommen wird und somit die Detektion apoptischer und perforierter Zellen ermöglicht. Es wurden jeweils die nicht gefärbten Zellen in vier Großquadranten gezählt und die Zellzahl pro ml mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{ausgezählte Zellen in 4 Großquadranten} * 10^4 * \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

3.2.5 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation stellt ein antikörper-basiertes Verfahren dar, welches eine selektive Isolation von Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker aus einer Zellsuspension ermöglicht. Dabei werden target-spezifische Antikörper über Polysaccharidketten an superparamagnetische Microbeads gekoppelt, mit den Zellen inkubiert und anschließend über einen Permanentmagneten wieder isoliert.

Die Isolation der Monozyten aus den zuvor separierten PBMC erfolgte mittels negativer Selektion. Hierfür wurden die Microbeads mit Antikörpern gekoppelt, die gegen spezifische Oberflächenmarker von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Mastzellen gerichtet sind. Diese Herangehensweise gewährleistet eine Isolation der Monozyten ohne vorzeitige Aktivierung. Alle Arbeiten fanden auf Eis und mit gekühlten Puffern und Lösungen statt. Zu Beginn wurden 40 µl des MACS-Puffers mit 10^7 Zellen durchmischt. Anschließend wurden 10 µl FcR-Blocking-Lösung und 10 µl des Biotin-Antikörper-Cocktails hinzugegeben und für 5 min bei 4 °C inkubiert. In einem nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Biotin-gekoppelter Microbeads. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C, wurden 3 ml MACS-Puffer hinzugegeben und der gesamte Ansatz in eine LS-MACS-Säule pipettiert. Diese wurde zuvor im Magnetfeld eines Permanentmagneten fixiert. Durch das Magnetfeld kommt es zu einer Retention aller Microbead-gebundenen Zellen und der Durchfluss enthält angereicherte Monozyten. Die Reinheit der Monozyten wurde zunächst in der CD14-Durchflusszytometrie beurteilt und daraufhin konnten die Monozyten für die indirekte Kokultur differenziert werden.

3.2.6 Indirekte Kokultur

den Einfluss der Makrophagen auf den Phänotyp der GEAC-Zellen zu charakterisieren, wurde ein indirektes Kokultursystem verwendet. Dieses System stellt eine Möglichkeit dar, die parakrine Interaktion zwischen zwei Zellpopulationen zu untersuchen. Es wurden Transwell-Einsätze verwendet, die eine Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$ aufweisen, um sicherzustellen, dass die Interaktionen der Zellen ausschließlich über lösliche Faktoren stattfinden. Als Makrophagen-Modell wurde die immortalisierte Monozyten-Zelllinie THP-1 verwendet. Diese wurde zunächst für 24 Stunden mit $50\ \text{ng/ml}$ Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) behandelt und anschließend für drei Tage in Kultur gehalten. Dieses Differenzierungsschema führt zu einem naiven Makrophagenphänotyp. Darüber hinaus wurden ausgewählte Experimente mit primären monozytenabgeleiteten Makrophagen (MDM) verifiziert. Hierfür wurden die, wie oben beschrieben, isolierten Monozyten für drei Tage in FCS-haltigem Medium in einen naiven Makrophagenphänotyp differenziert und konnten anschließend für die Kokultur eingesetzt werden.

Zu Beginn müssen die Makrophagen und die GEAC-Zellen getrennt im Transwell beziehungsweise Well in ihrem Medium anwachsen. Dabei wurden $2 \cdot 10^5$ Makrophagen pro 6-Well-Transwell ausplattiert. Die PT1590-, LN1590-, OE33- und SKGT4-Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ ausplattiert, während die NCI-N87- und PT6216-Zellen in einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ ausplattiert wurden. Nach 24 Stunden fand ein Wechsel des Mediums statt und die Transwell-Einsätze mit den Makrophagen wurden in die Wells der GEAC-Zellen gesetzt. Ab diesem Zeitpunkt startete die Kokultur und wurde nach drei Tagen beendet (**Abb. 11**).

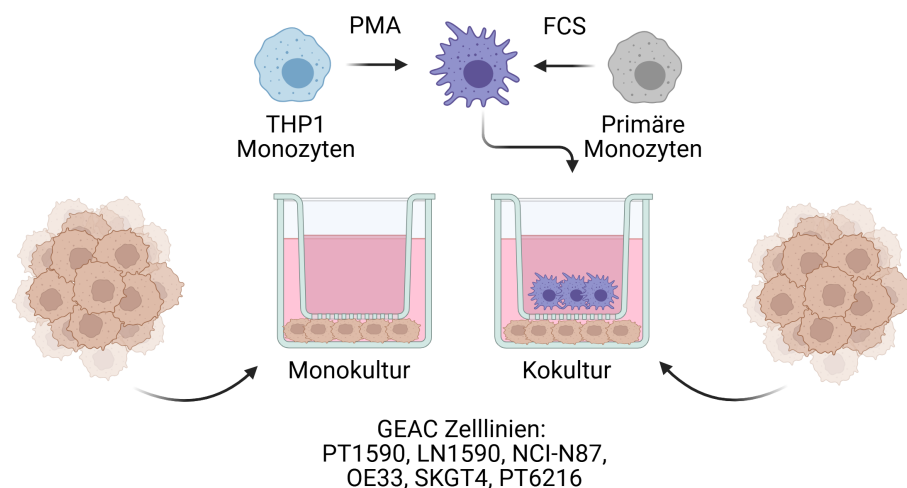


Abbildung 11: Versuchsaufbau der indirekten Kokultur: Die THP1-Monozyten werden für 24 Stunden mit $200\ \text{nM}$ Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) inkubiert. Dies dient einer Differenzierung dieser Zellen in Makrophagen. Zur weiteren Verifizierung erfolgte die Kokultur auch mit primären Monozyten, die aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes von gesunden Spendern isoliert wurden. Als Modell des GEAC dienen die Zelllinien PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Diese Zellen werden für 72 Std indirekt mit den Makrophagen kokultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich in Abwesenheit der Makrophagen kultiviert.

3.2.7 Bestimmung der Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch den 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay. Dieser Test stellt ein kolorimetrisches Verfahren dar und beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität, welche unter den meisten Kulturbedingungen mit der Vitalität der Zellen korreliert. Dabei wird das gelb lösliche MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein violettes unlösliches Formazan reduziert. Die Absorption des Formazans kann photometrisch bestimmt werden und ist proportional zur Menge der vitalen Zellen.

Für die Messung der Zellvitalität erfolgte die indirekte Kokultur als Replikat in einem 24-Well-Format. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Mono- und Kokulturen mit einer IC₅₀-Dosis (siehe 2.8.3) des TKI Lapatinib behandelt. Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Zugabe von 0,5 mg/ml MTT-Reagenz direkt in das Medium der Mono- und Kokulturen. Anschließend inkubierten die Kulturen für 90 min bei 37 °C. Daraufhin wurde der Überstand aspiriert und die Formazan gefärbten Zellen mit 600 µl DMSO resuspendiert. Diese Lösung wurde anschließend bei 560 nm im Photometer gemessen. Die Inhibition der Proteine STAT3 oder des Rezeptors PDGFR α erfolgte bei Start der Kokultur und gleichzeitig mit Lapatinib an Tag drei. Die gemessene Absorption der Versuchsansätze wurde auf eine unbehandelte oder DMSO-behandelte Monokultur normalisiert und als prozentualer Anteil der vitalen Zellen angegeben (**Abb. 12**).

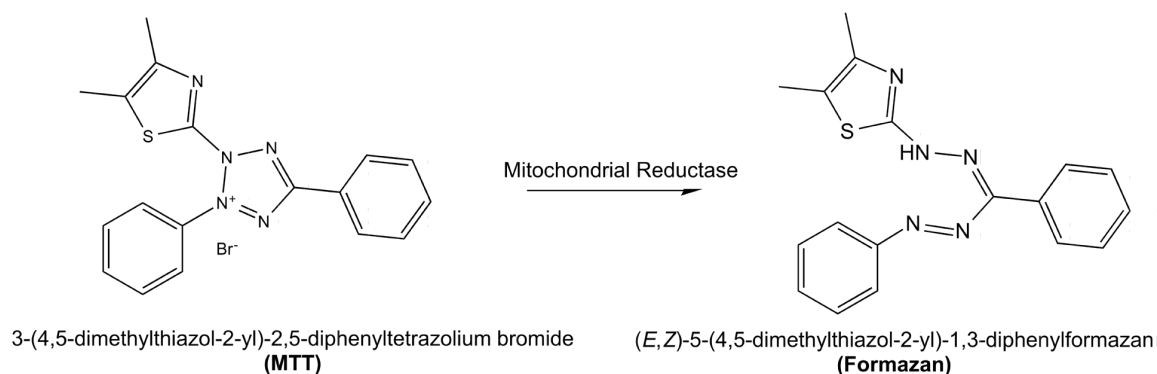


Abbildung 12: Reaktionsablauf MTT-Assay: Das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz wird von vitalen Zellen aufgenommen und vornehmlich in den Mitochondrien durch die Succinat-Dehydrogenase NADH abhängig reduziert. Das daraus entstehende blauviolette wasserunlösliche Formazan kann nach Zugabe durch Lösungsmittel (DMSO) photometrisch bestimmt werden.

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Durch die Erhaltung der zellulären Integrität ermöglicht die Immunfluoreszenzfärbung (IFF) eine Beurteilung der zellulären und subzellulären Verteilung der Antigene. Im vorliegenden Projekt wurde die IFF zum Nachweis von Ki67, E-Cadherin und Vimentin verwendet. Für alle IFF wurden die Epithelzellen wie unter 3.2.6 auf sterilisierten Deckgläschen ausgesät und für drei Tage mono- bzw. kokultiviert. Am Ende des Experiments wurden die Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette in eine neue 12-Well-Platte überführt und in der Fixierlösung für 10 min bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen dreimal in PBS für 5 min gewaschen wurden, folgte für den intrazellulären Nachweis von Ki67 und Vimentin eine Permeabilisierung der Zellmembran in Permeabilisierungspuffer für 5 min bei RT. Anschließend wurden unspezifische Proteinbindungsstellen durch die Inkubation in Blockpuffer für 45 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Nachdem die Deckgläschen in eine Feuchtkammer überführt wurden, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen dreimal in Waschpuffer für 5 min gewaschen und daraufhin für 60 min bei RT in einer Feuchtkammer mit dem fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (Ki67: Maus-IgG-Alexa-Fluor-555, E-Cadherin: Hase-IgG-Alexa-Fluor-488, Vimentin: Maus-IgG-Alexa-Fluor-555). Nachdem die Deckgläschen drei mal für 5 min in Waschpuffer gewaschen wurden, folgte die Inkubation der Zellen mit der Kernfärbelösung für 5 min bei RT. Danach folgte ein dreimaliger Waschschrift für 5 min und die Deckgläschen wurden abschließend in FluorSave Reagent eingedeckelt. Für eine Langzeitlagerung wurden die Deckgläschen zusätzlich mit durchsichtigem Nagellack umrandet. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert.

3.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) erlaubt eine multiparametrische Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Merkmale von bis zu Tausenden einzelner Zellen pro Sekunde. Zu den gemessenen physikalischen Eigenschaften gehören Größe und Granularität der Zellen. Darüber hinaus können biochemische Eigenschaften durch Markierung der Zellen mit protein-spezifischen Antikörpern analysiert werden. Dabei fließen die Zellen in einem Strom von Medium und passieren mehrere Laserstrahlen, die gestreutes Licht aus verschiedenen Winkeln emittieren. Während das Licht von vorne um die Ränder der Zelle herum abgelenkt wird und ein Beugungsmuster erzeugt, das dem Zellumfang entspricht (Vorwärtsstreuung (FSC)), ist das gestreute Licht aus einem 90°-Winkel proportional zur Granularität der Zelle (Seitenstreuung (SSC)). Darüber hinaus kann das von Antikörpern emittierte Licht, das mit Fluorophoren markiert ist, ein Spektrum von Zelloberflächen- und intrazellulären Proteinen detektieren.

Die FACS-Analyse wurde dafür genutzt, um die Reinheit der Monoyten zu bestimmen, die mittels MACS aus PBMC isoliert worden sind. Zunächst wurde die Zellzahl der isolierten Zellen bestimmt und pro Ansatz $1 \cdot 10^5$ Zellen in 25 μ l PBS in FACS-Röhrchen überführt. Um unspezifische Fc-vermittelte Bindungen zu verhindern, erfolgte anschließend ein Fc-Block für 10 min bei 4 °C in einem FcR-Blocking-Reagenz. Nachdem die Zellen mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen und mit 400 g für 10 min zentrifugiert wurden, konnte der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 25 μ l Antikörperlösung (anti-CD14-PE-Antikörper) resuspendiert werden. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 4 °C für eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen und erneut mit 400 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in 50 μ l 1 %-iger Formaldehydlösung resuspendiert und die Zellen somit fixiert. Die Messung der Zellen wurde mit einem LSR II-Durchflusszytometer durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit der Software FlowJo.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

Die Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA) erfolgte mit dem NukleoSpin® RNA Extraction Kit und wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Nach Aspiration der Mono- bzw. Kokulturüberstände wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 350 μ l pro Well des Lysepuffers RA1 lysiert. Dieser Lysepuffer enthält neben chaotropen Salzen auch β -Mercaptoethanol, welches in Kombination den Abbau der RNA durch die Inaktivierung der RNAsen verhindert. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Proben entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Dabei wurden die Lysate zunächst in die NukleoSpin® Filtrationssäule überführt und daraufhin für 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Für eine optimale Bindungseigenschaft der RNA wurde der Durchfluss anschließend mit 350 μ l Ethanol 70 % versetzt und homogenisiert. Danach konnte das Homogenisat in die NukleoSpin® Bindungssäule überführt und für 30 s bei 11 000 g zentrifugiert werden. Nachdem die Silikonmembran der Bindungssäule mit 350 μ l MDB-Puffer und anschließender Zentrifugation für 30 s bei 11000 g entsalzt wurde, konnten Reste der kontaminierenden genomischen DNA durch die Zugabe einer rekombinanten DNase (10 μ l DNase + 90 μ l Reaktionspuffer pro Probe) und anschließender Inkubation bei RT für 15 min verdaut werden. Die Reaktion des DNA-Verdaues wurde durch das Waschen mit 200 μ l des Waschpuffers RAW2 beendet. Zwei weitere Waschschrte mit jeweils 600 μ l und 250 μ l des Waschpuffers RA3 dienten zur Reinigung der RNA. Nachdem die Membran der Säule durch eine Zentrifugation für 2 min bei 11 000 g getrocknet wurde, konnte die RNA mit 40 μ l - 60 μ l nukleasefreiem Wasser eluiert und in einem nukleasefreien 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß aufgefangen werden. Abschließend wurde die isolierte RNA bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte mittels Nanodrop-Spektrophotometer. Dabei ermöglicht die Eigenschaft der DNA und RNA, bei einer Wellenlänge von 260 nm ultraviolettes Licht (UV) zu absorbieren, die Ableitung der Konzentration durch das Lambert-Beersche Gesetz. Im Rahmen dieser photometrischen Messung wird UV-Licht durch die Nukleinsäuren in der Probe absorbiert, wodurch proportional höhere optische Dichten (OD) resultieren. Folgende Angaben dienen zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration.

$$1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \text{ dsDNA} = 50 \text{ } \mu\text{g}$$

$$1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \text{ ssDNA} = 37 \text{ } \mu\text{g}$$

$$1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \text{ ssRNA} = 40 \text{ } \mu\text{g}$$

Während Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum von 260 nm aufweisen, zeigen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Durch die Ermittlung eines Quotienten dieser Absorptionsmaxima (A_{260}/A_{280}), lässt sich der Grad der Reinheit der Probe bestimmen. Dabei zeigen reine Nukleinsäureproben einen Quotienten von 1,8 bis 2,1.

3.3.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription beschreibt die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) aus einer ssRNA. Diese cDNA dient der DNA-Polymerase in der quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion als Matrize. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem First-Strand-Synthesis-Kit und wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 50 ng - 500 ng isolierte RNA für die Reaktion eingesetzt. Für die reverse Transkription wurden oligo(dT)₁₈ Primer verwendet. Diese Primer hybridisieren ausschließlich mit dem Poly(A)-Schwanz des 3'-Endes der mRNA. Dadurch wird mit der Moloney-Maus-Leukämievirus (rMoMuLV) reversen Transkriptase ausschließlich cDNA aus proteincodierender mRNA synthetisiert. Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten und wurde für 10 min bei 25°C, 145 min bei 37°C und für 5 min bei 85°C in einem Thermozykler inkubiert.

Reaktionsansatz pro Probe	
13,2 µl	50 ng - 500 ng RNA in ddH ₂ O
2.0 µl	10x RT Reaktionspuffer
0,8 µl	dNTP mix (100 mM)
2 µl	10x RT Primer
1 µl	Multiscribe reverse Transcriptase (50 U/µl)
1 µl	RNAse Inhibitor (20 U/µl)

3.3.4 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (TaqMan™)

Die quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) ermöglicht die simultane Amplifizierung und Quantifizierung bestimmter DNA-Fragmente. Diese molekularbiologische Technik basiert auf dem Prinzip der klassischen PCR, welches die exponentielle Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente beschreibt. Im vorliegenden Projekt wurde mit Hilfe der Taqman™-basierten qPCR die Expression bestimmter Gene in den Epithelzellen und Makrophagen untersucht. Die TaqMan™-Technik verwendet neben den genspezifischen Primern zusätzlich genspezifische fluorogene Taqman™-Sonden, die über ein Fluorochrom am 5'-Ende (FAM) und einen nicht fluoreszierenden Quencher (NFQ) am 3'-Ende verfügen. Zu Beginn der Reaktion wird das cDNA-Template denaturiert. Daraufhin hybridisieren sowohl die Primer als auch die Taqman™-Sonde an komplementäre Sequenzen der einzelsträngigen cDNA (Annealing). Anschließend synthetisiert die *taq*-DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang. Durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *taq*-DNA-Polymerase wird die TaqMan-Sonde während der Elongation verdaut, wodurch das Fluorochrom vom Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal emittiert wird. Dadurch entstehen mit jedem Zyklus weitere Fluoreszenzsignale, die proportional zur Menge des Amplikons sind. Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde der Schwellenwertzyklus (C_t) bestimmt. Dieser Wert gibt die Zykluszahl der PCR-Reaktion an, bei der das Fluoreszenzsignal das Signal des Hintergrunds übersteigt, und dient als relatives Maß für die Menge des gebildeten Amplikons.

Reaktionsansatz pro Probe		qPCR Programm (FAST)		
1 µl	1:4 diluted cDNA	1. Denaturierung	20 s	95°C
5.0 µl	5x TaqMan Puffer	2. Denaturierung	0,1 s	95°C
0,5 µl	TaqMan-Sonde und Primer	3. Elongation	20 s	60°C
0,2 µl	Rox Low	4. 35 Zyklen 2 to 2		
3.3 µl	nukleasefreies ddH ₂ O	5. Kühlen	hold	4 °C

Es wurde zunächst 1 µl der 1:4 verdünnten cDNA in die Wells der Lightcycler-96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz wie oben beschrieben angesetzt und 9 µl pro Well dazugegeben. Nachdem die Mikrotiterplatte mit qPCR-Klebefolie abgedeckt wurde, konnte die Mikrotiterplatte für 2 min bei 400 g zentrifugiert und anschließend in das ViiA 7 Real-Time PCR System gegeben werden. Das qPCR-Programm basiert auf einem 2-Schritt-FAST-Protokoll und wurde wie oben angegeben durchgeführt. Die C_t -Werte wurden als Replikate bestimmt und mittels komparativer C_t -Methode auf das Referenzgen GAPDH normalisiert.

3.3.5 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine natürliche posttranskriptionelle Modifikation, die als epigenetischer Regulationsmechanismus die Expression vieler Gene steuert. Dieser Mechanismus wird durch kleine, 20 - 30 bp große, nicht kodierende Mikro-RNA (miRNA) vermittelt. Sie verfügen über eine doppelsträngige Nukleinsäuresequenz, die komplementär zur 3' untranslatierten Region (3'-UTR) einer oder mehrerer proteinkodierender mRNA ist. Bindet die miRNA an eine proteinkodierende mRNA wird der RNA-induced silencing complex (RISC) gebildet und die mRNA verdaut und abgebaut. Daraus resultiert eine verminderte Translation der mRNA und Bildung des Proteins. Während miRNAs genetisch in der DNA codiert sind, werden small interfering RNA (siRNA) synthetisch hergestellt und können von der Zelle aufgenommen und weiter prozessiert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, sehr effektiv und spezifisch die Expression einzelner Gene *in vitro* und *in vivo* zu manipulieren.

Im vorliegenden Projekt wurde ein transienter siRNA-vermittelter Knockdown der Gene STAT3 und PDGFRA mit Hilfe des Lipofectamine-RNAiMAX-Transfektionskits durchgeführt. Die PT1590-Zellen wurden in einer Zellzahl von $4 \cdot 10^4$ (6-Well), $0,75 \cdot 10^4$ (24-Well) in ihrem Zellkulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Zellkulturmediums und anschließend wurde der Reaktionsansatz für die siRNA-Transfektion wie folgt angesetzt.

Reaktionsansatz 1 (6-Well / 24-Well)	
150 µl / 25 µl	Opti-MEM® serumfrei
9 µl / 1,5 µl	Lipofectamine® RNAiMAX
Reaktionsansatz 2 (6-Well / 24-Well)	
150 µl / 25 µl	Opti-MEM® serumfrei
30 pmol / 10 pmol	siRNA (siehe 2.7.2)
Transfektionsansatz (6-Well / 24-Well)	
150 µl / 25 µl	Reaktionsansatz 1
150 µl / 25 µl	Reaktionsansatz 2

Während einer Inkubation des Transfektionsansatz für 5 min bei RT, entstehen liposomale siRNA Komplexe, die sehr effizient von der Zelle aufgenommen werden können. Anschließend wurden 250 µl (6-Well) bzw. 25 µl (24-Well) des Transfektionsansatz tröpfchenweise in das Well gegeben. Am nächsten Tag wurden die transfizierten OE19 Zellen mit den THP-1 Makrophagen wie oben beschrieben kokultiviert. Die Effizienz des Knockdown wurde mittels qPCR und Western Blot validiert. Eine genunspezifische scrambled RNA (scrRNA) diente im Versuch als Kontrolle.

3.3.6 RNAScope

RNAscope ist ein RNA-in-situ-Hybridisierungsverfahren, das die Visualisierung einzelner und unterschiedlicher RNA-Moleküle in einzelnen Zellen in einer Vielzahl von Probenotypen ermöglicht. Durch die Möglichkeit, Formalin fixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe zu analysieren, erhält man durch die RNAscope-Methode eine Aussage über die räumliche Verteilung der Expression vieler Gene zur gleichen Zeit. Im vorliegenden Projekt wurde mit Hilfe des RNAscope-Hybridisierungsverfahrens die *PDGFA*-Genexpression der CD68-positiven Makrophagen in humanem Gewebe von GEAC-Patienten untersucht. Hierfür wurden in Paraffin eingebettete Großflächenschnitte, jener Patienten verwendet, die eine hohe Anzahl an intratumoralen Makrophagen aufwiesen. Das Verfahren wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte für 1 Stunde bei 60 °C in einem Hybridisierungs-Ofen inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte durch eine 10-minütige Inkubation in Xylol entparaffiniert, gefolgt von einer 2-minütigen Behandlung in einer absteigenden Ethanol-Reihe. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten in Wasserstoffperoxid inkubiert und daraufhin mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Demaskierung der Antigenbindungsstellen erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte in Target-Retrieval-Puffer für 2 min bei 360 W und dann für 12 min bei 900 W.

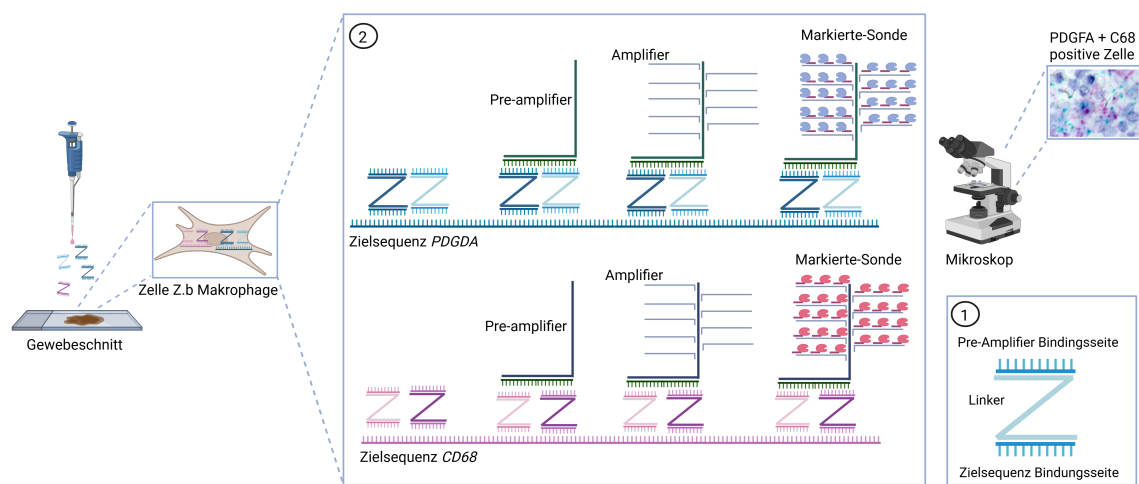


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Wirkweise von RNAscope: 1) Die RNAscope-Sonde (Z-Sonde) besteht aus einer DNA-Sequenz, welche am 5'-Ende eine Sequenz aufweist, die spezifisch für die Zielgenesequenz ist, während das 3'-Ende die Pre-Amplifier-Bindungsseite darstellt. Diese Sequenz dient als Andockstelle für die Pre-Amplifier-Oligonukleotide, die den ersten Schritt der Signalverstärkung einleiten. 2) Die Z-Sonden hybridisieren an der Ziel-RNA und sobald zwei Z-Sonden direkt nebeneinander an die Ziel-RNA binden (ZZ-Paar), schließen sich ihre Linker-Sequenzen zu einer Bindungsplattform für den Pre-Amplifier zusammen. Diese ist wiederum Bindungsstelle für die Amplifier und diese für die Detektionssonden, welche in diesem Fall an ein Enzym (Alkalische Phosphatase + Meerrettichperoxidase (HRP)) gekoppelt sind (modifiziert nach [305]).

Nachdem die Schnitte erneut für 30 s mit Wasser gewaschen worden waren, erfolgte mittels ImmEdge-Stifts das Einzeichnen von hydrophoben Barrieren um die Gewebeschnitte auf den Objektträgern. Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte mit Protease Plus für 30 min bei 40 °C im Hybez-Ofen inkubiert. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit den Target-Sonden PDGFA und CD68 bei 40 °C. Nach der Proteasebehandlung wurden die Schnitte mit Amplifikationslösungen 1–4 jeweils bei 40 °C und anschließend mit Amplifikationslösungen 5 und 6 bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Inkubationszeiten abwechselnd 30 Minuten und 15 Minuten betrugen. Für den alkalische-Phosphatase-basierten Nachweis wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 75 µL Fast-Red-Lösung inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Schnitte mit den Amplifikationslösungen 7–10, wieder abwechselnd für 30 Minuten und 15 Minuten. Für den HRP-basierten Nachweis wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 75 µL Fast-Green-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen und für 2 Minuten in saurer Hämatoxylinlösung gefärbt. Danach folgte eine 7-minütige Spülung mit Leitungswasser. Daraufhin mussten die gefärbten Gewebeschnitte für 15–30 min bei 60 °C im Ofen getrocknet werden. Nachdem die Schnitte bei Raumtemperatur abgekühlt wurden, erfolgte die Versiegelung der Präparate mit dem VectaMount-Eindeckmedium. Anschließend konnten die Gewebeschnitte mit der Hellfeldmikroskopie beurteilt werden (**Abb. 13**).

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Isolierung von Proteinen aus Ganzzelextrakten

Für die Analyse der Proteine im Western-Blot wurden zuvor aus den GEAC-Epithelzellen Ganzzelllysate hergestellt. Zu Beginn wurde das Medium der mono- bzw. kokultivierten Epithelzellen aspiriert und die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 - 150 µl Lysepuffer pro Well. Für die Herstellung des Lysats wurden die Zellen zunächst mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte abgekratzt, in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und daraufhin direkt auf Eis gestellt. Um die Effizienz der Lyse zu steigern, wurden die Ganzzelllysate mit drei Impulsen bei einer Amplitude von 120 µm für jeweils 2 s mit einer Sonicator sonifiziert. Die daraus entstandenen Zelldebris wurden mit einer Zentrifugation für 30 min bei 11000 g und 4°C abgetrennt. Abschließend wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die Konzentrationsbestimmung weiterverarbeitet.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode der Konzentrationsbestimmung basiert auf der Biuret-Reaktion. Diese beschreibt die Reduktion bivalenter Kupferionen durch Peptidbindungen der Proteine zu monovalenten Kupferionen unter alkalischen Reaktionsbedingungen. Anschließend werden durch die einwertigen Kupferionen und durch die Anwesenheit der Bicinchoninsäure (BCA) violette Chelatkomplexe gebildet, die bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch bestimmt werden können. Die Menge der reduzierten monovalenten Kupferionen ist dabei proportional zur Menge der Peptidbindungen [306, 307] .

Zu Beginn wurde aus einer BSA-Stocklösung (2 mg/ml) eine Standardreihe hergestellt, die einen Messbereich von 0 µg/ml bis 2000 µg/ml umfasste. Gleichzeitig wurden die Proteinproben je nach geschätzter Konzentration 1:2 bis 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Daraufhin wurden 10 µl des verdünnten Standards und 10 µl der verdünnten Proteinproben in einer Doppelbestimmung in eine 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurde die BCA-Gebrauchslösung angesetzt. Dabei wurden pro Messprobe 196,1 µl des Reagenz A mit 3,9 µl des Reagenz B vermischt und daraufhin 200 µl der BCA-Gebrauchslösung pro Well hinzugegeben. Daran anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Nach der Inkubation wurde die Absorption bei 560 nm photometrisch bestimmt. Mit Hilfe der gemessenen Extinktionen konnten eine Standardkurve erstellt und durch die lineare Regressionsanalyse die Konzentrationen der Proteinproben bestimmt werden.

3.4.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt ein biochemisches Trennverfahren dar, welches Proteine anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität trennt. Bei konstantem elektrischen Feld ist die elektrophoretische Mobilität im Wesentlichen abhängig von der molekularen Masse der Proteine. Dabei ist eine linearisierte Konformation und eine negative Netto-Oberflächenladung der Proteine eine wichtige Voraussetzung für die Wanderung der Proteine durch die Polyacrylamid-Trennmatrix. Aus diesem Grund wurden zu Beginn 10 µg - 20 µg der isolierten Proteine 1:4 mit dem Ladepuffer verdünnt und anschließend bei 95°C für 5 min aufgekocht. Der Ladepuffer enthält neben β-Mercaptoethanol auch das anionische Detergenz SDS. Während β-Mercaptoethanol durch das Reduzieren der Disulfidbrücken die Quartär- und Tertiärstruktur der Proteine denaturiert, bildet das SDS eine einheitliche negative Oberflächenladung der Proteine. Nach der Inkubation wurden die Proben kurz zentrifugiert und daraufhin aus Eis gestellt. Daran anschließend wurde das Trenn- und Sammelgel der SDS-PAGE wie unten beschrieben vorbereitet.

Trenngel (12 %)		Sammgel	
15 ml	Trenngel Stocklösung	7,5 ml	Sammgel Stocklösung
37,5 µl	APS 10 % (m/v)	30 µl	APS 10 % (m/v)
18,75 µl	TEMED	15 µl	TEMED

Nachdem das Trenn- und Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurden die Gele in die Elektrophoresekammer gespannt und diese mit 1x Ladepuffer befüllt. Anschließend wurden 20 µl - 30 µl der Proben und 5 µl des vorgefärbten PageRuler™ auf das Gel beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke und einer Spannung von 90 mV für 30 min. Sobald die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 150 mV erhöht.

3.4.4 Western Blot

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und immobilisiert wurden, konnten diese mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens spezifisch detektiert werden. Dieses antikörperbasierte Detektionsverfahren ermöglicht neben einem spezifischen Nachweis auch die Möglichkeit einer Quantifizierung der Proteine. Um die Proteine im Polyacrylamidgel für die Antikörperdetektion zugänglich zu machen, wurden diese zu Beginn auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und wie unten gezeigt mit der Nitrozellulosemembran und weiteren Filterpapieren gestapelt. Der anschließende elektrophoretische Transfer erfolgte

bei $1,25 \text{ mA/cm}^2$ für 60 min in 1x Blotpuffer. Das perpendicular angelegte elektrische Feld induziert dabei die Migration der negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran. Nach dem Transfer wurde die Membran für 15 min getrocknet und daraufhin für mindestens 45 min bei RT auf einem Schüttler in der Blocklösung inkubiert. Durch die Blockierung der freien Bindungsstellen werden unspezifische Antikörperinteraktionen verhindert und somit Hintergrundsignale reduziert. Danach wurde der Primärantikörper in der Antikörpergrundlösung wie in 2.8.1 beschrieben verdünnt und 5 ml dieser Lösung wurden mit der Membran in einem 50-ml-Reaktionsgefäß über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran viermal für 5 min in TBS-T gewaschen und anschließend für 60 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser wurde auch wie in 2.8.1 mit der Antikörpergrundlösung verdünnt. Nachdem die Membran viermal für 5 min in TBST-T gewaschen wurde, erfolgte die chemilumineszente Substratreaktion durch die antikörperkonjugierte Meerrettichperoxidase. Hierfür wurde die Membran für 5 min mit dem SuperSignal™ West Dura Chemilumineszenz-Substrat inkubiert. Abschließend konnte die Detektion mit dem Fusion-SL-Geldokumentationssystem durchgeführt werden (Abb. 14).

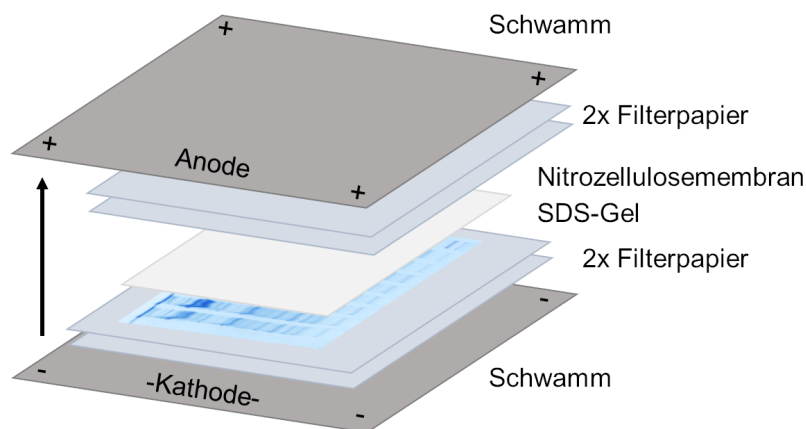


Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Western-Blot-Sandwich: Nachdem die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür werden unter das SDS-Gel zwei Whatman-Papiere und ein in Laufpuffer getränkter Schwamm platziert. Über das Gel werden die Nitrozellulosemembran, zwei Whatman-Papiere und ebenfalls ein in Laufpuffer getränkter Schwamm platziert. Nachdem eine Spannung angelegt wurde, migrieren die negativ geladenen Proteine auf die Membran.

3.4.5 Densitometrische Quantifizierung

Die detektierten chemilumineszenten Signale wurden densitometrisch mit der Evolution-Capt Software quantifiziert. Die Software bestimmt das Volumen der Proteinbanden als Voxel. Das errechnete Volumen der Proteine wurde anschließend auf das Volumen der GAPDH Ladekontrolle normalisiert. Diese semi-quantitative Methode ermöglicht eine sehr genaue Abschätzung der gebildeten Proteinmenge einzelner Proben innerhalb eines Experiments.

3.4.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Das Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Verfahren beschreibt eine quantitative antikörper-basierte Messmethode zum Nachweis bestimmter Proteine und Moleküle. Im vorliegenden Projekt wurde die PDGF-AA-Konzentration in humanen Serumproben mittels Quantikine® ELISA Kit für human/mouse PDGF-AA nach gemessen. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Kit nutzt 96-Well-Mikrotiterplatte, die bereits mit einem onoklonalen Anti-PDGF-AA-Antikörper immobilisiert wurden. Zunächst wurden alle gesammelten Serumproben 1:10 mit dem Diluent RD6 verdünnt. Anschließend wurde mit Hilfe des rekombinanten PDGF-AA die Standardkurve erstellt (1000 - 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,3 - 15,6) pg/ml. Dann wurden die freien Bindungsstellen des immobilisierten Anti-PDGF-AA-Antikörper durch Zugabe von 100 µl des Diluent RD1-68 pro Well blockiert. Daraufhin wurden 50 µl des Standards und der Proben auf die vorbereiteten Wells gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Wells viermal mit dem Waschpuffer gewaschen wurden, wurden 150 µL des HRP-konjugierten Anti-PDGF-AA-Antikörpers hinzugegeben und erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten erneut vier Waschschrte, bevor 200 µL Substratlösung (TMB) hinzugegeben wurde. Nach ca. 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Lichtschutz wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µL Stopplösung beendet. Die Absorption wurde innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge bei 570 nm gemessen. Die PDGF-AA-Konzentrationen der Serumproben wurden anhand der Standardkurve mit einer Vier-Parameter-Logistik-(4-PL)Interpolation berechnet. Alle Messungen wurden mindestens in technischen Duplikaten durchgeführt.

3.4.7 Antikörper-basierter Multiplex Array

Die indirekte Kokultur ermöglicht die Interaktion von zwei Zellpopulationen ausschließlich über lösliche Faktoren. Die Identifizierung und Quantifizierung dieser sekretierten Faktoren in den Kokulturüberständen wurde mit Hilfe des Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kits durchgeführt. Dieser Array verwendet eine Nitrozellulosemembran, auf der 105 Zytokin-, Chemokin- und Wachstumsfaktor-spezifische Antikörper als Duplikate immobilisiert sind.

Nach drei Tagen Mono- bzw. Kokultur wurden die Überstände aspiriert, bei 400 g für 10 min zentrifugiert und daraufhin bei -80°C gelagert. Am Tag der Messung wurden die Proben aufgetaut und 1:3 mit dem Array-Buffer 6 verdünnt. Darüber hinaus wurden alle Reagenzien wie in 2.5.2 vorbereitet. Zu Beginn wurden die Nitrozellulosemembranen in 2 ml des Array-Buffers 6 für 60 min bei RT auf einem Schüttler blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit 1,5 ml der verdünnten Proben über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dreimal für 10 min in 20 ml des Waschpuffers gewaschen und anschließend für 60 min bei RT in der Antikörperlösung inkubiert. Nachdem die Membranen dreimal wie oben beschrieben gewaschen wurden, folgte daraufhin die Zugabe von 2 ml der Streptavidin-HRP (1x) Lösung. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT, erfolgten drei Waschschrte und die Membranen wurden danach für 1 min auf Zellstoffpapier gelegt, um Rückstände des Waschpuffers zu entfernen. Anschließend folgte die Inkubation der Membranen in 1 ml der Entwicklungslösung für 1 min. Um eine gleichmäßige Verteilung der Entwicklungslösung auf den Membranen zu gewährleisten, wurde die Inkubation in einer Klarsichtfolie durchgeführt. Die Signale der chemilumineszenten Substratreaktion konnten wie in 3.4.4 detektiert werden. Dabei erfolgte die Detektion inkrementell, um eine möglichst große Spannbreite der Signale zu erfassen. Die Spotintensitäten wurden densitometrisch wie in 3.4.5 ausgewertet und auf die Referenzspots normalisiert. Abschließend wurden die Daten als log₂-adjustierte Werte mittels euklidischer Distanzmessung hierarchisch geclustert und in Form einer Heatmap dargestellt (**Abb. 15**).

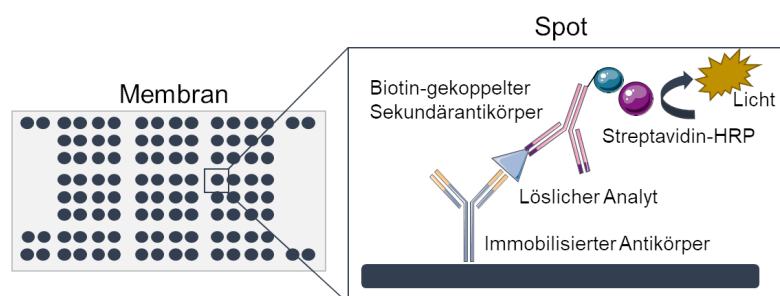


Abbildung 15: Die Analyse des Sekretoms erfolgt mithilfe einer Nitrozellulosemembran, auf der 105 Antikörper gegen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren immobilisiert sind. Auf dieser Membran werden die sekretierten Faktoren durch die immobilisierten Antikörper gebunden. Durch Zugabe biotinylierter Antikörper, die spezifisch für die jeweiligen Faktoren sind, kann mithilfe von HRP-gekoppelten Streptavidin-Molekülen ein Signal über eine chemilumineszente Substratreaktion detektiert werden.

3.5 Mikroskopie

Die Auswertung der TMA erfolgte grundsätzlich zu Zweit mit Hilfe der Leica DM3000 / DM3000 LED Mikroskope. Die Gewebe wurden dabei in einer 200x Vergrößerung im Hellfeld analysiert. Phasenkontrastbilder der *in vitro* Versuche wurden in einer 100x und 200x Vergrößerung mit dem Axiovert 40 CFL Mikroskop aufgenommen. Die IFF Aufnahmen wurden mit dem BZ9000 KEYENCE Mikroskop aufgenommen. Für die Auswertung wurden die Bilder bei gleicher Belichtungszeit in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.6 Bioinformatische Analysen

3.6.1 Gene Expression Omnibus Datenbank

Für die Analyse des Einflusses von TAMs auf die Krankheitsprogression von GEAC-Patienten wurden öffentlich verfügbare Genexpressionsdaten aus der Gene Expression Omnibus Gene Expression Omnibus Datenbank-(GEO)-Datenbank. GEO ist eine öffentlich zugängliche Datenbank, die unter anderem Transkriptomdaten aus Microarray- und RNA-Sequenzierungsstudien zusammen mit zugehörigen Metadaten archiviert und standardisiert zugänglich gemacht. Sie wird vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) betrieben. Als 'Discovery-Set' wurde der Datensatz eines cDNA-Microarrays der GEAC-Kohorte GSE13898 verwendet, welcher Expressionsprofile von GEAC-Tumorgewebe, Barret-Gewebe und Normalgewebe sowie zugehörige klinisch-pathologische Informationen enthält.

3.6.2 Prozessierung und funktionelle Analyse cDNA Microarray

Die normalisierten Genexpressionsdaten wurden direkt aus der GEO-Datenbank heruntergeladen. Anschließend wurden die Daten einer zusätzlichen Qualitätskontrolle unterzogen. Proben mit unvollständigen klinischen Angaben oder offensichtlichen technischen Artefakten wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für Gene, die durch mehrere Sonden repräsentiert waren, wurde der Mittelwert der entsprechenden Sonden verwendet. Zusätzlich wurden Expressionswerte von redundanten Genvarianten sowie Expressionswerte mit fehlender Annotation aus der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurden die normalisierten Expressionswerte mittels linearer Min-Max-Normalisierung auf einen definierten Wertebereich skaliert, um die Vergleichbarkeit zwischen Proben zu verbessern. Zunächst wurden die Expressionswerte der Makrophagen-spezifischen Gene *CD68*, *CD163*, *MSR1*, *NOS2A* und *HLADR* verwendet und untersucht, ob sich diese im Normalgewebe (NT), Barrett-Gewebe (BAR) und GEAC-Gewebe (EAC) unterscheiden. Darüber hinaus wurden Patienten selektiert, die durch eine besonders hohe bzw. niedrige Expression der Gene *CD68* und *CD163* charakterisiert werden. Um durch diese Selekti-

on eine Überinterpretation der Genregulation zu vermeiden, wurden die selektierten Expressionswerte einer erneuten Quantil-Normalisierung unterzogen. Mit Hilfe dieser Daten wurden eine Heatmap und ein Volcanoplot erstellt, um differenziell regulierte Gene zu identifizieren. Die Erstellung der Heatmap erfolgte mit dem Online-Tool von Morpheus [www.software.broadinstitute.org/morpheus]. Hierfür wurden die normalisierten Expressionswerte von jeweils vier Patienten mit hoher bzw. niedriger *CD68* *CD163*-Expression verwendet. Um Unterschiede in der relativen Expression zwischen Proben hervorzuheben und eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden die Expressionswerte zusätzlich z-standardisiert (Z-Transformation). Die resultierenden Z-Scores wurden für die Heatmap-Darstellung auf einen Wertebereich von -2,5 bis +2,5 begrenzt. Mit Hilfe dieser Expressionswerte wurde zur Identifikation von Proben mit ähnlichen Expressionsprofilen eine hierarchische Clusteranalyse mit euklidischer Distanzmessung sowie eine k-Means-Clusteranalyse durchgeführt.

3.6.3 Gene-Set-Enrichment-Analyse

Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) ist eine bioinformatische Methode zur Untersuchung, ob ein definiertes Set an Genen zwischen zwei biologischen Zuständen (z.B. Phänotyp im Sinne einer starken intratumoralen Makrophageninfiltration) statistisch signifikante Expressionsunterschiede aufweist. Im Gegensatz zu einzelnenbasierten Analysen berücksichtigt die GSEA die kollektive Regulation biologisch zusammenhängender Gene. Dadurch hat man die Möglichkeit sehr große Transkriptom-Datensätze auf funktionelle Unterschiede hin zu untersuchen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der GSEA software [www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp], welche als Verbundprojekt der Universität Californien San Diego und dem Broad Institut entwickelt wurde [308]. Innerhalb der Software hat man Zugriff auf 1325 biologisch definierte Gensets, welche in der Molecular Signature Database (MSigDB) hinterlegt sind. Im vorliegenden Projekt wurden Gensets *Hallmarks gene set* und *C2 curated gene set* verwendet. Die Analyse erfolgte im voreingestellten Setting. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in einem sogenannten 'Enrichment Plot' welcher den laufenden Enrichment Score anzeigt. Zusätzlich zeigt er die Position der Gene eines Gensets innerhalb der Rangliste (schwarze Striche) und den Punkt des maximalen Enrichment Scores. Zusätzlich wird der normalisierte Enrichment Score (NES) angegeben. Dieser berücksichtigt sowohl die Größe des Gensets als auch die Verteilung der enthaltenen Gene innerhalb der Rangliste. Dabei zeigt ein positiver NES eine Anreicherung des jeweiligen Gensets in der Gruppe mit hoher *CD68*- bzw. *CD163*-Expression an, während ein negativer NES auf eine Anreicherung in der Gruppe mit niedriger Expression hinweist. Der NES erlaubt den direkten Vergleich der Enrichment-Stärke zwischen unterschiedlichen Gensets. Abschließend wird die False Discovery Rate (FDR) berechnet. Die FDR beschreibt den erwarteten Anteil falsch-positiver Ergebnisse unter den als signifikant identifizierten Gensets. Als Zusammenfassung diente zusätzlich die Visualisierung der Er-

gebnisse in einem GSEA Bubble Plot. Dieser stellt die Enrichment Scores, die statistische Signifikanz und die Genset-Größe simultan dar.

3.7 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit der GraphPad-Prism-8-Software durchgeführt. Vor jeder Analyse wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um die Daten auf eine Normalverteilung zu überprüfen. Der Vergleich von zwei parametrischen Datensätzen wurde mit einem zweiseitigen t-Test analysiert. Die Analyse von parametrischen Daten mit mehr als zwei Gruppen wurde mit der einfachen univariaten Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanz bei multiplen Vergleichen erfolgte entweder mittels Tukey-Test oder Šidák-Korrektur. Die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde bei dem Vergleich von zwei Gruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und bei mehr als zwei Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test (One-Way-ANOVA on Ranks) analysiert. Die nichtparametrischen Daten wurden als Median, 25 % und 75 % Quartile dargestellt. Für die Berechnung der Überlebenszeitwahrscheinlichkeiten im Rahmen der Überlebenszeitanalysen erfolgten der Logrank-Test und die Bestimmung der Hazard Ratio (HR). Die Überlebenszeitanalysen wurden als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Zur Bestimmung von unabhängigen prognosebestimmenden Parametern wurde das Cox proportional hazards model verwendet.

3.8 Generative künstliche Intelligenz

Generative künstliche Intelligenz wurde ausschließlich zur Unterstützung bei Rechtschreibung, Grammatik, Interpunktion und als abschließendes Lektorat verwendet. Hier wurde das Online-Tool ChatGPT 5.2 und Scribbr (<https://www.scribbr.de/>) genutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Makrophagen im GEAC

4.1.1 Patienten mit Barrett-Ösophagus und GEAC zeigen erhöhte Expression makrophagen-spezifischer Gene

Makrophagen können als Teil des inflammatorischen Tumorstromas erheblichen Einfluss auf die Tumorprogression nehmen. Wie bereits in anderen Tumorentitäten gezeigt werden konnte, machen TAMs einen großen Anteil des nicht-neoplastischen Tumorgewebes aus. Insbesondere solide Neoplasien zeigen einen hohen Anteil an infiltrierenden Monozyten und Makrophagen [309, 310]. Darüber hinaus stellen die Neoplasien des Gastrointestinaltraktes unter den soliden Tumoren jene Tumorerkrankungen dar, die durch eine außerordentlich starke Infiltration von TAMs charakterisiert sind [311]. Obwohl für das GEAC eine inflammatorische Genese bekannt ist, gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die sich mit dem Einfluss von TAMs auf das GEAC beschäftigen.

Tabelle 4.1: Charakterisierung der Patientenkohorte des cDNA Microarrays GSE13898 (Discovery Set)

Anzahl: n (Absolut) n (Prozent)			
Alle	n	64	100,00
	n	60	100,00
Alter	Median (Spanne)	64 (31-84)	
	> 60	39	60,94
	< 60	25	39,06
Geschlecht	n	60	100,00
	männlich	55	91,67
	weiblich	5	8,33
Tumorstadium	n	46	100,00
	pT0	14	30,43
	pT1	9	19,57
	pT2	6	13,04
	pT3	15	32,61
	pT4	2	4,35
Lymphknoten-metastasen	n	46	100,00
	pN0	38	82,61
	pN+	8	17,39
UICC Stadium	n	34	100,00
	I	8	23,53
	IIA	18	52,94
	IIB	2	5,88
	III	6	17,65

Anzahl: n (Absolut) n (Prozent)			
Fern-metastasen	n	45	100,00
	M0	45	100,00
	M1	0	0,00
Grading	n	58	100,00
	G2	41	70,69
	G3	17	41,46
Barret	n	15	
Normalgewebe	n	28	

Aus diesem Grunde ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine umfangreiche klinische und molekulare Charakterisierung des Einflusses von Makrophagen auf das GEAC durchzuführen. Zu Beginn des Projektes wurde die Gene-Expression-Omnibus-Datenbank nach Array-Expressionsdaten von GEAC-Patienten durchsucht. Dabei stellte der Datensatz eines cDNA-Microarrays der Kohorte GSE13898 [312] ein geeignetes 'Discovery Set' dar. Der Datensatz dieser Kohorte enthält die normalisierten Genexpressionswerte von 48701 Genen und Genvarianten in 64 GEAC-Patienten und nicht-neoplastischem Gewebe von 28 Patienten. Zusätzlich enthält der Datensatz die Expressionswerte von 15 Patienten mit einem Barrett-Ösophagus, einer präkanzerösen Vorläuferläsion des GEAC. Bei 60 Patienten waren das Alter und das Geschlecht bekannt. Hier zeigte sich das mediane Alter des Patientenkollektivs bei 64 Jahren. Der jüngste Patient war 31 Jahre und der älteste 84 Jahre, wobei 39 (60,94 %) Patienten über 60 Jahre alt waren. Mit 55 Patienten (91,67 %) war der größte Anteil der Patienten männlichen Geschlechts. Die Verteilung der Patienten auf das Tumorstadium stellte sich wie folgt dar: Bei 46 Patienten war das Tumorstadium bekannt. Von diesen Patienten befanden sich 14 (30,43 %) in dem sehr frühen Tumorstadium pT0 (pT1a) und 9 (19,57 %) Patienten zeigten das Tumorstadium pT1. Die weiter fortgeschrittenen Tumorstadien verteilten sich auf 6 (13,04 %) Patienten mit pT2, 15 (32,61 %) Patienten mit pT3 und 2 (4,35 %) Patienten mit pT4. Der Status der Lymphknotenmetastasierung war ebenfalls für 46 Patienten bekannt. Jedoch wurde hier nur die Angabe gemacht, ob eine Lymphknotenmetastasierung vorliegt oder nicht. Bei dem Großteil der Patienten (38; 82,61 %) lag keine Tumordinfiltration der regionären Lymphknoten vor. Die gesamte Kohorte zeigte keine Fernmetastasierung. Informationen über das Staging waren bei 34 Patienten bekannt und wurden in Form des UICC-Stadiums erhoben. Aus den Angaben des Tumorstadiums, der Lymphknotenmetastasierung und der Fernmetastasierung ergibt sich in Kombination das UICC-Stadium. Hier zeigten 8 (23,53 %) Patienten das UICC-Stadium I, 18 (52,94 %) Patienten das UICC-Stadium IIA und 2 (5,88 %) das UICC-Stadium IIB. Lediglich 6 (17,65 %) Patienten zeigten das fortgeschrittene UICC-Stadium III. Das UICC-IV-Stadium lag bei keinem Patienten vor. Informationen über den Differenzierungsgrad (Grading) der Tumorzellen wurden bei 58 Patienten erhoben. Bei 41 (70,69 %) Patienten zeigte der Tumor einen G2-Differenzierungsgrad und bei 17 (41,46 %) Patienten einen G3-Differenzierungsgrad. Sowohl die G1- als auch die G4-Differenzierung lag bei keinem Patienten vor (**Tab. 4.1**).

Mit Hilfe dieser Kohorte sollte zu Beginn untersucht werden, ob die Genexpression der Makrophagenmarker *CD163*, *MSR1* (M2), *NOS2A*, *HLADR* (M1) und *CD68* (M1,M2) im präkanzerösen Barrett (BAR) und neoplastischen Tumorgewebe (EAC) im Vergleich zu nicht-neoplastischem (NT) Kontrollgewebe differenziell reguliert ist. Bezüglich der Genexpression des Panmakrophagenmarkers *CD68* (**Abb. 16A**) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen NT, BAR und EAC festgestellt. Hier zeigten die gesunden Kontrollpatienten einen medianen Genexpressionswert von $0,705 \pm 0,102$, während die medianen Expressionswerte für die BAR-Patienten $0,720 \pm 0,144$ und für die EAC-

Patienten $0,721 \pm 0,201$ betrugen. Mit einer 2,9-fach höheren Genexpression konnte ein signifikanter Unterschied der Transkriptionsmenge des M2-Markers *CD163* (**Abb. 16B**) in den EAC-Patienten im Vergleich zu den NT-Patienten festgestellt werden (NT: $0,104 \pm 0,101$ vs. EAC: $0,297 \pm 0,365$, $p < 0,0001$). Die *CD163*-Genexpression in den BAR-Patienten ($0,1464 \pm 0,042$) war nicht wesentlich höher als in den NT-Patienten, jedoch deutlich niedriger als in den EAC-Patienten. Hiermit übereinstimmend konnte für die Genexpression eines weiteren M2-Makrophagenmarkers *MSR1* (**Abb. 16C**) ein ähnlicher Befund erhoben werden. Mit einer medianen Genexpression von $0,398 \pm 0,274$ zeigten die EAC-Patienten eine 1,4-fach höhere *MSR1*-Genexpression als die NT-Patienten ($0,2885 \pm 0,1623$, $p = 0,0001$). Im Vergleich zu den NT-Patienten wiesen die BAR-Patienten ($0,368 \pm 0,085$) ebenfalls eine höhere, jedoch nicht signifikante, *MSR1*-Genexpression auf.

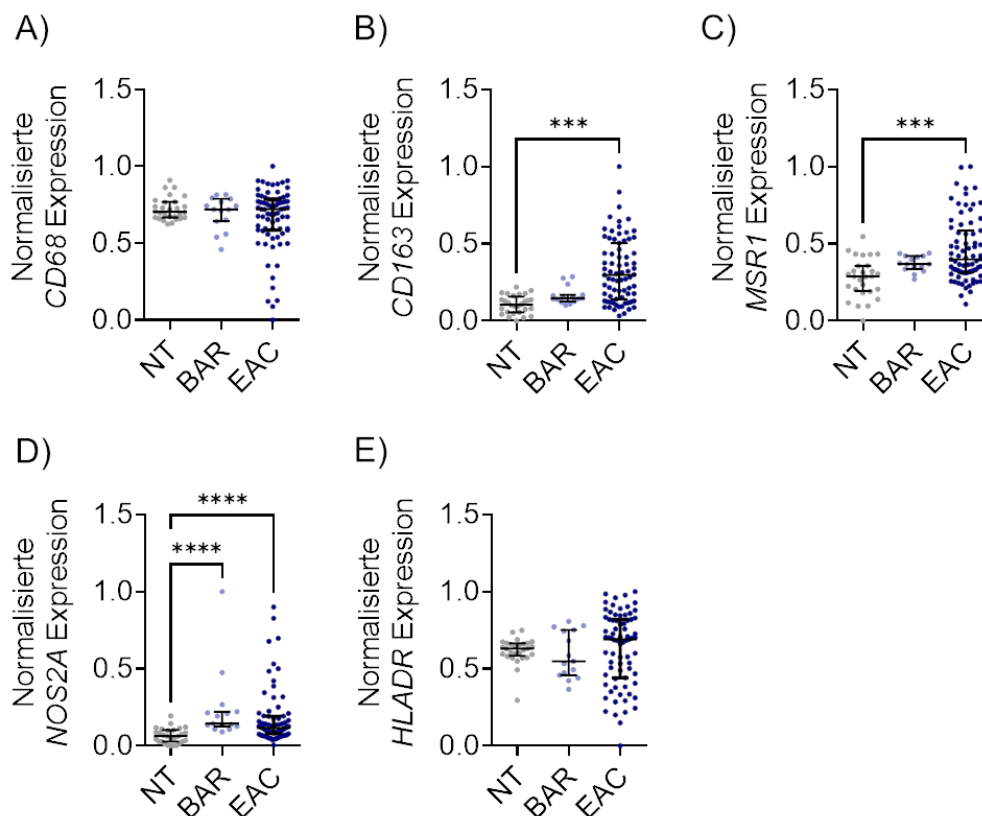


Abbildung 16: Untersuchung der Genexpression des cDNA Microarrays GSE13898. Die normalisierten Expressionswerte der Gene *CD68* (A), *CD163* (B), *MSR1* (C), *NOS2A* (D), *HLA-DR* (E), von 28 Patienten mit nicht-neoplastischen Kontrollgewebe (NT), 15 Patienten mit einer Barrett-Vorläuferläsion (BAR) und 64 Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) wurden aus dem Array extrahiert und als mediane Expressionswerte mit dem 25 % - 75 % interquartilen Abstand dargestellt. Der Kruskal-Wallis One-Way ANOVA Test wurde für die statistische Analyse verwendet. Mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparisons Test wurden die adjustierten P-Werte berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Diese zeigte jedoch keine Unterschiede zu den *MSR1*-Transkriptionsleveln in den EAC-Patienten. Abschließend wurde die Expression der proinflammatorischen M1-Makrophagenmarker *NOS2A* (**Abb. 16D**) und *HLADR* (**Abb. 16E**) untersucht. Während für *HLADR* keine Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen erhoben werden konnten, zeigten sich signifikant höhere *NOS2A*-Genexpressionslevel in den BAR- und EAC-Patienten im Vergleich zu den NT-Patienten (NT: $0,0629 \pm 0,075$ vs. BAR: $0,145 \pm 0,094$, $p < 0,0001$), (NT: $0,0629 \pm 0,075$ vs. EAC: $0,1171 \pm 0,112$, $p < 0,0001$). Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass sowohl die Genexpression der proinflammatorischen makrophagen-spezifischen Gene als auch die antiinflammatorischen makrophagen-spezifischen Gene stärker in präkanzerösem Barrett- und ösophagealen Tumorgewebe als in gesunder nicht-neoplastischer Ösophagusschleimhaut transkribiert werden.

4.1.2 GEAC-Patienten mit starker Expression makrophagen-spezifischer Gene zeigen Gensignaturen maligner Progression

Bisher konnte gezeigt werden, dass GEAC-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten vermehrt makrophagen-spezifische Gene exprimieren. Als nächster Schritt sollte analysiert werden, ob diese erhöhte Expression im Zusammenhang mit bestimmten Expressionsmustern, biologischen Prozessen oder Phänotypen steht. Hierfür wurden zunächst die GEAC-Patienten identifiziert, die eine besonders hohe ($M\Phi+$) und eine besonders niedrige ($M\Phi-$) Expression der makrophagen-spezifischen Gene *CD68* und *CD163* aufwiesen. Es wurden jeweils vier Patienten pro Gruppe identifiziert. Die GEAC-Patienten EAC_026, EAC_041, EAC_007-1 und EAC_030 zeigten die höchsten Expressionswerte für *CD68* und *CD163*, während die GEAC-Patienten EAC_058, EAC_057-2, EAC_062 und EAC_050 die niedrigsten Expressionswerte aufwiesen (**Abb. 17A**).

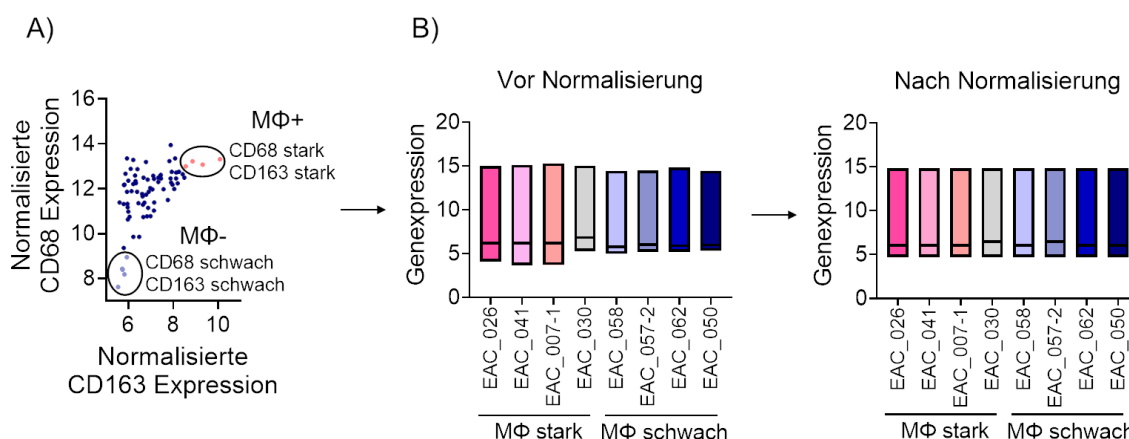


Abbildung 17: Vorgehensweise der Patientenselektion: A) Korrelationsanalyse der normalisierten CD68 und CD163 Expressionswerte. Auswahl von jeweils vier GEAC-Patienten mit starker bzw. schwacher CD68 und CD163 Expression. B) Quantil-Normalisierung nach Patientenselektion. Die Quantil-Normalisierung erfolgte mit einem Online-Tool von <https://software.broadinstitute.org/morpheus>. Dieses implementiert die klassische Quantil-Normalisierung (Quantile Normalization) nach dem etablierten Verfahren von: Bolstad et al., 2003

Da durch diese Vorgehensweise der Patientenselektion systematische Abweichungen und Varianzen entstehen können, die zu einer Überinterpretation der Genregulation führen könnten, wurde nach Selektion eine weitere Quantil-Normalisierung durchgeführt. Nach der Normalisierung ist eine Reduktion der Varianz und eine gleiche empirische Verteilung der Genexpression zu beobachten (**Abb. 17B**). Im Anschluss wurden differenziell regulierte Gene zwischen den Patientengruppen $M\Phi+$ und $M\Phi-$ identifiziert. Hierfür wurden zu Beginn mit Hilfe der *Benjamini & Hochberg false discovery rate*-Methode die berechneten P-Werte korrigiert, um das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse zu reduzieren. Dabei gelten alle Gene als differenziell reguliert, die mindestens eine dreifache relative Änderung der Expressionsstärke und ein Signifikanzniveau der adjustierten P-Werte von $< 0,05$ aufweisen. Nach Ausschluss von Expressionswerten mit fehlender Annotation und Entfernung von redundanten Genvarianten konnten die Expressionswerte von 19586 Genen in die Analyse eingeschlossen werden. Von 4720 signifikant differenziell regulierten Genen konnten 457 Gene identifiziert werden, die mindestens eine dreifache relative Änderung der Expressionsstärke aufwiesen.

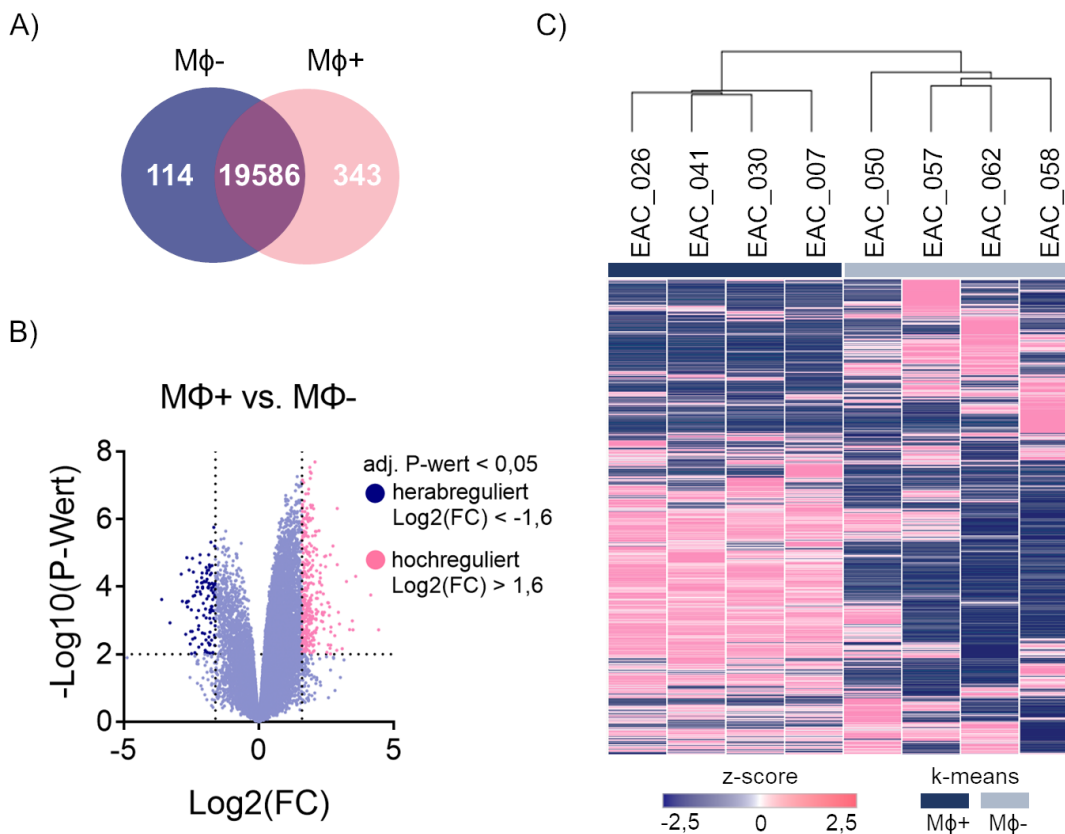


Abbildung 18: **A)** Venn-Diagramm der differenziell regulierten Gene in GEAC-Patienten mit starker und schwacher Expression der Makrophagen-spezifischen Gene *CD68* und *CD163*. **B)** Volcano-Plot der differenziell regulierten Gene in GEAC-Patienten mit starker und schwacher Expression der Makrophagen-spezifischen Gene *CD68* und *CD163*. Dargestellt sind adjustierte und logarithmierte p-Werte ($-\log_{10}(p\text{-Werts})$) log₂-Änderungsfaktor (Fold Change). Adjustierte p-Werte $< 0,05$ und ein log₂-Änderungsfaktor von 1,6 wurden als signifikant angesehen. **C)** Heatmap der z-standardisierten Expressionswerte differenziell exprimierter Gene in GEAC-Proben. Die Proben ($M\Phi+$: EAC_026, EAC_041, EAC_030, EAC_007, $M\Phi-$: EAC_050, EAC_057, EAC_062, EAC_058) wurden anhand hierarchischer Clusteranalyse mit euklidischer Distanzmessung gruppiert. Die Farbskala repräsentiert die Z-Scores der Genexpression (blau = niedrige, rot = hohe Expression). Zusätzlich sind die mittels k-means-Clustering identifizierten Subgruppen $M\Phi+$ und $M\Phi-$ dargestellt. Die Erstellung der Heatmap erfolgte mit <https://software.broadinstitute.org/morpheus>

Dabei zeigte die Gruppe $M\Phi+$ im Vergleich zur $M\Phi-$ Gruppe 343 signifikant hochregulierte Gene, während 114 Gene in der $M\Phi-$ Gruppe signifikant herunterreguliert waren (**Abb. 18A,B**). Zusätzlich wurde mit Hilfe des k -means-Clusteralgorithmus und eines auf dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson basierenden hierarchischen Clusteralgorithmus untersucht, ob ähnliche Expressionsmuster unter den Patienten in den Gruppen $M\Phi+$ und $M\Phi-$ auftreten. Hier zeigte die k -means-Clusteranalyse, dass sich die Expressionsmuster der $M\Phi+$ Patienten und der $M\Phi-$ Patienten voneinander separieren. Darüber hinaus wiesen die Patienten innerhalb ihrer Gruppe vergleichbare Expressionsmuster auf. Dabei zeigte sich das Expressionsmuster der Patienten in der $M\Phi+$ Gruppe häufiger miteinander übereinstimmend, als das Expressionsmuster der $M\Phi-$ Gruppe (**Abb. 18C**).

Da sehr viele Gene zwischen den Gruppen differenziell exprimiert werden, ist es sehr mühsam, jene Gene zu identifizieren, die für die Zielsetzung des vorliegenden Projektes von Bedeutung sind. Infolgedessen wurde aufgrund der Annahme, dass sich viele Gene einer funktionellen Gengruppe zuordnen lassen, eine funktionelle Gen-Annotationsanalyse durchgeführt. Diese erlaubt, mit Hilfe der differenziell regulierten Gene, die Identifizierung von überrepräsentierten funktionellen Gengruppen, die im Zusammenhang mit bestimmten biologischen Prozessen stehen (Gensignatur). Die Analyse erfolgte mit dem *Gene-Set-Enrichment-Algorithmus* (GSEA), welcher die Expressionswerte der differenziell exprimierten Gene mit der Molecular Signatures Database (MSigDB) abgleicht, relevante funktionelle Gengruppen ihrer Signifikanz nach sortiert und übergeordneten Kategorien zuordnet. Darüber hinaus wird die Anzahl der Gene, die im Genset vorkommen, angegeben und der Grad, wie stark jenes Genset im Datensatz überrepräsentiert vorkommt, ausgegeben (Enrichment Score). Im vorliegenden Projekt wurden die Gensets *Hallmarks gene set* und *C2 curated gene set* verwendet und dabei diejenigen biologischen Prozesse berücksichtigt, die eine tumorbiologische Relevanz haben. Hier stufte die GSEA im Genset *Hallmarks gene set* 33 Gensignaturen und im *C2 curated gene set* 1053 Gensignaturen als signifikant angereichert ein. Die tumorbiologisch relevantesten Gensignaturen wurden anschließend selbst erstellten übergeordneten Kategorien zugeordnet.

Hier zeigte sich, dass die Patienten der $M\Phi+$ Gruppe im Vergleich zur $M\Phi-$ Gruppe überrepräsentative funktionelle Gengruppen aufwiesen, die mit folgenden tumorbiologischen Prozessen assoziiert sind (**Abb. 19**) .

- Krankheitsprogression
- Metastasierung
- Therapieresistenz
- Zellteilung

Im folgenden werden aus jeder Kategorie die Gensets mit der größten Signifikanz dargestellt. Dabei zeigt die x-Achse den jeweiligen Enrichment Score als Maß für den Grad der Überrepräsentation eines Gen-Sets in MΦ+ im Vergleich zu MΦ- Proben. Die Größe der Datenpunkte korreliert mit der Anzahl der Gene, die dem jeweiligen Gen-Set zugeordnet sind, während die Farbskala den statistischen Signifikanzniveau der Anreicherung in Form des $-\log_{10}$ transformierten p-Wertes abbildet.

Krankheitsprogression: Die GEAC-Patienten der MΦ+ Gruppe zeigen über repräsentierende funktionelle Gengruppen, die im Allgemeinen mit einer fortschreitenden Krebserkrankung assoziiert sind. Hier sind mehrere Gen-Sets signifikant angereichert. Diese spiegeln vor allem Expressionsmuster fortgeschrittener Tumorerkrankungen wider. Dabei zeigte sich das Genset 'Vecchi-Gastric-Cancer-Advanced-vs-Early-up' mit einem Enrichment-Score von 2,5 und einem p-Wert von 0,00005 am signifikantesten reguliert. Insgesamt umfassen die dargestellten Signaturen sowohl funktionelle Gengruppen, die mit histopathologischen Merkmalen höherer Tumoraggressivität assoziiert sind, als auch Expressionsprofile, die eine reduzierte Differenzierung von Tumorzellen abbilden.

Metastasierung: GEAC-Patienten mit hoher Expression makrophagen-spezifischer Gene weisen signifikant angereicherte Gensets auf die im Allgemeinen mit einer erhöhten Metastasierung zusammenhängend. Dabei zeigt die Analyse der Gensets *Hallmarks gene set* und *C2 curated gene set*, dass höchste Dichte signifikant angereicherter Gen-Gruppen auf. Besonders hervorzuheben ist die wiederholte Darstellung mehrerer EMT-Signaturen. Dabei zeigte sich das Genset 'Anastassiou-Multicancer-Invasiveness' mit einem Enrichment-Score von 2,6 und einem p-Wert von 0,00005 am signifikantesten reguliert. Darüber hinaus sind Gen-Sets angereichert, die Prozesse der Tumorzellmigration, Invasivität, extrazellulären Matrixinteraktion sowie der Angiogenese widerspiegeln. Die Enrichment Scores dieser Signaturen liegen überwiegend im oberen Bereich der Skala und sind mit hohen Signifikanzwerten assoziiert.

Therapieresistenz: In dieser Gruppe der zeigt sich ein Genset besonderes signifikant reguliert. Dabei zeigen die GEAC-Patienten der MΦ+ Gruppe überrepräsentierende funktionelle Gengruppen, die mit einer Gefintinib-Resistenz assoziiert sind. Hier stellt sich ein Enrichment-Score von 2,0 bei einem p-Wert von 0,00005 dar. Die restlichen Gengruppen, die vor allem mit den Ansprechen von Chemotherapeutika zusammenhängen, zeigen sich als nicht signifikant reguliert.

Zellteilung: Zusätzlich zeigen GEAC-Patienten der MΦ+ Gruppe eine deutliche Überrepräsentation zellzyklus- und proliferationsassoziiierter Gensets. Besonders stark angereichert sind die Gengruppen 'Hallmark-E2F-Targets', Hallmark-G2/M-Checkpoint sowie Gene des 'Hallmark-Mitotic Spindle' Sets. Diese Gensets weisen die höchsten Enrichment

Scores auf bei gleichzeitiger statistischer Signifikanz. Auch weitere Zellzyklus-nahe Programme, darunter 'WP-DNA-Replikation' und 'Kegg-Cell-Cycle' zeigen eine signifikante Anreicherung in der $M\Phi^+$ Gruppe.

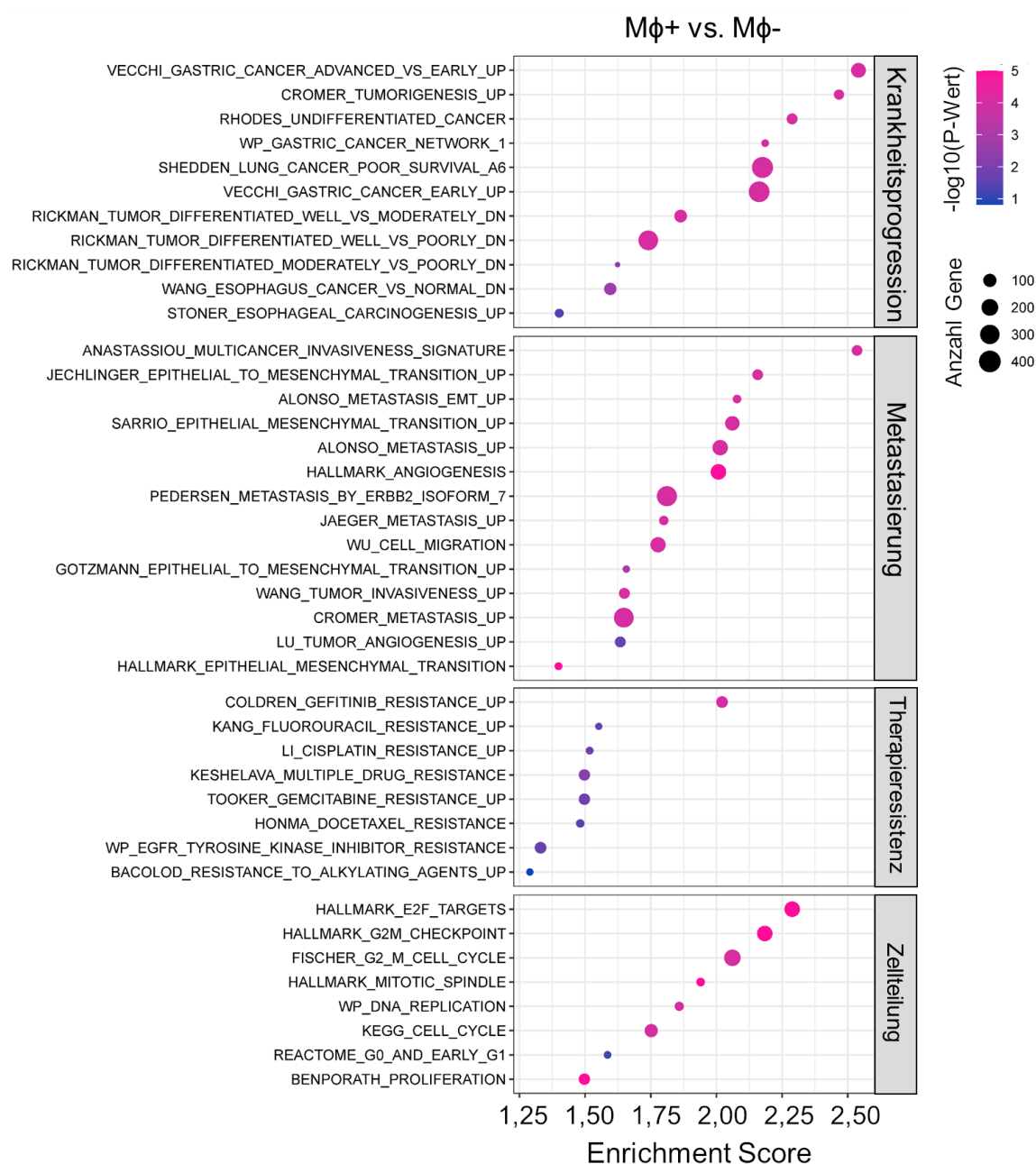


Abbildung 19: Bubble-Plot der GSEA-Analyse von GEAC-Patienten mit hoher $CD68$ - und $CD163$ -Expression ($M\Phi^+$) im Vergleich zu Patienten mit niedriger $CD68$ - und $CD163$ -Expression ($M\Phi^-$). Die GSEA-Analyse wurde unter Verwendung der *Hallmark Gene Sets* sowie der *C2 curated Gene Sets* durchgeführt. Signifikant regulierte Gen-Sets wurden selektiert und übergeordneten biologischen Kategorien wie Krankheitsprogression, Metastasierung, Therapieresistenz und Zellteilung zugeordnet. Dargestellt ist der Enrichment Score, der die Stärke der Anreicherung unter Berücksichtigung der jeweiligen Gen-Set-Größe widerspiegelt. Die Punktgröße repräsentiert die Anzahl der im jeweiligen Gen-Set enthaltenen Gene, während die Farbkodierung die statistische Signifikanz der Anreicherung widerspiegelt. Als statistisch signifikant wurde ein adjustierter p-Wert von $< 0,005$ definiert

4.1.3 Die GEAC-Krankheitsprogression korreliert mit der Menge von CD68+ und CD163+ Makrophagen

Die Untersuchung des Datensatzes GSE13898 (Discovery Set) ergab erste Hinweise für die Annahme, dass Makrophagen eine relevante Rolle in der GEAC-Karzinogenese und Progression spielen. Dabei wiesen GEAC-Patienten eine deutlich höhere Expression makrophagen-spezifischer Gene auf als gesunde Kontrollpatienten. Zusätzlich deuteten GSEA-Analysen insbesondere in GEAC-Patienten mit hoher Expression makrophagen-spezifischer Gene auf eine Assoziation mit Krankheitsprogression, Metastasierung, Zellteilung und Therapieresistenz hin. Um diese Beobachtung zu überprüfen und um den Einfluss der Makrophagen auf das GEAC weiter zu charakterisieren, wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ein TMA erstellt. Dieser trägt die Gewebesots von 360 Patienten mit einem pathologisch diagnostizierten GEAC. Das Gewebe wurde im Rahmen einer kurativen Tumoresektion entnommen und die Patienten erhielten keine perioperative Chemotherapie.

Für 359 Patienten waren Information über das Alter bekannt. Es zeigte sich eine Altersspanne des Patientenkollektivs von 32 bis 85 Jahren mit einem medianen Alter von 65 Jahren. Mit 233 (64,9 %) Patienten war die Mehrheit der Kohorte über 60 Jahre alt. 126 (35,1 %) Patienten waren unter 60 Jahre alt. Das Geschlecht war für 357 Patienten bekannt und verteilte sich mit der überwiegenden Mehrheit von 303 (84,9 %) Patienten auf das männliche Geschlecht, während 54 (15,1 %) Patienten weiblich waren. Informationen über das Tumorstadium konnten für 349 Patienten erhoben werden und zeigten folgende Verteilung: Das sehr frühe Tumorstadium pT1a und pT1b wurde bei 26 (7,4 %) bzw. 52 (14, %) Patienten festgestellt. Ferner zeigten 37 (10,6 %) Patienten das Tumorstadium pT2. Mit 210 (60,2 %) Patienten verteilte sich die größte Mehrheit der Patienten auf das Tumorstadium pT3, während 19 (5,4 %) Patienten bzw. 5 (1,4 %) Patienten das fortgeschrittene Tumorstadium pT4a und pT4b aufwiesen. Der Status der Lymphknotenmetastasierung konnte bei 329 Patienten erhoben werden und zeigte, dass bei 94 (28,6 %) Patienten keine Infiltration der Lymphknoten vorlag. Bei 235 (72,4 %) Patienten wurde hingegen eine Lymphknotenmetastasierung festgestellt, die sich auf folgende Stadien verteilt: 64 (19,5 %) Patienten zeigen ein pN1, 81 (24,6 %) Patienten ein pN2 und 90 (27,4 %) Patienten ein pN3-Stadium. Auch in dieser Kohorte lag nur in 42 (11,7 %) Patienten eine Fernmetastasierung vor, während 313 (87,2 %) Patienten keine Dissemination in Sekundärorgane aufwiesen. Wie oben beschrieben kann mit Hilfe der Informationen der TNM-Klassifikation das UICC-Stadium bestimmt werden. Dieses wurde bei 353 Patienten erhoben. Hier zeigten 70 (19,8 %) Patienten das UICC-Stadium IA, 13 (3,7 %) Patienten das Stadium IB, 31 (8,8 %) Patienten das UICC-Stadium IIA und 15 (4,2 %) Patienten das UICC-Stadium IIB. Die fortgeschrittenen UICC-Stadien IIIA, IIIB und IIIC verteilten sich auf 59 (16,7 %) bzw. 55 (15,6 %) und 72 (20,4 %) Patienten. Bei 38 (10,8 %) Patienten lag das UICC-Stadium IV vor. Ferner wurde bei 352 Patienten

der Grad der Differenzierung des Tumors (Grading) erhoben. Dieser verteilte sich mit 25 (7,1 %) Patienten auf die G1-Differenzierung und mit 129 (36,6 %) Patienten auf die G2-Differenzierung. Tumore mit einer G3-Differenzierung wurden bei 192 (54,5 %) Patienten und Tumore mit einer G4-Differenzierung bei 6 (1,7 %) Patienten nachgewiesen. In dieser Patientenkohorte wurde darüber hinaus festgehalten, ob der Absetzungsrand des entnommenen Tumorgewebes frei von Tumorzellen (R0) war oder dieser noch restliche Tumorzellen enthielt (R1). Für 352 Patienten waren Informationen über den Resektionsrand bekannt. Dieser war bei 265 Patienten frei von Tumorzellen (R0), jedoch zeigten 87 Patienten einen Absetzungsrand, welcher Tumorzellen enthielt (R1) (**Tab 4.2**).

Tabelle 4.2: Charakterisierung der Patientenkohorte des Tissue Microarray (Validation Set)

Anzahl: n (Absolut) n (Prozent)			
Alle	n	360	100,0
	n	359	100,0
Alter	Median (Spanne)	65 (32-86)	
	> 60	233	64,9
	< 60	126	35,1
Geschlecht	n	357	100,0
	männlich	303	84,9
	weiblich	54	15,1
Tumorstadium	n	349	100,0
	pT1a	26	7,4
	pT1b	52	14,9
	pT2	37	10,6
	pT3	210	60,2
	pT4a	19	5,4
	pT4b	5	1,4
Lymphknoten- metastasen	n	329	100,0
	pN0	94	28,6
	pN1	64	19,5
	pN2	81	24,6
	pN3	90	27,4
UICC Stadium	n	353	100,0
	IA	70	19,8
	IB	13	3,7
	IIA	31	8,8
	IIB	15	4,2
	IIIA	59	16,7
	IIIB	55	15,6
	IIIC	72	20,4
	IV	38	10,8

Anzahl: n (Absolut) n (Prozent)			
	n	352	100,0
Grading	G1	25	7,1
	G2	129	36,6
	G3	192	54,5
	G4	6	1,7
Fern- metastasierung	n	359	100,0
	M0	313	87,2
	M1	42	11,7
Resektionsrand	n	352	100,0
	R0	265	75,3
	R1	87	32,8

In dieser beschriebenen Patientenkohorte wurde in einem nächsten Schritt die Makrophageninfiltration charakterisiert und eine mögliche klinische Korrelation analysiert. Hierfür wurden die Patientengewebe immunhistologisch auf die Makrophagenmarker CD68, CD163 und iNOS (*NOS2A*) untersucht und pro Gewebespot die Anzahl der positiv gefärbten Zellen gezählt. Gewebeslots, die aufgrund von Fehlen größerer Gewebeanteile oder verminderter Färbequalität nicht auswertbar waren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für CD68 konnte von 187 Patienten das Tumorgewebe untersucht werden. Dabei zeigte sich eine mediane Anzahl der CD68-positiven Makrophagen von 100. Die höchste Anzahl CD68-positiver Makrophagen betrug 300, die niedrigste Anzahl betrug 5. Ab einer Menge von ≥ 80 CD68 positiv gefärbten Zellen, wurde die Färbung als stark kategorisiert. Eine darunter liegende Anzahl wurde als schwach eingestuft (**Abb. 20A**). Folglich zeigte die immunhistologische Auswertung, dass 130 (70 %) Patienten eine starke und 57 Patienten eine schwache CD68-Färbung aufwiesen (**Abb. 20B**).

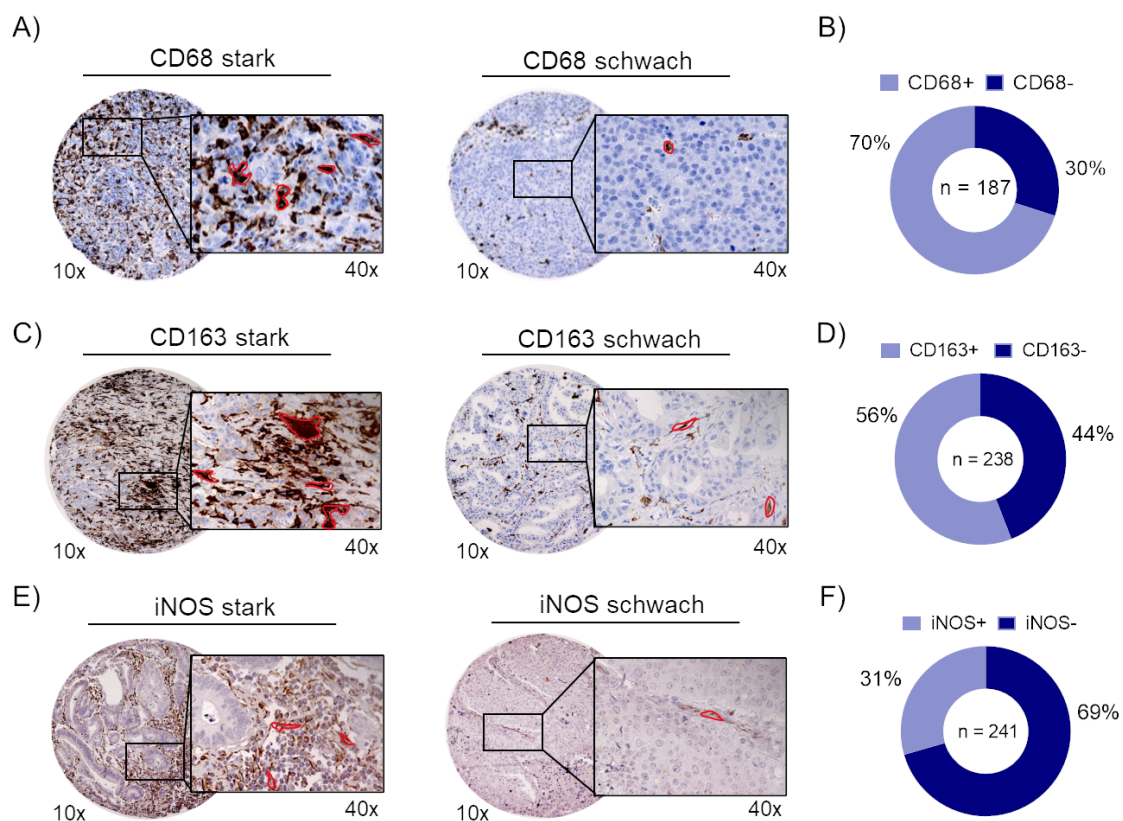


Abbildung 20: Immunhistologische Untersuchung des Tissue Microarray: Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung von **A)** CD68, **C)** CD163 und **E)** iNOS. Exemplarisch ist für jeden Makrophagenmarker eine als stark und eine schwach kategorisierte Färbung dargestellt. Einzelne Makrophagen sind rot umrandet dargestellt. Die Aufnahmen wurden in 10x und 40x Vergrößerung aufgenommen. Prozentuale Verteilung der Patienten mit starker und schwacher Färbung von **B)** CD68, **D)** CD163 und **F)** iNOS.

Die CD163-Färbung konnte in 238 Fällen ausgewertet werden. Die mediane Anzahl der CD163-positiven Makrophagen betrug 83, die niedrigste 2 und die höchste Anzahl detektierbarer CD163-positiver Makrophagen betrug 301. Auch bei dieser Färbung wurde bei einem Grenzwert von 80 CD163-positiv gefärbten Zellen die Färbung in stark und schwach differenziert (**Abb. 20C**). Dabei zeigte die Auswertung, dass 135 (56 %) Patienten eine starke CD163-Färbung aufwiesen, während 103 (44 %) Patienten eine schwache CD163-Färbung zeigten (**Abb. 20D**). In 242 Fällen konnte eine immunhistologische Auswertung für iNOS erfolgen. Mit einer medianen Anzahl von 27 iNOS-positiven Zellen, war diese deutlich geringer als die mediane Anzahl CD68- und CD163-positiver Makrophagen. Die Höchstanzahl detektierbarer iNOS-positiver Zellen betrug 122 und die niedrigste Anzahl betrug 1 Zelle. Ab einer Anzahl von ≥ 50 CD68-positiv gefärbten Zellen, wurde die Färbung als stark kategorisiert. Eine darunter liegende Anzahl wurde als schwach eingestuft (**Abb. 20E**). Dabei wiesen 76 (31 %) Patienten eine starke Färbung auf, während 166 eine schwache iNOS-Färbung aufwiesen (**Abb. 20F**). Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen zeigten, dass CD68- und CD163-positive Makrophagen sowohl intratumoral als auch im peritumoralen Stroma lokalisiert waren. Intratumoral waren die CD68- und CD163-positiven Makrophagen zwischen den Tumorzellen, im subepithelialen Bindegewebe, aber auch intraluminal in tubulären Tumorearealen zu detektieren. Demgegenüber waren die iNOS-positiven Makrophagen vornehmlich im peritumoralen Stroma und selten intratumoral lokalisiert (**Abb. 20A,C,E**). Wie in **Kapitel 4.1.2** beobachtet werden konnte, wiesen insbesondere diejenigen Patienten mit starker Expression makrophagen-spezifischer Gene überrepräsentative funktionelle Gengruppen auf, die eine Assoziation mit einem Tumorprogress und einer erhöhten Metastasierung haben. Folglich wurde mittels Chi-Quadrat-Test untersucht, ob eine starke oder schwache Färbung der Makrophagenmarker mit einer Krankheitsprogression korreliert. Für alle Makrophagenmarker konnte keine Assoziation zu Alter und Geschlecht ermittelt werden. Jedoch zeigte sich eine signifikante Korrelation des Tumorstadiums mit der Stärke der CD68-Färbung ($\chi^2 = 12,34$; $p = 0,0253$) (**Tab. 4.3**). Darüber hinaus wurde bei Betrachtung der absoluten Menge eine signifikant höhere Anzahl CD68-positiver Makrophagen in den fortgeschrittenen Tumorstadien detektiert (pT1-pT2: 88 (95% KI 78 - 120) vs. pT3-pT4: 110 (95% KI 98 - 120), $p = 0,0447$) (**Abb. 21A**). Gleiches konnte für die CD163-Färbung beobachtet werden. Hier wurde ein nicht signifikanter Zusammenhang der CD163-Färbung mit dem Tumorstadium beobachtet ($\chi^2 = 10,37$; $p = 0,065$) (**Tab. 4.3**).

Tabelle 4.3: Analyse der Assoziation zwischen der Anzahl verschiedener Makrophagenpopulationen und den klinisch-pathologisch Parametern im GEAC

	CD68						CD163						iNOS					
	n	> 80	< 80	Mittelwert	Median	n	> 80	< 80	Mittelwert	Median	n	> 80	< 80	Mittelwert	Median			
Alle	187	131	56	113	100	238	135	103	91	83	242	76	166	34,8	27			
Alter	> 60	122	88	34		152	82	70			155	43	112					
	< 60	65	43	22	0,722	0,395	87	54	33	1,49	0,222	87	33	54	0,101			
Geschlecht	männlich	156	110	46		203	114	89			205	61	144					
	weiblich	31	21	10	0,094	0,758	33	19	14	0,023	0,879	34	13	21	0,322			
Tumorstadium	pT1a	4	0	4		8	1	7			9	5	4					
	pT1b	28	19	9		29	13	16			31	12	19					
	pT2	18	11	7		25	13	12			24	5	19					
	pT3	118	86	32	12,34	0,0253*	156	96	60	10,37	0,065	158	52	106	7,91	0,161		
	pT4a	10	8	2		13	6	7			13	1	12					
	pT4b	4	4	0		3	2	1			3	1	2					
Lymphknoten-metastasen	pN0	50	35	15		57	23	34			58	20	38					
	pN1	35	23	12	1,23	0,725	39	22	17	8,96	0,0297*	40	17	23	3,91	0,272		
	pN2	40	31	9		60	39	21			58	14	44					
	pN3	52	37	15		70	44	26			72	22	50					
	IA	29	17	12		30	10	20			31	13	18					
UICC Stadium	IB	5	1	4		12	7	5			11	4	7					
	IIA	20	17	3		21	11	10			22	5	17					
	IIB	7	5	2	14,49	0,0432*	8	6	2	15,2	0,0335*	8	4	4	4,96	0,664		
	IIIA	33	21	12		40	18	22			41	13	28					
	IIIB	25	21	4		45	32	15			45	13	32					
	IIIC	43	29	14		52	31	21			53	17	36					
	IV	22	18	4		28	18	7			27	6	21					
	M0	162	111	51	1,38	0,167	207	116	91	1,041	0,307	211	67	144	0,092	0,76		
Fernmetastasen	M1	25	19	4		32	21	11			31	9	22					
Grading	G1	7	2	5		12	3	9			12	6	6					
	G2	67	41	26	10,75	0,0131*	79	41	38	7,74	0,0517	81	25	56	3,86	0,277		
	G3	103	79	24		141	87	52			142	43	99					
	G4	6	5	1		3	2	1			3	0	4					
Resektionsrand	R0	134	88	46	3,51	0,06	167	91	76	1,04	0,308	170	54	116	0,04	0,841		
	R1	50	40	10		68	42	26			69	21	48					
x2 -Wert, p-Wert																		

χ² -Wert, p-Wert

Eine signifikant höhere Anzahl CD163 positiv gezählter Zellen in den Patienten mit den Tumorstadien pT3 und pT4 im Vergleich zu den Patienten mit den Tumorstadien pT1 und pT2 verifiziert die beobachtete Korrelation (pT1-pT2: 74 (95% KI 82 - 95) vs. pT3-pT4: 87 (95% KI 49 - 82), $p = 0,0066$) (**Abb. 21B**). Demgegenüber konnte für iNOS positive Makrophagen kein Zusammenhang mit dem Tumorstadium detektiert werden (**Tab. 4.3**) (**Abb. 21C**). Während für CD68 und iNOS kein Zusammenhang zwischen der Stärke bzw. der Anzahl positiver Zellen mit der Tumordinfiltration der Lymphknoten beobachtet werden konnte, korrelierte der Grad der Lymphknotenmetastasierung signifikant mit der Stärke der CD163 Färbung.

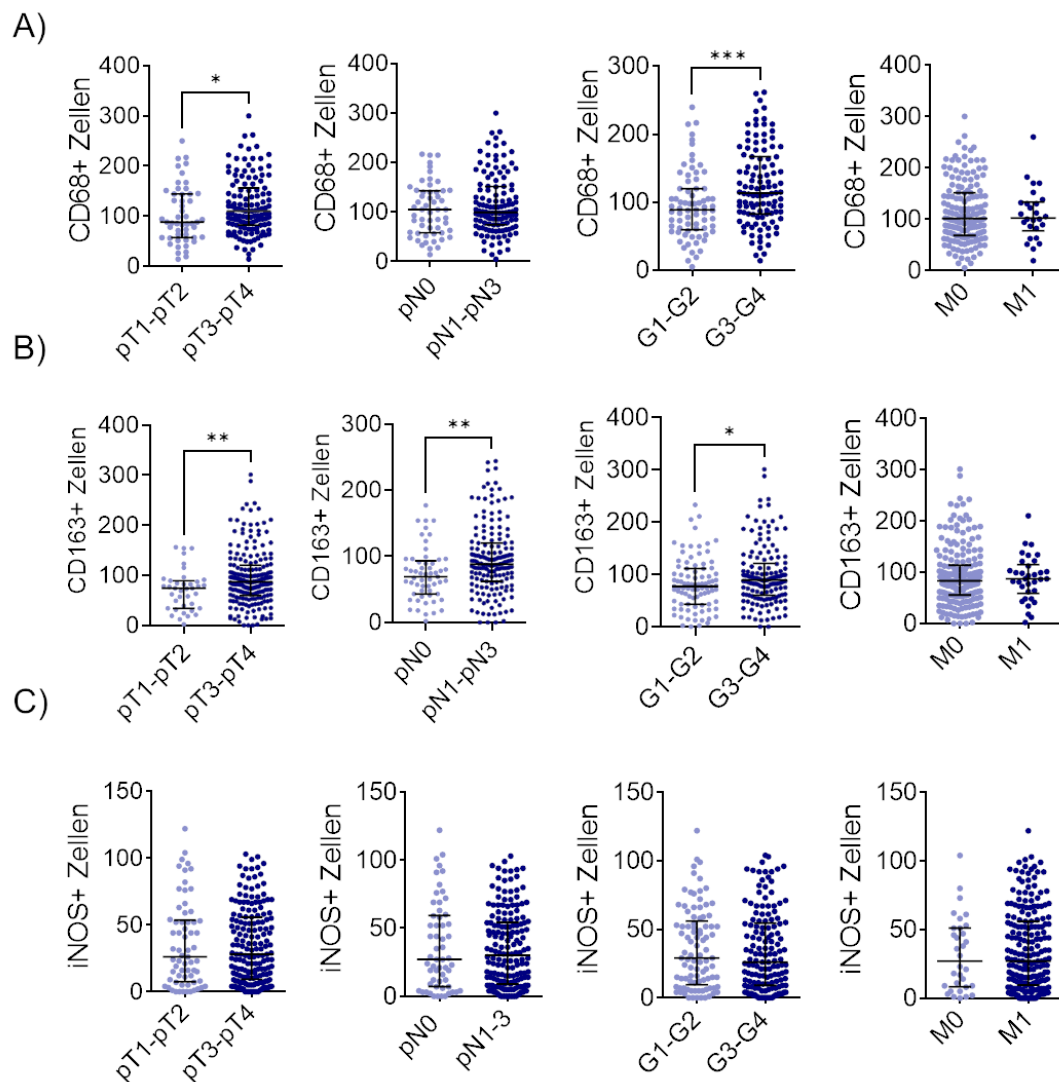


Abbildung 21: Absolute Zellzahl der **A)** CD68, **B)** CD163 und **C)** iNOS positiven Makrophagenpopulation in GEAC-Patienten mit verschiedenen klinisch-pathologischen Stadien. Verglichen wurde jeweils der Progress der Tumordinfiltration (pT1-pT2 vs. pT3-pT4), das Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung (pN0 vs. pN1-pN3), der Grad der Differenzierung (G1-G2 vs. G3-G4) und das Vorliegen einer Fernmetastasierung (M0 vs. M1). Ergebnisse wurden als mediane Makrophagenanzahl und interquartiler Abstand dargestellt. Für die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Hier zeigte sich zum Beispiel, dass 1,7 mal mehr Patienten mit einer ausgedehnten Lymphknotenmetastasierung pN3 eine starke CD163-Färbung aufwiesen ($\chi^2 = 8,96$; $p = 0,0297$) (**Tab. 4.3**). Zusätzlich war die mediane Anzahl der CD163-positiven Makrophagen signifikant höher in Patienten mit vorliegender Lymphknotenmetastasierung im Vergleich zu Patienten mit tumorfreien Lymphknoten (pN0: 69 (95% KI 62 - 83) vs. pN1-pN3: 88 (95% KI 87 - 103), $p = 0,0014$) (**Abb. 21B**). Eine Assoziation der Makrophagenmarker mit einer Fernmetastasierung wurde jedoch nicht festgestellt (**Abb. 21A,B,C**). Der Grad der Differenzierung der Tumorzellen zeigte eine signifikante Assoziation mit der Stärke der CD68-Färbung. Hier wiesen insbesondere die Patienten mit ausgeprägten dedifferenzierten Tumoren (G4) eine starke CD68 Färbung auf ($\chi^2 = 10,75$; $p = 0,0131$) (**Tab. 4.3**). Zusätzlich ist die mediane Anzahl positiver CD68- und CD163-Zellen signifikant höher in Patienten mit einer G3-G4-Differenzierung im Vergleich zu Patienten mit einer G1-G2-Differenzierung (CD68: G1-G2: 89 (95% KI 84 - 108) vs. G3-G4: 114 (95% KI 113 - 135), $p = 0,0010$), (CD163: G1-G2: 77 (95% KI 72 - 92) vs. G3-G4: 89 (95% KI 89 - 107), $p = 0,0336$) (**Abb. 21A,B**). Bezüglich des UICC-Stadiums konnten signifikante Korrelationen für CD68 und CD163 festgestellt werden, während die Stärke der iNOS-Färbung keine Korrelation mit dem UICC-Stadium aufweist. Für das fortgeschrittene UICC-Stadium IV zeigte sich zum Beispiel, dass 4,5 mal mehr Patienten eine starke CD68-Färbung aufwiesen als eine schwache CD68-Färbung. ($\chi^2 = 14,49$; $p = 0,0432$) (**Tab. 4.3**). Eine vergleichbare Beobachtung konnte für CD163 im UICC-Stadium IV gemacht werden. In diesem Stadium wiesen 2,6 mal mehr Patienten eine starke CD163-Färbung als eine schwache CD163-Färbung ($\chi^2 = 15,20$; $p = 0,0355$) (**Tab. 4.3**). Abschließend wurde keine Korrelation zwischen der Stärke der Makrophagenmarker und dem Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand festgestellt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass GEAC-Patienten mit einer hohen Anzahl CD68- und CD163-positiver tumorinfiltrierender Makrophagen ein fortgeschrittenes Tumorstadium, eine Lymphknotenmetastasierung, eine Tumordifferenzierung und ein fortgeschrittenes UICC-Stadium aufwiesen.

4.1.4 Eine starke CD68+ und CD163+ Makrophagen Infiltration korreliert mit einem reduziertem Gesamtüberleben von GEAC-Patienten

Die vorangegangene Untersuchung zeigte, dass eine starke Tumordinfiltration von CD68 und CD163 positive Makrophagen mit einem erhöhten Krankheitsprogress im GEAC verbunden ist. Ob dieser Makrophagen induzierte Krankheitsprogress auch Einfluss auf das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten hat, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden. Der Beobachtungszeitraum der Patientenkohorte startete ab dem Datum der Tumoresektion und betrug insgesamt 143 Monate. Patienten, die in einem Zeitraum von 30 Tagen nach Operation verstorben sind, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. So konnten die Daten von 342 Patienten untersucht werden. Das mediane Gesamtüberleben des gesamten Patientenkollektivs betrug vom Zeitpunkt der Tumoresektion 23 Monate. Die 5- und 10-Jahresüberlebensrate (JÜLR) betrug 7,9 % und 1,7 %.

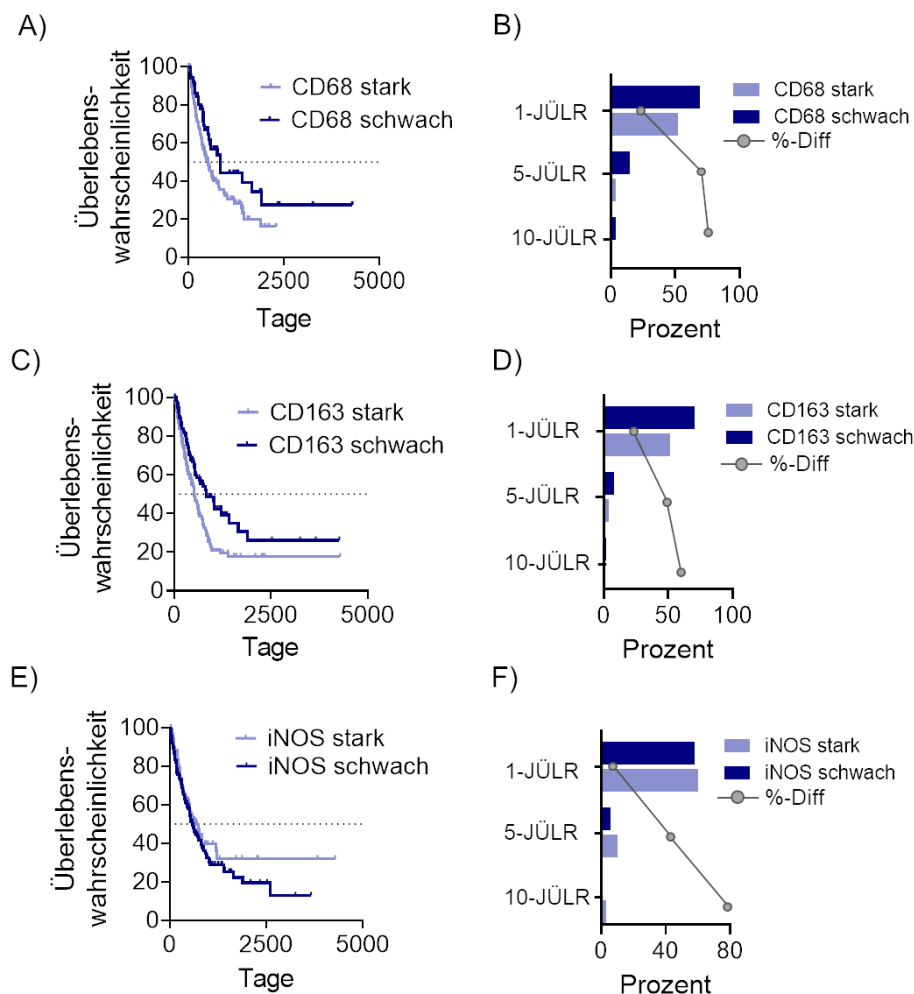


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von **A)** CD68 (stark und schwach), **C)** CD163 (stark und schwach) sowie **E)** iNOS (stark und schwach). Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Darstellung der 1-5- und 10-Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz von **B)** CD68 (stark und schwach), **D)** CD163 (stark und schwach) sowie **F)** iNOS (stark und schwach)

Für die Log-Rank Überlebenszeitanalyse der infiltrierenden CD68 positiven Makrophagen konnten 171 Patienten eingeschlossen werden. Mit einem medianen Gesamtüberleben von 17 Monaten, zeigten die Patienten mit hoher Tumordinfiltration von CD68 positiven Makrophagen ein um 11 Monate reduziertes Überleben als Patienten mit niedriger Anzahl CD68 positiver Makrophagen. Dabei wiesen die Patienten mit starker CD68 Färbung ein 57 % höheres Sterberisiko auf, als Patienten mit schwacher CD68 Färbung (CD68 stark: HR = 1,57 (95% KI, 1,046 - 2,353), $p = 0,0417$) (**Abb. 22A**) (**Tab. 4.4**). Ferner betrug die 1-JÜLR, 5-JÜLR und 10-JÜLR für Patienten mit ausgeprägter Infiltration CD68 positiver Makrophagen 52,1 %, 4,2 % und 0,84 % während diese bei Patienten mit niedriger Infiltration CD68 positiver Makrophagen 69,1 %, 15,3 % und 3,8 % betrug. Es zeigte sich somit, dass die prozentuale Differenz der Überlebensraten der Patienten insbesondere im späten Beobachtungszeitraum stark voneinander abweichen (**Abb. 22B**). Vergleichende Beobachtungen konnte für die CD163 Färbung gemacht werden. Hier wurde die Überlebenszeitanalyse für 217 Patienten durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein medianes Gesamtüberleben der Patienten mit starker CD163 Färbung von 17 Monaten, während Patienten mit schwacher CD163 Färbung ein medianes Gesamtüberleben von 28 Monaten aufwiesen. Das Sterberisiko lag dabei um 56 % signifikant höher in den Patienten mit hoher Anzahl tumorinfiltrierender CD163 positiver Makrophagen als in Patienten mit niedriger Infiltration CD163 positiver Makrophagen (CD163 stark: HR = 1,56 (95% KI, 1,102 - 2,126), $p = 0,0074$) (**Abb. 22C**) (**Tab. 4.4**). Darüber hinaus war die Anzahl überlebender Patienten mit schwacher CD163 Färbung nach einem Jahr, nach 5 Jahren und 10 Jahren um 26,8 %, 51,2 % und 60,9 % höher als mit starker CD163 Färbung (**Abb. 22B**).

Tabelle 4.4: Log-rank (Mantel-Cox) Überlebensanalyse des Tissue Microarray

	HR	95% Konfidenzintervall		P-Wert	Medianes Überleben	5 Jahres Überlebensrate
		unteres	oberes			
CD68 stark	1,569	1,046	2,353	0,0417*	17 Monate	4,2%
CD68 schwach	0,6374	0,425	0,956		28 Monate	15,3%
CD163 stark	1,562	1,102	2,216	0,0074**	17 Monate	4,1%
CD163 schwach	0,6176	0,4356	0,8758		28 Monate	8,4%
iNOS stark	0,8311	0,5759	1,199	0,3229	22 Monate	10,0%
iNOS schwach	1,203	0,8338	1,736		20 Monate	5,9%

Der Einfluss der iNOS-positiven Makrophagen auf das Gesamtüberleben zeigte ein gegenläufiges, aber nicht signifikantes Ergebnis. Die Analyse von 222 Patienten stellte keinen Unterschied des medianen Gesamtüberlebens der Patienten mit iNOS-starker und iNOS-schwacher Färbung fest (iNOS stark: 22 Monate vs. iNOS schwach: 20 Monate) (**Abb. 22E**). Jedoch war das Sterberisiko um 17 % niedriger in Patienten mit schwacher iNOS-Färbung als in Patienten mit starker iNOS-Färbung (iNOS stark: HR = 0,83 (95% KI, 0,576 - 1,199), $p = 0,3229$). Von dieser Gruppe der Patienten überlebten darüber hinaus nach 5 Jahren doppelt so viele (**Abb. 22F**) (**Tab. 4.4**).

Da insbesondere für Tumorerkrankungen mehrere Variablen das Überleben beeinflussen können, wurde mit Hilfe der multivariaten Cox-Regression untersucht, ob die Anzahl tumorinfiltrierender Makrophagen unabhängige Risikofaktoren für ein reduziertes Gesamtüberleben darstellt. Hier stellten sich zunächst das Alter und das Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung als unabhängige prognosebestimmende Einflussgrößen dar. Das Risiko der GEAC-Patienten, zu versterben, stieg pro Lebensjahr signifikant um 5 % (Alter: HR = 1,05 (95% KI, 1,021 - 1,071), $p = 0,0002$). Für Patienten, die bereits eine Lymphknotenmetastasierung aufwiesen, war das Sterberisiko unabhängig anderer Einflussgrößen um das 2,03-fache höher im Vergleich zu Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung (Lymphknotenmetastasen: HR = 2,03, (95% KI, 1,224 - 3,552), $p = 0,0091$).

Tabelle 4.5: Multivariate Analyse mittels Cox Regressionsmodell des Tissue Microarray

	HR	95% Konfidenzintervall		P-Wert
		oberes	unteres	
Alter	1,05	1,021	1,071	0,0002***
Geschlecht	1,33	0,7186	2,688	0,3972
Tumorstadium	0,98	0,7124	1,399	0,9117
Lymphknotenmetastasen	2,03	1,224	3,552	0,0091**
Grading	1,47	0,929	2,348	0,1033
UICC Stadium	0,95	0,6471	1,347	0,7938
Fernmetastasen	1,13	0,5437	2,225	0,7356
Resektionsrand	1,14	0,6829	1,872	0,6106
CD68	1,20	0,7177	2,059	0,5009
CD163	1,09	0,6428	1,878	0,7558
iNOS	0,99	0,5979	1,606	0,9769

Unter den Makrophagenmarkern zeigte sich keiner als signifikante unabhängige Einflussgröße auf das Sterberisiko. Allerdings war das korrigierte Sterberisiko der Patienten mit hoher Anzahl CD68-positiver Makrophagen 20 % höher als das Sterberisiko der Patienten mit niedriger Anzahl CD68-positiver Makrophagen (CD68: HR = 1,20 (95% KI, 0,7177 - 2,059), $p = 0,5009$). Weitere, jedoch nicht signifikante unabhängige Risikofaktoren für ein reduziertes Gesamtüberleben waren ein männliches Geschlecht und schlecht differenzierte Tumore (Geschlecht: HR = 1,33 (95% KI, 0,7186 - 1,399), $p = 0,3972$), (Grading: HR = 1,47 (95% KI, 0,929 - 2,348), $p = 0,1033$) (**Tab. 4.5**).

In der Zusammenschau konnte die immunhistologische Auswertung der GEAC-Patientenkohorte die Ergebnisse der Transkriptomanalysen bestätigen und zeigte ferner, dass insbesondere die CD68- und CD163-positive M2-Makrophagenpopulation einen eindeutigen Einfluss auf den Krankheitsprogress, das Sterberisiko und das Gesamtüberleben hat. Vorangegangene Studien demonstrierten bereits, dass Makrophagen einen vielfältigen Einfluss auf den Phänotyp von Tumorzellen haben können. Für das GEAC gibt es dabei nur wenige Arbeiten, die diesen Einfluss genauer charakterisieren. Darüber hinaus sind bisher nur vereinzelt die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, wie Makrophagen Einfluss auf GEAC-Tumorzellen haben, bekannt. Deshalb beschäftigt sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit mit der *in vitro*-Untersuchung des Einflusses von Makrophagen auf GEAC-Zelllinien.

4.2 Einfluss von Makrophagen auf GEAC-Zellen

4.2.1 THP-1 Makrophagen fördern die Proliferation von GEAC-Zelllinien

Um den zugrundeliegenden molekularen Einfluss der Makrophagen auf GEAC-Zellen zu charakterisieren, wurde ein indirektes *in vitro*-Kokultursystem etabliert. Dieses System stellt eine Möglichkeit dar, zwei Zellpopulationen über das Medium in Kontakt zu setzen, ohne direkten Zellkontakt, und eignet sich für die Untersuchung der Interaktion über lösliche Faktoren (**siehe Kapitel 3.2.6**).

Als Makrophagen-Modell wurde die gut charakterisierte Monozyten-Zelllinie THP-1 verwendet. Diese kann unter Stimulation mit PMA für 24 Stunden und anschließender Kultivierung in frischem Medium über drei Tage in einen naiven Makrophagenphänotyp differenziert werden. Die THP-1-Makrophagen wurden anschließend für drei weitere Tage mit unterschiedlichen GEAC-Zelllinien (PT1590, LN1590, NCI-N87, SKGT4, OE33, PT6216) kokultiviert. Zu Beginn wurde die Morphologie der GEAC-Zellen nach Mono- und Kokultur analysiert. Unter den monokultivierten GEAC-Zellen wiesen die NCI-N87, OE33 und SKGT4 konfluierende epitheliale Zellverbände auf, während die monokultivierten PT1590, LN1590 und PT6216 überwiegend vereinzelte und morphologisch heterogene Zellen auf-

wiesen. Nach der Kokultur zeigten sich im Vergleich zur Monokultur eindeutige morphologische Veränderungen in den GEAC-Zellen. Die PT1590- und LN1590-Zellen zeigten in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen eine erhöhte Zelldichte. Dabei waren die Zellen kleiner und wirkten teilweise weniger adhären. Die THP-1-kokultivierten NCI-N87-Zellen wiesen ebenfalls eine erhöhte Zelldichte auf und zeigten mehr konfluierende Zellverbände auf als monokultivierte NCI-N87-Zellen. Die mono- und THP-1-kokultivierten OE33- und SKGT4-Zellen zeigten keine Veränderungen in der Zelldichte auf. Jedoch zeigten die THP-1-kokultivierten SKGT4- und OE33-Zellen vermehrt mesenchymal spindelförmige Zellen auf (**Abb. 23A, schwarze Pfeile**).

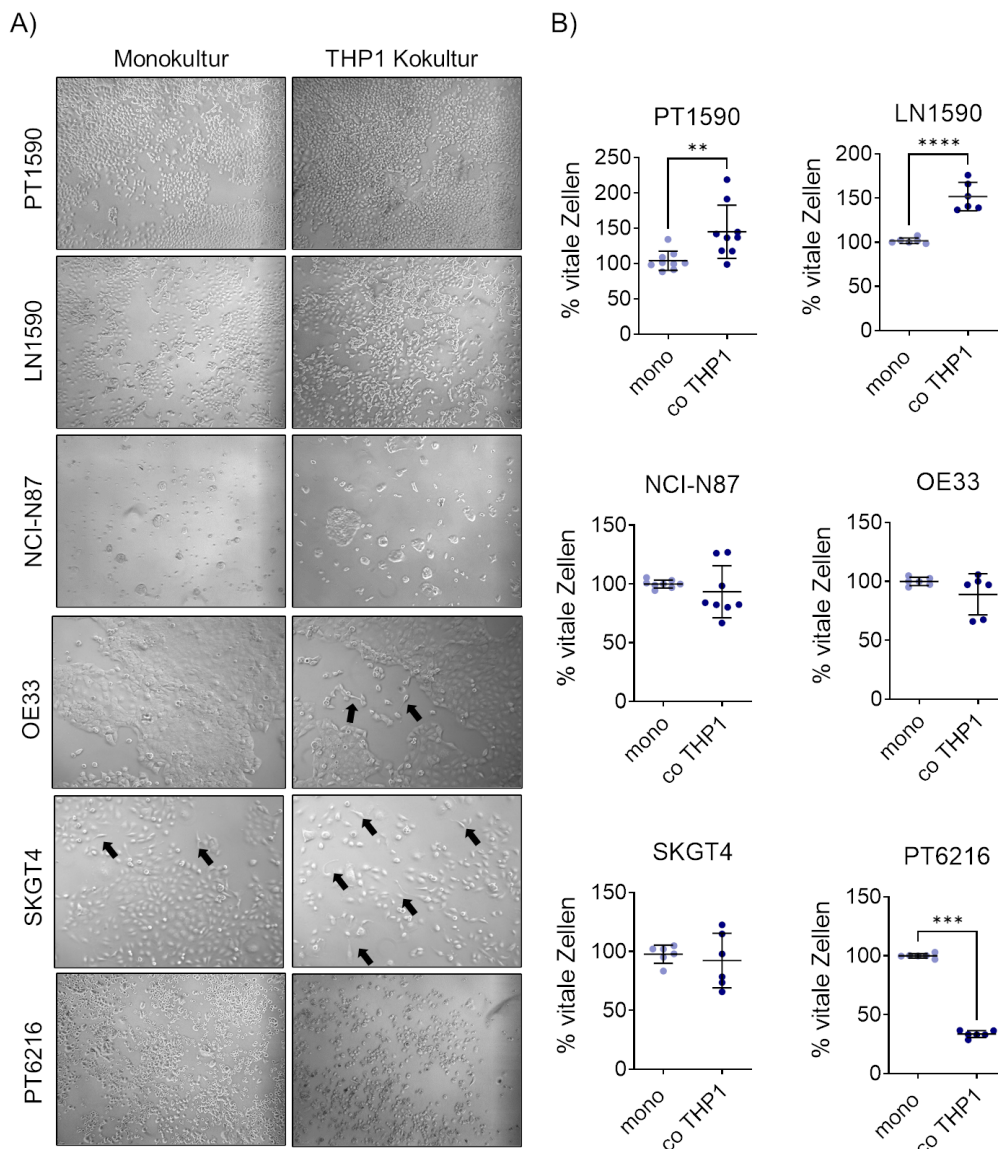


Abbildung 23: A) Repräsentative Phasenkontrastbilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert. Die schwarzen Pfeile markieren spindelförmig konfigurierte Tumorzellen. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Analyse der vitalen GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und anschließend wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Im Vergleich zu monokultivierten PT6216-Zellen wiesen die PT6216-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen eine reduzierte Zelldichte und vermehrt nicht adhärente, in Suspension schwimmende Zellen auf (**Abb. 23A**). Da nach THP-1-Kokultur Veränderungen der Zelldichte in den GEAC-Zelllinien festgestellt worden sind, wurde in einem nächsten Schritt mittels MTT-Analyse der Anteil vitaler Zellen nach Mono- und Kokultur quantifiziert. Hier zeigten sich insbesondere bei den Zelllinien PT1590, LN1590 und PZ6216 signifikante Veränderungen des prozentualen Anteils vitaler Zellen zwischen der Mono- und THP-1-Kokultur. Dabei zeigten THP-1-kokultivierte PT1590-Zellen einen 1,58-mal höheren Anteil vitaler Zellen als monokultivierte PT1590-Zellen (Mono: $99,95 \pm 3,27 \%$ vs. co THP-1: $157,7 \pm 16,03 \%$, $p = 0,0055$). Ferner wiesen die LN1590-Zellen in der Anwesenheit der THP-1-Makrophagen signifikant mehr vitale Zellen auf, als die monokultivierten LN1590-Zellen (Mono: $101,7 \pm 1,29 \%$ vs. co THP-1: $151,7 \pm 6,575 \%$, $p < 0,0001$). Der Anteil vitaler NCI-N87- und OE33-Zellen nach THP-1-Kokultur war $19,2 \pm 7,73 \%$, $p = 0,0321$ bzw. $31,28 \pm 11,09 \%$, $p = 0,0182$ höher als in monokultivierten NCI-N87- und OE33-Zellen. Demgegenüber hatten die THP-1-Makrophagen keinen Einfluss auf den Anteil vitaler Zellen in den SKGT4- und PT6216-Zellen (**Abb. 23B**). Ob der höhere Anteil vitaler GEAC-Zellen nach THP-1-Kokultur durch eine gesteigerte Proliferation zu erklären ist, sollte als Nächstes durch IFF des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht werden (**Abb. 24A**). Hinsichtlich der monokultivierten GEAC-Zellen konnten mit $24,09 \pm 3,35 \%$ und $34,31 \pm 4,12 \%$ Ki67-positiven Zellen vergleichbare Proliferationsindizes für die PT1590- und LN1590-Zellen festgestellt werden. Die NCI-N87, OE33 und SKGT4 zeigten eine etwas niedrigere Proliferationsrate mit $14,98 \pm 2,08 \%$ bzw. $19,56 \pm 11,93 \%$ und $14,71 \pm 1,74 \%$. Die niedrigste Anzahl proliferierender Zellen wiesen die PT6216-Zellen auf. Dabei betrug der Proliferationsindex $8,15 \pm 0,37 \%$ (**Abb. 24B**). Die Quantifizierung Ki67-positiver Zellen in mono- und THP-1-kokultivierten GEAC-Zellen ergab signifikante Differenzen der Proliferation in den PT1590 und NCI-N87, während keine Proliferationsunterschiede zwischen den mono- und THP-1-kokultivierten LN1590, OE33, SKGT4 und PT6216 festgestellt wurden. So konnten mit einem Proliferationsindex von $38,4 \pm 3,98 \%$ 1,59-mal mehr Ki67-positive Zellen in den PT1590-Zellen nach THP-1-Kokultur als nach Monokultur detektiert werden ($p = 0,0156$). Darüber hinaus zeigten die NCI-N87-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen mit einer Differenz des Proliferationsindex von $7,99 \pm 2,81 \%$ signifikant mehr Ki67-positiven Zellen als die monokultivierten NCI-N87-Zellen ($p = 0,0131$).

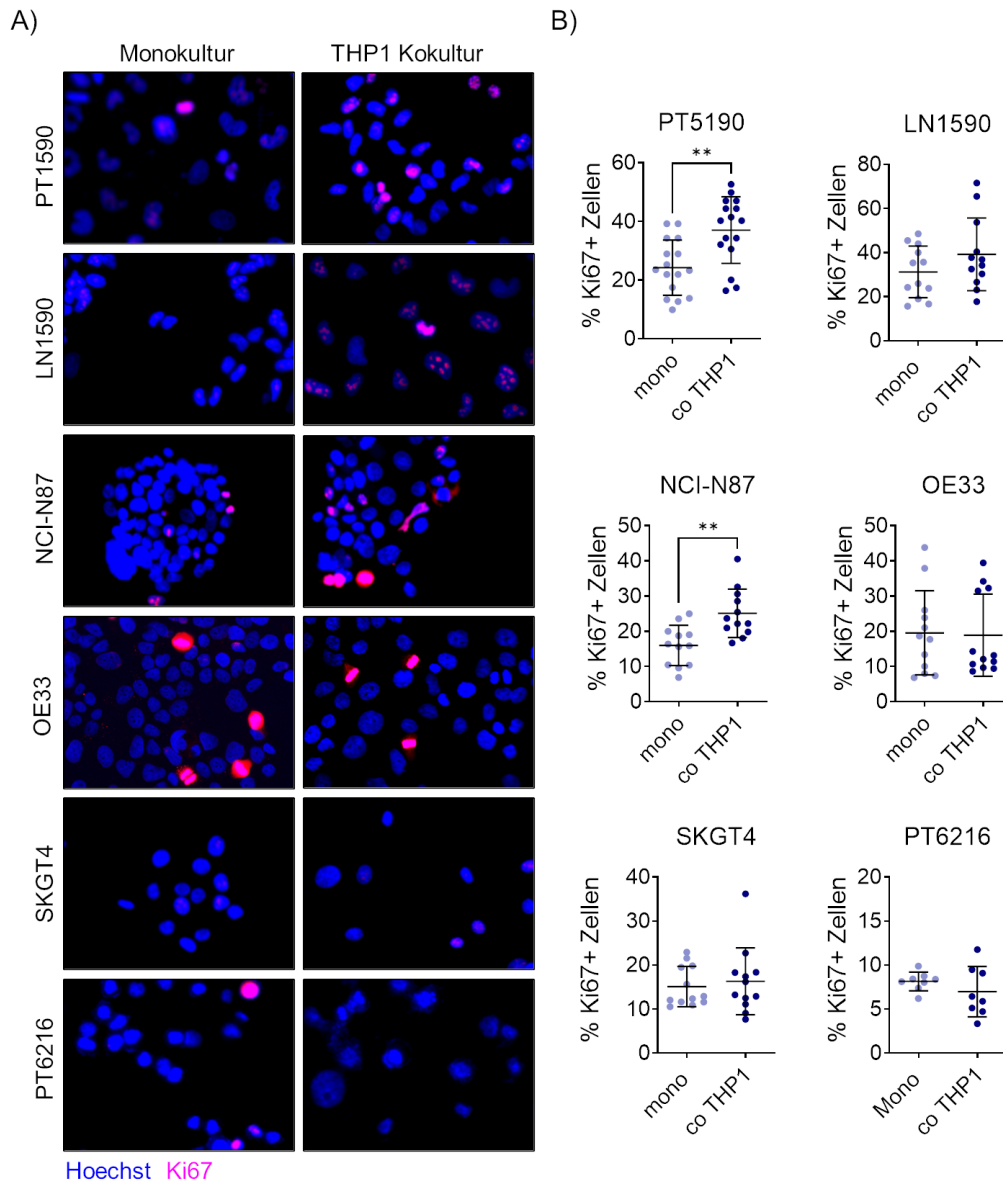


Abbildung 24: A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert. Die pinken Zellen stellen die proliferativ-aktiven Zellen dar. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Analyse des Proliferationsindex der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und anschließend wurde der Ki67-Proliferationsindex mittels IFF-Färbung bestimmt. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Eine verstärkte Zellteilung kann zusätzlich durch den Nachweis von regulatorischen Zellzyklus-Proteinen beurteilt werden. Insbesondere die vermehrte Bildung von Cyclinen ist mit einer erhöhten Proliferationsaktivität verbunden. Aus diesem Grund wurden die regulatorischen Untereinheiten Cyclin D1 und Cyclin E1 der Cyclin-abhängigen Kinasen im Western Blot beurteilt (**25A**). Es zeigte sich, dass die Zellen NCI-N87, OE33 und SKGT4 sowie die PT6216 in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen keine signifikante Veränderung in der Bildung von Cyclin D1 und Cyclin E1 im Vergleich zur Monokultur aufwiesen. Jedoch konnte deutlich vermehrte Bildung von Cyclin D1 und Cyclin E1 in THP-1-kokultivierten PT1590- und LN1590-Zellen im Vergleich zu monokultivierten PT1590- und LN1590-Zellen detektiert werden. Hier zeigten densitometrische Auswertungen, dass Cyclin D1 und Cyclin E1 in einer 1,68-fach bzw. 1,56-fach höheren Menge in den THP1-kokultivierten PT1590 Zellen nachgewiesen werden konnte. Ähnliche Befunde konnten für die LN1590 erhoben werden. Hier stellte sich für Cyclin D1 eine 1,74-fach und für Cyclin E1 eine 1,91-fach höhere Proteinmenge in Anwesenheit der THP1-Makrophagen (**25B**).

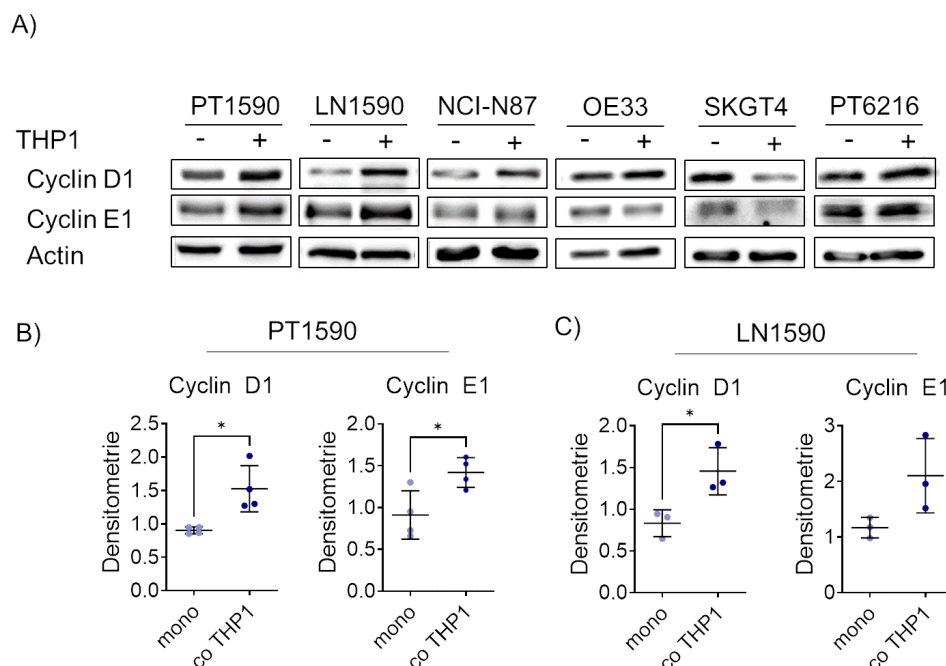


Abbildung 25: A) Repräsentative Western-Blot-Bilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert. Die Gele wurden mit 10 µg Proteinlysat beladen. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet **B)** Densitometrische Analyse der Cyclin D1 und Cyclin E1 Menge in den mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590 und LN1590 Zellen. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensität wurde anschließend auf die Ladekontrolle Actin normalisiert. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

4.2.2 Ki67 Proliferationsindex korreliert mit der Anzahl CD68+ und CD163+ Makrophagen in GEAC-Patienten

Die Kokulturversuche demonstrierten, dass die GEAC-Zelllinien PT1590 und NCI-N87 in der Gegenwart eine höhere Proliferationsrate aufwiesen als die monokultivierten PT1590- und NCI-N87-Zellen.

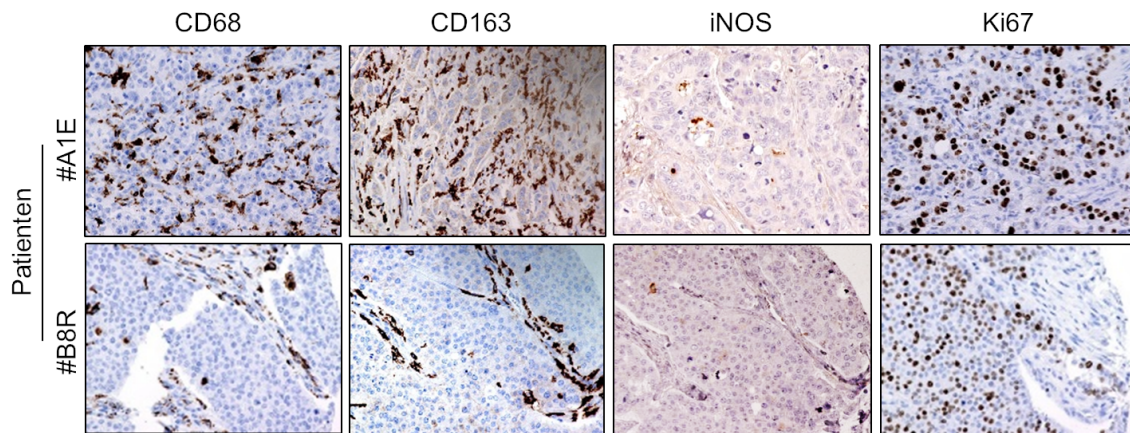
Tabelle 4.6: Korrelationsanalyse des Ki67 Proliferationsindex mit verschiedenen Makrophagenpopulationen und klinisch-pathologisch Parametern im GEAC

		Ki67					
		n	< 10 %	10 - 60 %	> 60 %	Mittelwert	Median
Alle		204	75	120	13	22,6	15
Alter	> 60	132	50	79	3	5,61	0,0606
	< 60	72	24	41	7		
Geschlecht	männlich	170	66	97	7	3,647	0,1615
	weiblich	34	8	23	3		
Tumorstadium	pT1a	6	5	1	0	30,28	0,0008***
	pT1b	31	15	15	1		
	pT2	18	6	11	1		
	pT3	131	42	82	7		
	pT4a	10	2	7	1		
	pT4b	3	0	1	2		
Lymphknoten-metastasen	pN0	55	27	25	5	10,92	0,0909
	pN1	40	12	28	0		
	pN2	44	14	26	4		
	pN3	56	15	36	5		
UICC Stadium	IA	33	18	14	1	32,97	0,0029**
	IB	5	4	2	0		
	IIA	19	7	10	2		
	IIB	6	2	4	0		
	IIIA	39	12	26	1		
	IIIB	29	9	19	1		
	IIIC	47	16	28	3		
	IV	22	3	15	4		
Fernmetastasen	M0	179	68	103	8	18,62	<0,0001****
	M1	25	5	13	7		
Grading	G1	9	6	3	0	10,49	0,1056
	G2	71	27	42	2		
	G3	114	34	68	12		
	G4	6	3	2	1		
Resektionsrand	R0	147	57	82	8	5,035	0,0806
	R1	54	14	33	7		
CD68	Stark	128	35	85	8	14,85	0,0006***
	Schwach	54	31	21	2		
CD163	Stark	95	29	61	5	1,415	0,4929
	Schwach	63	25	35	3		
iNOS	Stark	49	20	26	3	1,188	0,5521
	Schwach	111	36	69	6		

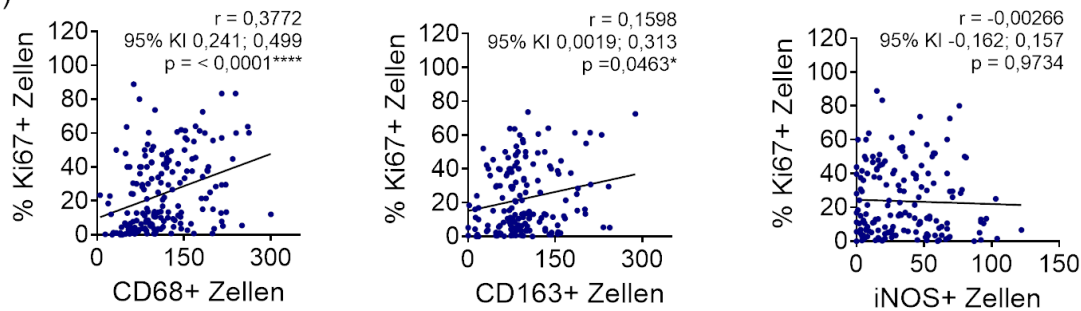
χ^2 -Wert, p-Wert

Um die Befunde in der GEAC-Patientenkohorte zu verifizieren, wurde eine immunhistologische Analyse des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Hier wurde der Proliferationsindex in Prozent Ki67 bestimmt und die Patienten wurden anschließend den folgenden drei Gruppen zugeordnet: Niedrig proliferative Tumore = Ki67 < 10 %, moderat proliferative Tumore = Ki67 10 % - 60 %, hoch proliferative Tumore = Ki67 > 60 % (**Tab. 4.6**).

A)



B)



C)

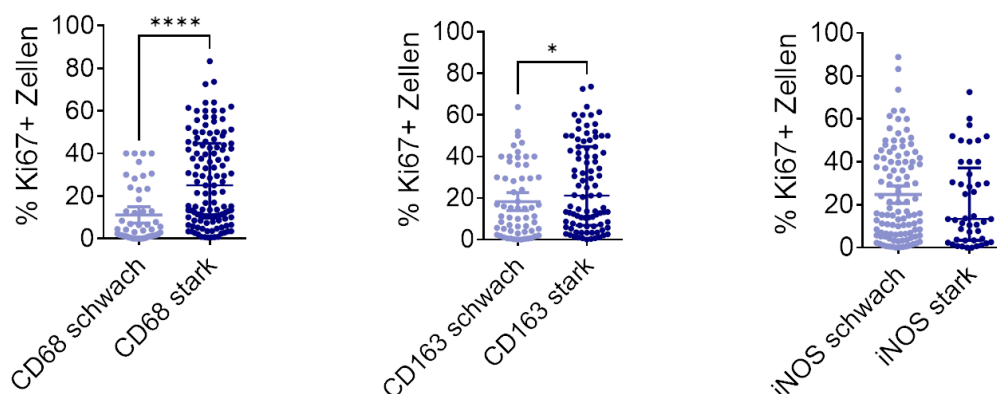


Abbildung 26: A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von CD68, CD163, iNOS und Ki67 in zwei repräsentativen Patienten. **B)** Korrelationsanalyse der CD68-, CD163- und iNOS-positiven Tumorzellen mit dem prozentualen Anteil Ki67-positiver Tumorzellen. Korrelationskoeffizient und statistische Signifikanz wurden bei nicht normalverteilten Daten mittels Spearman-Korrelation (Rangkorrelation) bestimmt. **C)** Quantifizierung des prozentualen Anteils Ki67-positiver Zellen in Patienten mit schwacher bzw. starker CD68-, CD163- und iNOS-Infiltration. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Bestimmung der statistischen Signifikanz und des p-Werts durch den Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.)

Der Ki67-Proliferationsindex konnte für 204 Gewebesots analysiert werden. Dabei wiesen 75 (36,8 %) Patienten niedrig proliferative Tumore, 120 (58,8 %) Patienten moderat proliferative und 13 (6,4 %) Patienten hoch proliferative Tumore auf. Die durchschnittliche und mediane Proliferationsrate betrug 22,6 % und 15 %. Eine signifikante Assoziation des Proliferationsindex konnte mit dem Tumorstadium, dem UICC-Stadium, der Fernmetastasierung und der Menge der CD68-positiven Makrophagen beobachtet werden. Nicht signifikante Zusammenhänge des Proliferationsindex konnten darüber hinaus für das Alter, der Lymphknotenmetastasierung und dem Resektionsrand festgestellt werden. So wiesen GEAC-Patienten unter 60 Jahren mit einem Anteil von 9,7 % vermehrt hochproliferative Tumore auf, während die GEAC-Patienten über 60 Jahre in 2,3 % der Fälle hochproliferative Tumore aufwiesen ($\chi^2 = 5,61$; $p = 0,0606$). Wie zu erwarten, zeigten die Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium einen hohen Anteil an hochproliferativen Tumoren. Dabei wiesen 23,1 % der Patienten mit einem pT4-Stadium Tumore mit einem Ki67-Proliferationsindex von > 60 % auf. Dieser wurde lediglich in 2,7 % der Patienten mit einem pT1-Stadium detektiert ($\chi^2 = 30,28$; $p = 0,0008$). Ferner zeigten 18,2 % der Patienten mit einem UICC-Stadium IV hoch proliferative Tumoren auf. Demgegenüber wurden mit 2,6 % der Patientin signifikant weniger hochproliferative Tumore im UICC-Stadium I beobachtet ($\chi^2 = 32,97$; $p = 0,0029$). Im Vergleich zu nicht metastasierten Patienten, wiesen Patienten mit einer Fernmetastasierung 6,2-mal häufiger hochproliferative Tumore auf ($\chi^2 = 18,62$; $p < 0,0001$). Zusätzlich korreliert der Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand mit hochproliferativen Tumoren (**Tab. 4.6**). Ferner waren insbesondere hochproliferative Tumore mit einer starken Infiltration von CD68-positiven Makrophagen assoziiert ($\chi^2 = 14,85$; $p < 0,0006$). Diese Assoziationen konnten nicht für die Makrophagenmarker CD163 und iNOS festgestellt werden. Jedoch zeigte sich in der Spearman-Korrelationsanalyse, dass CD68 und weniger ausgeprägt auch CD163 mit dem Ki67-Proliferationsindex korrelieren (CD68: $r = 0,3772$, $p < 0,0001$, CD163: $r = 0,1598$, $p = 0,0463$) (**Abb. 26AB**). Dabei wiesen Patienten mit starker Infiltration CD68-positiver Makrophagen einen medianen Ki67-Proliferationsindex von $25,0 \% \pm 35,04 \%$ auf, während Patienten mit niedriger Infiltration CD68-positiver Makrophagen einen medianen Ki67-Proliferationsindex von $4,37 \% \pm 7,70 \%$ aufwiesen ($p < 0,0001$). Ein ähnliches Verhalten konnte für CD163 beobachtet werden. Auch hier zeigten die Patienten mit starker Infiltration CD163-positiver Makrophagen einen signifikant höheren medianen Ki67-Proliferationsindex (CD163 schwach: $13,15 \% \pm 26,14 \%$ vs. CD163 stark: $21,18 \% \pm 37,84 \%$). In der Zusammenschau zeigte sich eine stark signifikante Korrelation des Ki67-Proliferationsindex mit dem Tumorstadium, dem UICC-Stadium, der Fernmetastasierung und den M2-Makrophagenmarkern CD68 und CD163 (**Abb. 26C**).

4.2.3 Makrophagen induzieren eine Resistenz gegenüber HER2 zielgerichteter Therapie in GEAC-Zellen

Eine große klinische Herausforderung in der Behandlung von GEAC-Patienten ist sowohl das fehlende Therapieansprechen als auch die sekundär erworbene Therapieresistenz gegenüber Chemotherapien. Aber auch zielgerichtete Therapien zeigen häufig einen fehlenden Therapieeffekt oder einen Wirkverlust im Verlauf der Therapie. So konnte bereits demonstriert werden, dass Zellen des Tumorstromas großen Einfluss auf die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapien haben. Jedoch ist der Einfluss von Makrophagen auf das Ansprechen sowie die erworbene Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien weitestgehend unbekannt. Bis zu 45 % der GEAC-Patienten zeigen eine Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors II (HER2), sodass für Patienten mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung eine zielgerichtete HER2-Therapie zugelassen ist. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss der THP-1-Makrophagen auf das Ansprechen einer zielgerichteten HER2-Therapie untersucht.

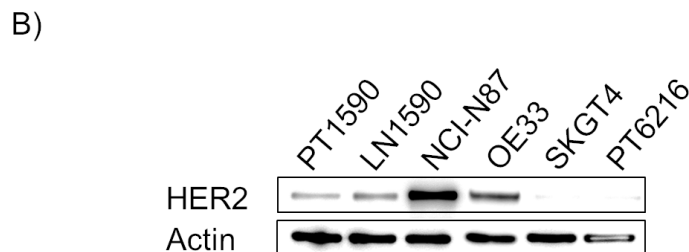
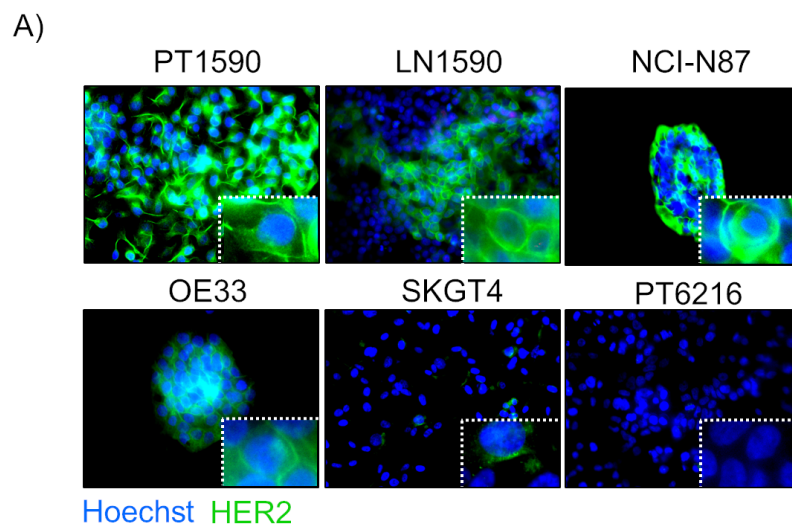


Abbildung 27: A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4, PT6216. Die grüne Färbung detektiert den HER2-Rezeptor. Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Repräsentative Western-Blot-Bilder GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4, PT6216. Detektiert wurde das Protein HER2. Das Gel wurde mit 15 µg Proteinlysate beladen. Actin diente als Ladekontrolle.

Zunächst wurden die GEAC-Zelllinien PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216 auf ihre HER2-Rezeptor-Expression hin untersucht. IFF- und Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87 und OE33 den HER2-Rezeptor exprimieren. Dieser ist vornehmlich membranös lokalisiert. Dabei wurde die höchste Expression in den NCI-N87-Zellen detektiert, während die SKGT4- und PT6216-Zellen den HER2-Rezeptor nicht bildeten (**Abb. 27AB**). Da die HER2-Rezeptor-Expression in den PT1590- und NCI-N87-Zellen nachgewiesen wurde und weil diese Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen die stärkste Proliferationsinduktion zeigten, wurden diese Zelllinien für die weiteren Versuche verwendet. Insbesondere das Ansprechen auf den HER2-TKI Lapatinib soll in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen untersucht werden. Die Auswahl der verwendeten Lapatinib-Dosen erfolgte nach Dosis-Wirkungs-Analysen und weiteren Literaturrecherchen. Hierbei erwiesen sich die Dosen von 2 μM und 1 μM für die PT1590- bzw. NCI-N87-Zellen für die weiteren Versuche als geeignet.

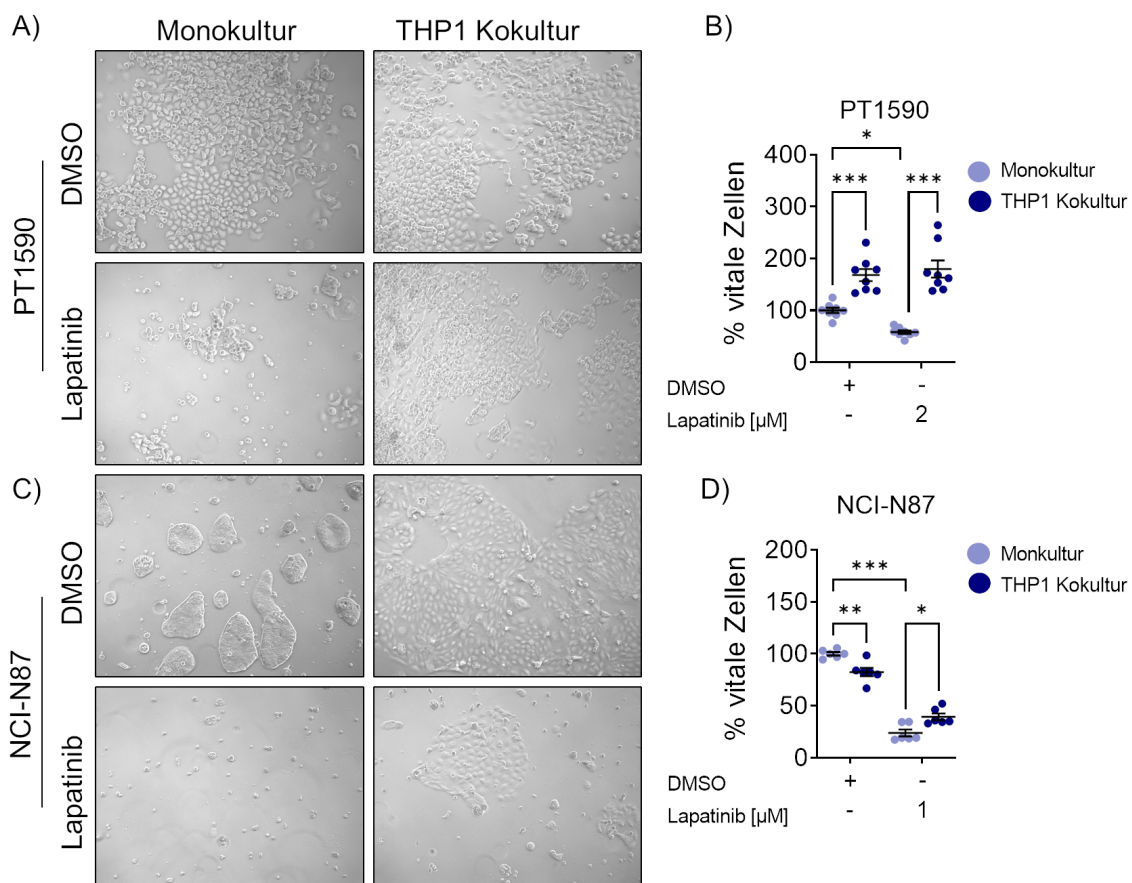


Abbildung 28: A,C) Repräsentative Phasenkontrastbilder der GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und zusätzlich mit Lapatinib behandelt (2 μM PT1590 und 1 μM NCI-N87). Eine DMSO Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B,D)** Analyse der vitalen GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001.

Morphologische Analysen zeigten einen eindeutigen wachstumsreduzierenden und zytotoxischen Effekt auf die PT1590- und NCI-N87-Zellen. Die Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen stellten sich im Vergleich zu den DMSO-behandelten PT1590-Zellen in einer geringeren Konfluenz und weniger adhärent dar. Dieser Effekt konnte deutlich ausgeprägter in den NCI-N87-Zellen beobachtet werden (**Abb. 28A,C**). In einem nächsten Schritt wurden die mono- bzw. THP-1-kokultivierten PT1590- und NCI-N87-Zellen mit DMSO oder Lapatinib behandelt und der Anteil der vitalen Zellen mittels MTT-Analyse untersucht. Es konnte zunächst wie in den vorherigen Analysen demonstriert werden, dass der Anteil vitaler PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen nach drei Tagen Kokultur signifikant höher war als der Anteil monokultivierter PT1590-Zellen (Mono DMSO: $100,0 \pm 14,119$ % vs. co THP-1 DMSO: $168,12 \pm 33,040$ %, $p < 0,001$). Die Lapatinib-Behandlung der PT1590-Zellen führte zu einer eindeutigen Abnahme vitaler Zellen um 41,9 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Mono DMSO: $100,0 \pm 14,12$ % vs. Mono Lapatinib: $58,07 \pm 9,09$ %, $p = 0,04$). Interessanterweise blieb das Ansprechen auf Lapatinib aus, sobald die PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen kokultiviert wurden. Dabei war der Anteil vitaler THP-1-kultivierter und Lapatinib-behandelter PT1590-Zellen 3,1-mal höher als der Anteil vitaler monokultivierter und Lapatinib-behandelter PT1590-Zellen (Mono Lapatinib: $58,07 \pm 9,09$ % vs. co THP-1 Lapatinib: $179,71 \pm 46,59$ %, $p < 0,001$) (**Abb. 28B**). Vergleichende Ergebnisse konnten für die NCI-N87-Zelllinie beobachtet werden. Hier zeigte sich jedoch, dass der Einfluss der THP-1-Makrophagen auf den Anteil vitaler DMSO-behandelter Zellen einen gegensätzlichen Befund aufwies. So reduzierte sich der Anteil vitaler THP-1-kokultivierter NCI-N87 um 17,6 % im Vergleich zum Anteil vitaler monokultivierter NCI-N87-Zellen (Mono DMSO: $100,0 \pm 3,96$ % vs. co THP-1 DMSO: $82,40 \pm 10,06$ %, $p = 0,005$). Darüber hinaus führte die Lapatinib-Behandlung in den monokultivierten NCI-N87-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der vitalen Zellen um 76,08 % (Mono DMSO: $100,0 \pm 3,96$ % vs. Mono Lapatinib: $23,92 \pm 8,19$ %, $p < 0,001$). Wurden die NCI-N87-Zellen jedoch in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen kokultiviert, stellten sich die Zellen im Vergleich zur Monokultur morphologisch mit einzelnen konfluierenden Zellverbänden deutlich vitaler dar. Darüber hinaus zeigte die MTT-Analyse einen 1,6-fach höheren Anteil vitaler THP-1-kokultivierter und Lapatinib-behandelter NCI-N87-Zellen als Lapatinib-behandelter monokultivierter NCI-N87-Zellen (Mono Lapatinib: $23,92 \pm 8,19$ % vs. co THP-1 Lapatinib: $39,43 \pm 7,79$ %, $p = 0,01$).

In einem nächsten Schritt wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen die Veränderung der Proliferation untersucht. Hierfür wurde, wie bereits in **Kapitel 4.2.1** beschrieben, der Proliferationsmarker Ki67 nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur mittels IFF analysiert. Korrespondierend zu den **Ergebnissen in 4.2.1** führte die DMSO-behandelte THP-1-Kokultur zu einer 1,9-fachen Proliferationssteigerung in den PT1590-Zellen im Vergleich zur DMSO-behandelten PT1590-Monokultur (Mono DMSO: $15,04 \pm 8,39$ % vs. co THP-1 DMSO: $29,03 \pm 19,29$ %, $p = 0,02$). Die Behandlung der PT1590-Zellen

mit Lapatinib führte zu einer Reduktion des Anteils an proliferativen Zellen um 4,4 % (Mono DMSO: $15,04 \pm 8,39$ % vs. Mono Lapatinib: $10,68 \pm 8,76$ %, $p = 0,82$). In der Anwesenheit der THP-1-Makrophagen blieb die Reduktion der Proliferation unter Lapatinib-Behandlung in den PT1590-Zellen jedoch aus. Dabei führte die THP-1-Kokultur zu einer 2,58-fach signifikant höheren Proliferationsrate in den Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen im Vergleich zu den monokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen (Mono Lapatinib: $10,68 \pm 8,76$ % vs. co THP-1 Lapatinib: $27,64 \pm 15,39$ %, $p = 0,008$) (**Abb. 29AB**). Für die NCI-N87-Zellen konnten vergleichende Befunde erhoben werden. Interessanterweise induzierten die THP-1-Makrophagen eine gesteigerte Proliferation in den NCI-N87-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, obwohl, wie in Kapitel 4.2.5 demonstriert, der Anteil an vitalen Zellen unter THP-1-Kokultur herabgesetzt war (Mono DMSO: $24,01 \pm 5,58$ % vs. co THP-1 DMSO: $36,07 \pm 12,39$ %, $p = 0,04$).

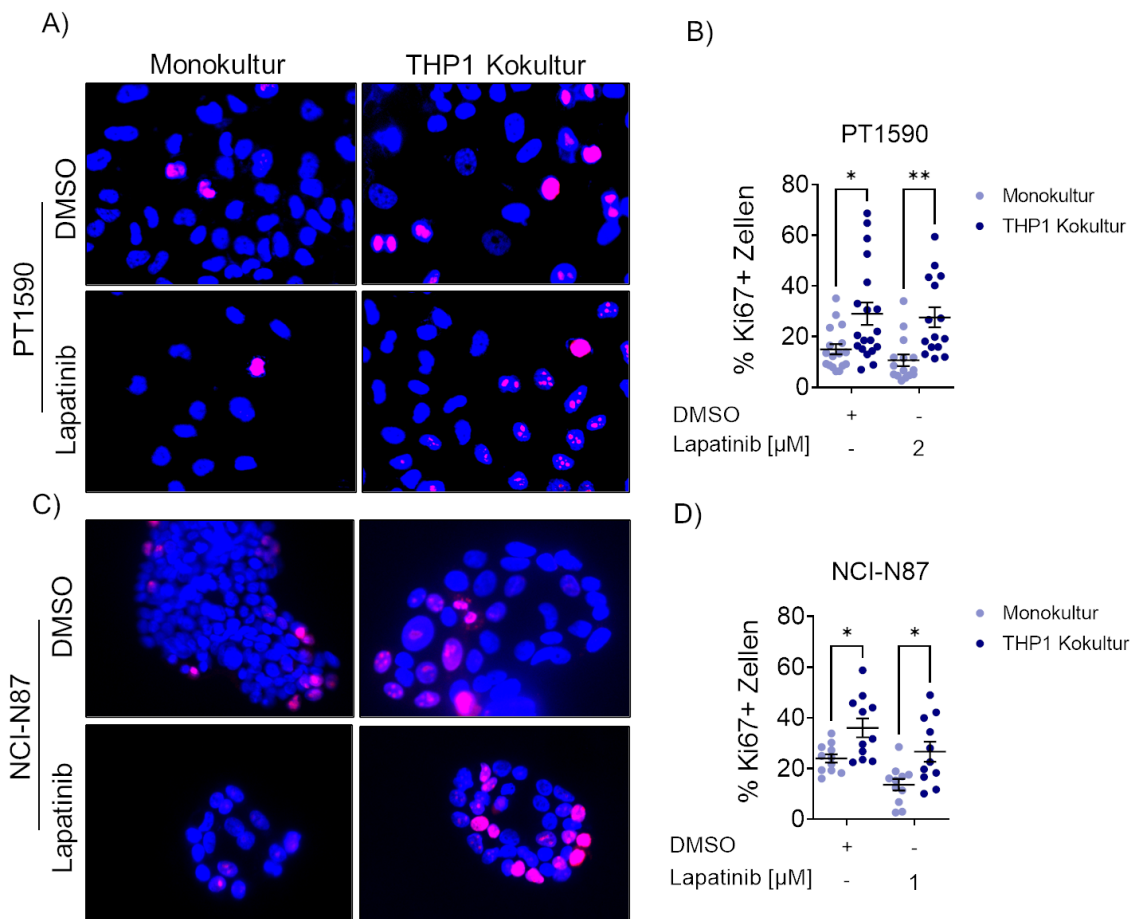


Abbildung 29: A,C) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und zusätzlich mit Lapatinib behandelt (2 μ M PT1590 und 1 μ M NCI-N87). Eine DMSO Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die pinken Zellen stellen die proliferativ aktiven Zellen dar. **B,D)** Quantifizierung der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * $< 0,05$, ** $< 0,002$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Unter Lapatinib-Therapie wiesen die monokultivierten NCI-N87-Zellen eine deutliche Reduktion der Proliferation auf. In der Gegenwart der THP-1-Makrophagen wurde diese Reduktion jedoch nicht beobachtet. Dabei zeigten die THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten NCI-N87-Zellen einen 1,95-mal höheren Anteil proliferativer Zellen als die monokultivierten und Lapatinib-behandelten NCI-N87-Zellen (Mono Lapatinib: $13,64 \pm 7,56 \%$ vs. co THP-1 Lapatinib: $26,65 \pm 13,08 \%$, $p = 0,02$) (**Abb. 29CD**). In der Zusammenschau demonstrieren die erhobenen Befunde eine deutliche Resistenzentwicklung der GEAC-Zellen gegenüber einer zielgerichteten HER2-TKI-Therapie, sobald diese unter dem Einfluss löslich sekretierter Faktoren der THP-1-Makrophagen stehen.

4.2.4 Makrophagen Kokultur induziert eine starke STAT3 und AKT Aktivierung in PT1590 und NCI-N87 Zellen

Da die Aktivierung onkogener intrazelluläre Signalwege das biologische Verhalten von Tumorzellen maßgeblich mit beeinflussen können, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die THP-1-Makrophagen die aktivierende Phosphorylierung der Signalproteine STAT3, AKT und ERK modulieren können.

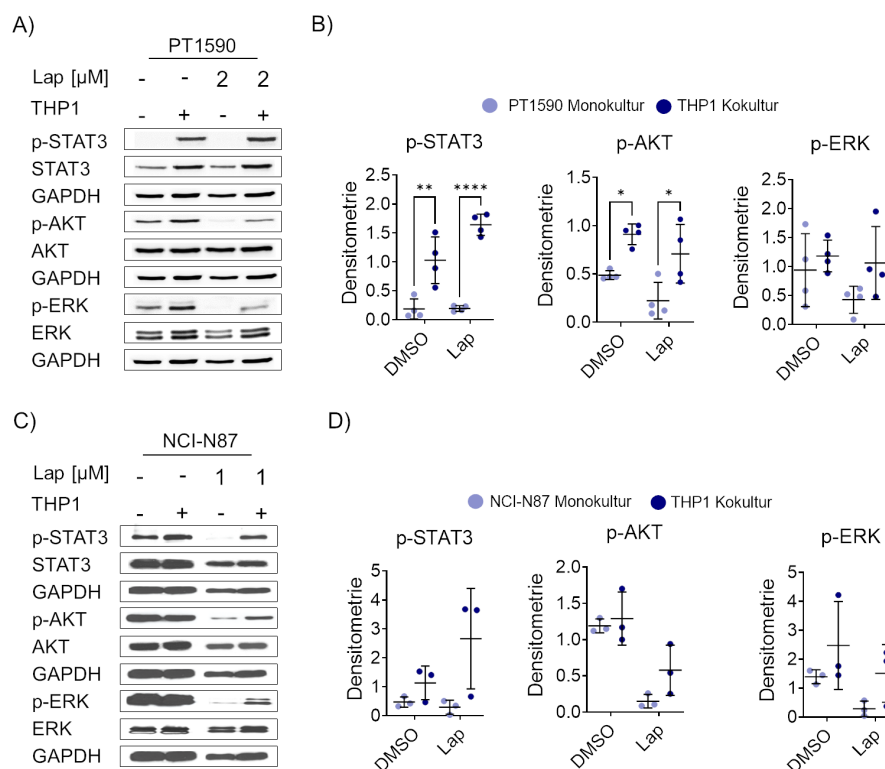


Abbildung 30: **A)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μg Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine p-STAT3, STAT3, p-AKT, AKT, p-ERK und ERK detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **B)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine STAT3, AKT und ERK in den mono- bzw. THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590- und NCI-N87-Zellen. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteine wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Diese normalisierten Intensitäten wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche analysiert. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Western-Blot-Analysen konnten in den THP-1-kokultivierten PT1590- und NCI-N87-Zellen eine starke STAT3-Phosphorylierung nachweisen. Während die monokultivierten PT1590-Zellen keine STAT3-Aktivierung aufwiesen, konnte durch densitometrische Analysen eine signifikante und 12,8-mal höhere STAT3-Aktivierung in den THP-1-kokultivierten PT1590 nachgewiesen werden (Mono DMSO: $0,059 \pm 0,044$ vs. co THP-1 DMSO: $0,76 \pm 0,33$, $p = 0,0183$). Diese STAT3-Aktivierung in den THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen konnte ebenfalls unter Lapatinib-Behandlung beobachtet werden. Hier zeigte sich sogar eine etwas höhere STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zu den THP-1-kokultivierten und DMSO-behandelten PT1590-Zellen (Mono Lapatinib: $0,156 \pm 0,068$ vs. co THP-1 Lapatinib: $1,28 \pm 0,443$, $p = 0,0005$) (**Abb. 30A,B**). Die NCI-N87-Zellen zeigten nach der THP-1-Kokultur ebenfalls eine höhere STAT3-Phosphorylierung als die NCI-N87-Monokultur. Dabei konnte eine noch stärkere STAT3-Phosphorylierung in den THP-1 kokultivierten und Lapatinib-behandelten NCI-N87-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Lapatinib-behandelten NCI-N87-Monokultur ermittelte die Densitometrie eine, wenn auch nicht signifikante, 8,9-fach höhere STAT3-Phosphorylierung in den THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten NCI-N87-Zellen (Mono Lapatinib: $0,298 \pm 0,242$ vs. co THP-1 Lapatinib: $2,66 \pm 1,73$, $p = 0,0814$) (**Abb. 30C,D**). Eine weitere intrazelluläre Signaltransduktion, die durch die THP-1-Makrophagen moduliert wurde, ist der AKT-Signalweg. Hier konnten insbesondere für die PT1590-Zellen signifikante Veränderungen nachgewiesen werden. So zeigten die THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zu den monokultivierten PT1590-Zellen eine 1,87-mal höhere AKT-Aktivierung (Mono DMSO: $0,487 \pm 0,047$ vs. co THP-1 DMSO: $0,911 \pm 0,107$, $p = 0,0349$). Ferner führte die Lapatinib-Behandlung zu einer deutlichen Abnahme der AKT-Phosphorylierung (Mono DMSO: $0,487 \pm 0,047$ vs. Mono Lapatinib: $0,223 \pm 0,189$, $p = 0,2457$), welche unter der THP-1-Kokultur in den PT1590-Zellen nicht beobachtet werden konnte (co THP-1 Lapatinib: $0,709 \pm 0,304$, $p = 0,0152$) (**Abb. 30A,B**). In den NCI-N87-Zellen führte die THP-1-Kokultur im Vergleich zur Monokultur nur zu einer tendenziellen Steigerung der AKT-Phosphorylierung. Jedoch zeigte sich eine deutliche Abnahme der AKT-Phosphorylierung unter Lapatinibtherapie, während diese in den PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen zwar reduziert, jedoch erhalten blieb (Mono DMSO: $1,189 \pm 0,096$ vs. Mono Lapatinib: $0,150 \pm 0,094$, $p = 0,0053$, co THP-1 Lapatinib: $0,578 \pm 0,345$, $p = 0,2603$) (**Abb. 30C,D**). Für die ERK-Aktivierung wurden sowohl in den PT1590- als auch in den NCI-N87-Zellen nicht signifikante, jedoch vergleichende Befunde erhoben. So zeigte sich in beiden Zelllinien eine tendenziell höhere ERK-Phosphorylierung in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen. Diese wurde durch die Lapatinib-Behandlung in den monokultivierten PT1590- und NCI-N87-Zellen deutlich reduziert und zeigte sich in den THP-1-kokultivierten PT1590- und NCI-N87-Zellen ebenfalls reduziert, jedoch deutlich stärker phosphoryliert als in den monokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590- und NCI-N87-Zellen (**Abb. 30A,D**). In der Zusammenschau demonstrieren die erhobenen Befunde einen deutlichen Einfluss der THP-1-Makrophagen auf die intra-

zelluläre Signaltransduktion. Dabei zeigten insbesondere die PT1590-Zellen eine starke THP-1-Makrophagen vermittelte STAT3-Aktivierung.

4.2.5 PT1590 zeigen Lapatinib Resistenz und STAT3 Aktivierung in Anwesenheit von primären Makrophagen

Die bisher erhobenen Befunde demonstrierten einen deutlichen Einfluss der THP-1-Makrophagen auf die Proliferation und das Ansprechen auf die zielgerichtete HER2-Therapie. Darüber induzieren die THP-1-Makrophagen eine starke STAT3-Aktivierung in den PT1590- und NCI-N87-Zellen. Die immortalisierte Monozyten-Zelllinie THP-1 stellt ein sehr gut charakterisiertes Makrophagen-Modell dar. So konnten vorangegangene Studien zeigen, dass die PMA-Behandlung mit einer anschließenden Ruhephase die THP-1-Monozyten in einen stabilen naiven Makrophagenphänotyp differenziert. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass der sekretorische Phänotyp im Vergleich zu primären Makrophagen durch die Immortalisierung der Zellen Unterschiede aufweist. Aus diesem Grund wurden Schlüsselselexperimente mit MDM-Makrophagen wiederholt und verifiziert.

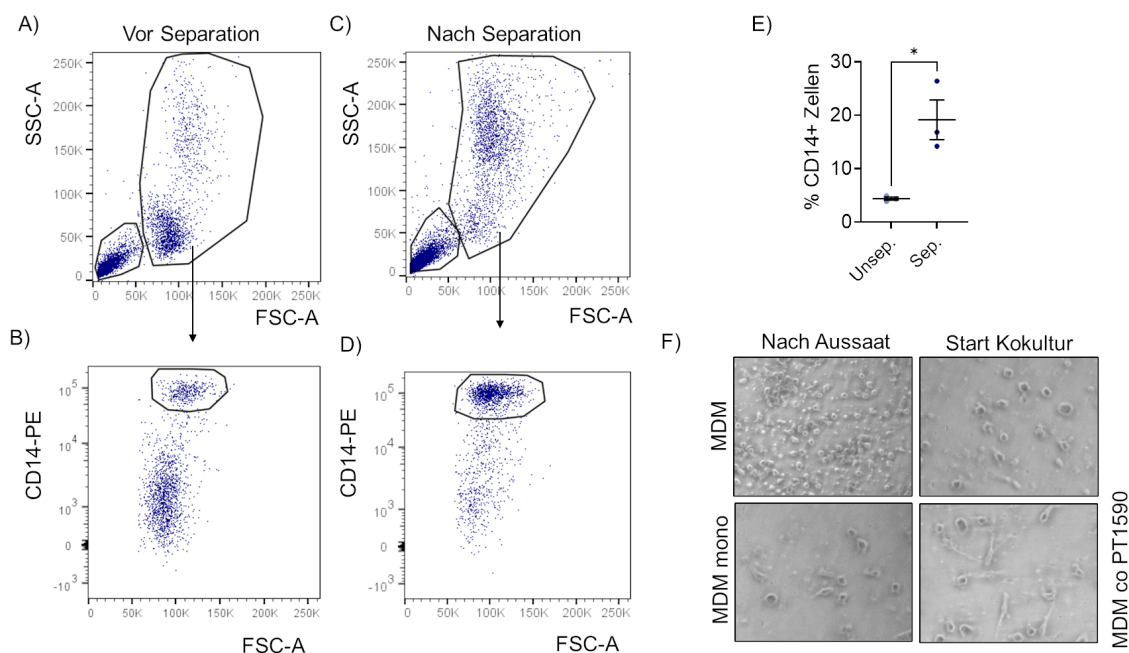


Abbildung 31: CD14-Durchflusszytometrie vor und nach negativer magnetischer Zellseparation. Das kleine Gate umfasst Erythrozyten, Lymphozyten, Debris und tote Zellen. Das große Gate umfasst Monozyten und Granulozyten **A,B**) Dot-Plot SSC-A und FSC-A sowie CD-14-PE vor magnetischer Zellseparation. **C,D**) Dot-Plot SSC-A und FSC-A sowie CD-14-PE nach magnetischer Zellseparation. **E**) Quantifizierung des prozentualen Anteils CD14-positiver Monozyten vor und nach Separation. Es wurden mindestens drei biologische Replikate (Probanden) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$. **F**) Repräsentative Phasenkontrastbilder der ausplattierten MDM nach Aussaat und vor Start der Kokultur sowie am Ende der Mono- bzw. PT1590-Kokultur.

Wie in **Kapitel 3.2.5** beschrieben wurden die Monozyten mittels negativer Selektion aus PBMC von Vollblutspendern isoliert. Die Reinheit der Monozyten wurde mittels CD14-Durchflusszytometrie beurteilt. Für die Analyse wurden zunächst die Zelldebris und die Zelldoublets entfernt und die lymphozytäre, monozytäre und granulozytäre Zellfraktion mit eingeschlossen (**Abb. 31A,B**). Dabei zeigte die Antikörperfärbung einen Anteil CD14-positiver Zellen von $4,38 \% \pm 0,53 \%$ vor magnetischer Zellseparation. Dieser Anteil konnte nach der magnetischen Zellseparation um das 4,45-Fache signifikant erhöht werden. ($19,13 \% \pm 6,44 \%$, $p = 0,0166$) (**Abb. 31C,D,E**). Diese MDM wurden anschließend für indirekte Kokultur mit den PT1590, LN1590 und NCI-N87 verwendet. Morphologische Analysen zeigten die MDM nach Aussaat als kleine rundliche Zellen mit kleinem Zellkern. Nach der Differenzierung mit FCS zeigten diese sich zunächst deutlich adhärent und teilweise mit spindelförmigen Ausläufern. Dabei führte die indirekte Kokultur mit den PT1590-Zellen zu einer deutlichen Zunahme der spindelförmigen Makrophagen im Vergleich zu den monokultivierten Makrophagen (**Abb. 31F**). Für die Verifizierung der Schlüsselexperimente wurden die GEAC-Zelllinien PT1590, LN1590 und NCI-N87 mit dem MDM indirekt für drei Tage kokultiviert. Hier zeigten MTT-Analysen zunächst nur einen Einfluss der MDM auf den Anteil vitaler PT1590-Zellen, während der Anteil vitaler NCI-N87- und LN1590-Zellen nach MDM-Kokultur keine wesentlichen Veränderungen aufwies. Auch das Ansprechen auf den TKI Lapatinib wurde durch die MDM in den LN1590 und NCI-N87 nicht moduliert (**Abb. 32B,C**). Die MDM-kokultivierten PT1590-Zellen zeigten dagegen einen höheren Anteil vitaler Zellen als die monokultivierten PT1590-Zellen (Mono DMSO: $100,92 \% \pm 10,13 \%$ vs. co MDM DMSO: $121,71 \% \pm 6,62 \%$, $p = 0,09$). Ferner führte die Lapatinib-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der vitalen Zellen (Mono DMSO: $100,92 \% \pm 10,13 \%$ vs. Mono Lapatinib: $55,92 \% \pm 12,07 \%$, $p < 0,001$), welche in Anwesenheit der MDM mit einem $29,97 \%$ höheren Anteil vitaler Zellen im Vergleich zu monokultivierten PT1590-Zellen nicht zu beobachten war (Mono Lapatinib: $55,92 \% \pm 12,07 \%$ vs. co MDM Lapatinib: $85,89 \% \pm 28,86 \%$, $p = 0,007$) (**Abb. 32A**). Ebenso wiesen die morphologischen Analysen eine höhere Zelldichte in den MDM-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zu den monokultivierten PT1590-Zellen nach, hier insbesondere im Vergleich zu den Lapatinib-behandelten und monokultivierten PT1590-Zellen (**Abb. 32D**). In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der MDM auf die Proliferation der PT1590-Zellen untersucht. Hier zeigte sich im Vergleich zu den monokultivierten PT1590-Zellen eine signifikante Erhöhung des Proliferationsindex um $66,56 \%$ in den MDM-kokultivierten Zellen (Mono DMSO: $19,91 \% \pm 7,41 \%$ vs. co MDM DMSO: $33,16 \% \pm 16,19 \%$, $p = 0,03$). Während eine deutliche Reduktion der Ki67-positiven Zellen in den Lapatinib- und monokultivierten PT1590-Zellen zu beobachten war, zeigten die MDM-kokultivierten PT1590-Zellen kein Ansprechen auf Lapatinib und eine weiterhin deutlich erhöhte Aktivität der Proliferation (Mono Lapatinib: $8,96 \% \pm 4,82 \%$ vs. co MDM Lapatinib: $23,99 \% \pm 13,27 \%$, $p = 0,01$) (**Abb. 32 E**). Zuletzt sollte der Einfluss der MDM-Makrophagen auf die intrazellulären Signalwege STAT3, AKT und

ERK untersucht werden. Auch hier zeigte sich, dass die MDM-Makrophagen, unabhängig von der Lapatinib-Behandlung, eine deutliche STAT3-Aktivierung in den PT1590-Zellen induzierten. Wenn auch weniger stark ausgeprägt, zeigte sich ebenfalls eine höhere AKT- und ERK-Phosphorylierung in den MDM-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zu den monokultivierten PT1590-Zellen. In den monokultivierten PT1590-Zellen führte die Lapatinib-Behandlung zu einer Verminderung der AKT- und ERK-Aktivierung, welche in den MDM-kokultivierten PT1590 weniger stark ausgeprägt war (**Abb. 32F**). Insgesamt ließen sich die zuvor erhobenen Befunde mit den MDM-Makrophagen verifizieren und bestätigen.

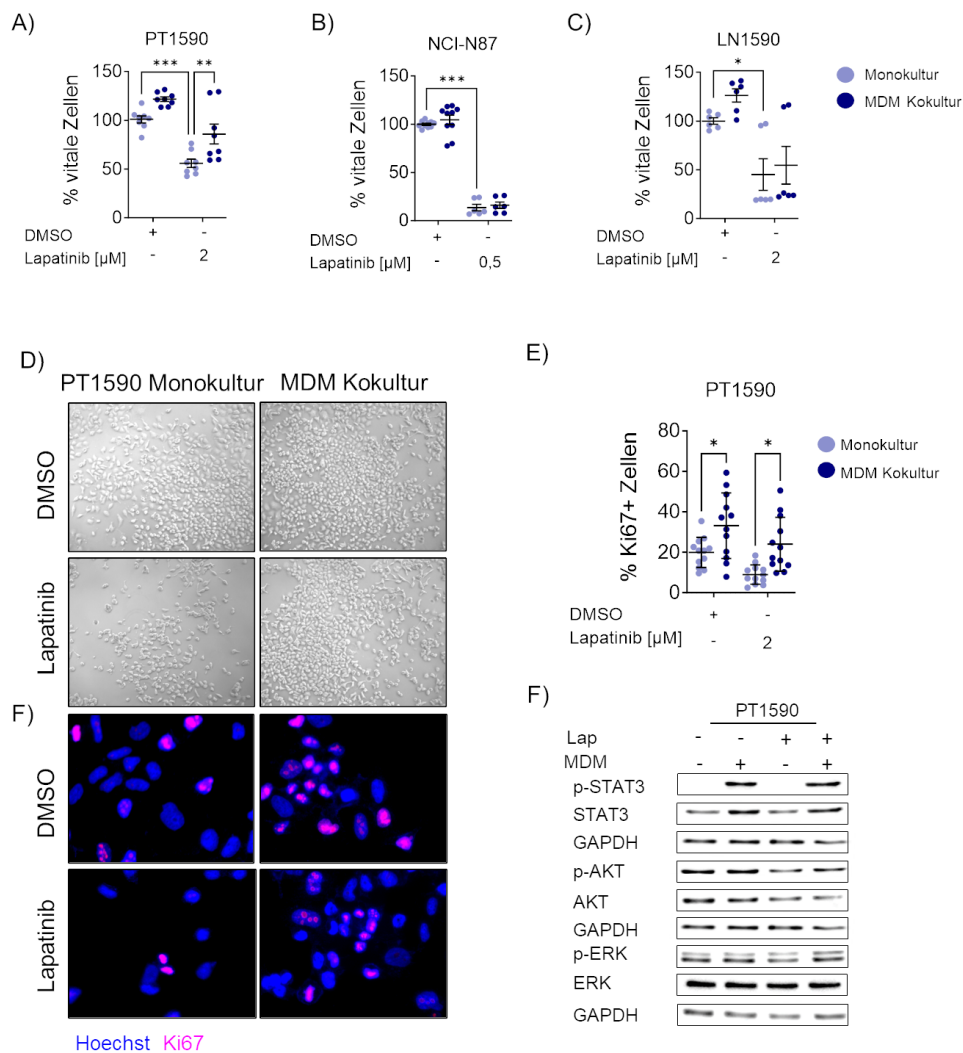


Abbildung 32: Quantifikation der Vitalität der PT1590 **A)**, NCI-N87 **B)** und LN1590 **C)** Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. MDM-Kokultur und gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Repräsentative Phasenkontrastbilder **D)** und Immunfluoreszenzbilder **F)** der GEAC-Zellen PT1590. Die pinken Zellen stellten die Ki67-positiven Zellen dar. **E)** Quantifikation der Ki67-positiven PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. MDM-Kokultur. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten PT1590-Zellen. **F)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der PT1590-Zellen. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μg Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine p-STAT3, STAT3, p-AKT, AKT, p-ERK und ERK detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001.

4.3 Einfluss der Makrophagen induzierten STAT3 Aktivierung auf HER2+ GEAC-Zellen

4.3.1 Inhibition der STAT3 Aktivierung erhöht das Ansprechen der HER2 Therapie in THP-1 kokultivierten PT1590 Zellen

Die vorangegangenen Kapitel demonstrierten, dass Makrophagen die Migration und Proliferation, aber auch das Ansprechen der GEAC-Zellen auf die HER2-spezifische Therapie mit Lapatinib deutlich beeinflussen. Gleichzeitig führte die Makrophagen-Kokultur zu einer deutlichen Aktivierung des STAT3-Signalweges. STAT3 spielt eine zentrale Rolle bei der Krebsprogression, indem es verschiedene Prozesse wie Zellproliferation, Metastasierung, Angiogenese, Immunregulation und Chemoresistenz reguliert. Aus diesem Grund fokussiert dieser Teil der vorliegenden Arbeit die Rolle von STAT3 in der makrophagenvermittelten Proliferation und der HER2-spezifischen Therapieresistenz. Um den funktionellen Einfluss von STAT3 genauer zu analysieren, wurden die PT1590-Zellen mit einer STAT3-spezifischen siRNA (siSTAT3) transfiziert und anschließend für drei Tage mit Mono- bzw. mit THP-1-Makrophagen ko-kultiviert, bei gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib. Eine Transfektion der Zellen mit einer scrRNA diente dabei als Kontrolle. Der Erfolg des siRNA-vermittelten STAT3-Knockdowns wurde sowohl durch Genexpressions- als auch durch Western-Blot-Analysen beurteilt. Hierbei führte die siSTAT3-Transfektion im Vergleich zur scrRNA-Kontrolle zu einer signifikanten Verminderung der relativen STAT3-mRNA-Expression in den Mono- und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen. Dabei betrug die Knockdown-Effizienz 87,12 % und 93,59 % in den Mono- bzw. THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen. (**Abb. 33A**).

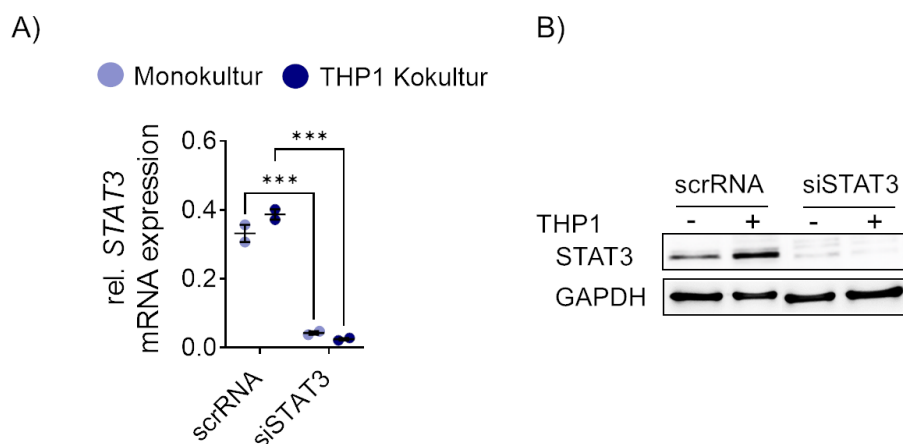


Abbildung 33: A) Relative Genexpressionsanalyse des Gens *STAT3* nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur und gleichzeitigem siRNA-vermittelten Knockdown von STAT3 (siSTAT3). Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Genexpressionswerte wurden mittels qPCR bestimmt und die *STAT3*-mRNA-Menge wurde auf GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche. **B)** Repräsentative Western-Blotbilder der STAT3-Proteinmenge der siSTAT3- bzw. scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur. Es wurden 15 µg Proteinlysate verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. * < 0,05, ** < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001.

Damit korrespondierend stellte sich eine deutlich geringere STAT3-Proteinmenge in den siSTAT3-transfizierten Mono- und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen dar (**Abb. 33B**). Zunächst zeigte sich, dass sowohl die STAT3-defizienten als auch die scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen eine geringere Zelldichte nach drei Tagen Kultur aufwiesen. Darüber hinaus stellten sich die siSTAT3- und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen morphologisch gestresst und weniger konfluent dar. Eine Titration der siRNA-Konzentration hatte keinen Einfluss auf diese Beobachtung. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass die kontroll-transfizierten PT1590-Zellen ähnliche Befunde wie in **Kapitel 4.2.5** aufwiesen. Ferner wiesen die STAT3-defizienten mono- bzw. THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Zelldichte auf (**Abb. 34A**). Zusätzlich zeigten MTT-Analysen, dass der STAT3-Knockdown keinen Einfluss auf den Anteil vitaler PT1590-Zellen hat. Darüber hinaus hatte die verminderte STAT3-Expression in den PT1590-Zellen keinen Einfluss auf das Ansprechen der Lapatinib-Behandlung (scrRNA Lapatinib: $42,49 \% \pm 19,87 \%$ vs. siSTAT3 Lapatinib $54,94 \% \pm 7,08 \%$, $p = 0,99$). Die scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen wiesen vergleichbare Befunde wie im **Kapitel 4.2.5** auf und werden aus diesem Grund nicht im Detail dargestellt. Hier zeigte sich zusammenfassend, dass die PT1590-Zellen in der Anwesenheit der THP-1-Makrophagen einen höheren Anteil vitaler Zellen und ein fehlendes Ansprechen auf Lapatinib aufwiesen. Der Einfluss der THP-1-Makrophagen stellte sich in den STAT3-defizienten PT1590-Zellen weniger stark ausgeprägt dar. Dabei führte die THP-1-Makrophagen-Kokultur im Vergleich zur Monokultur zu einem 1,41-fach höheren Anteil vitaler PT1590-Zellen. Dieser Unterschied stellte sich jedoch als nicht signifikant dar (Mono siSTAT3 DMSO: $98,29 \% \pm 23,13 \%$ vs. co THP-1 siSTAT3 DMSO: $138,64 \% \pm 66,55 \%$, $p = 0,38$). Interessanterweise konnte die THP-1-Makrophagen vermittelte Lapatinib-Resistenz durch die verminderte STAT3-Expression aufgehoben werden. Dabei wiesen die STAT3-defizienten und monokultivierten PT1590-Zellen eine ähnliche Menge vitaler Zellen auf wie die STAT3 defizienten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen (Mono siSTAT3 Lapatinib: $54,94 \% \pm 7,08 \%$ vs. co THP-1 siSTAT3 Lapatinib: $65,53 \% \pm 33,63 \%$, $p > 0,99$) (**Abb. 34B**). In einem weiteren Versuchsansatz wurde STAT3 durch das Nicht-Peptid-Molekül Napabucasin inhibiert. Dabei blockt Napabucasin die DNA-Bindungsdomäne von STAT3 und verhindert somit die Transkription STAT3-spezifischer Gene. Dabei zeigte sich, dass Napabucasin die Menge an vitalen PT1590-Zellen unabhängig von den Kulturbedingungen stark reduziert. So führte die Napabucasin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion der vitalen monokultivierten PT1590-Zellen um $81,55 \%$ (PT1590 DMSO: $93,40 \% \pm 16,28 \%$ vs. PT1590 Napabucasin: $17,26 \% \pm 12,48 \%$, $p < 0,001$). Dieser Einfluss wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit Lapatinib noch verstärkt und verminderte den Anteil vitaler PT1590-Zellen um weitere $6,12 \%$ (PT1590 + Napabucasin + Lapatinib: $11,52 \% \pm 9,07 \%$, $p < 0,001$). Während die DMSO-behandelten PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen einen deutlich höheren Anteil vitaler Zellen als die DMSO-behandelten monokultivierten PT1590-Zellen aufwiesen (Mono DMSO: $93,40 \%$

$\pm 16,28 \%$ vs. co THP-1 DMSO: $134,56 \pm 30,29 \%$, $p = 0,02$), war dieser Effekt bei den Napabucasin- und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen nicht zu beobachten. Dabei betrug der Anteil vitaler Napabucasin und THP-1-kokultivierter PT1590-Zellen $26,08 \pm 19,36 \%$ und war somit nicht signifikant höher als der Anteil der Napabucasin und monokultivierten PT1590-Zellen. Auch die THP-1-Makrophagen vermittelte Lapatinib-Resistenz in den PT1590-Zellen konnte bei gleichzeitiger Behandlung mit Napabucasin aufgehoben werden. Während 4,67-fach mehr vitale, Lapatinib-behandelte und THP-1-kokultivierte PT1590-Zellen detektiert wurden, als Lapatinib-behandelte und monokultivierte PT1590 Zellen (Mono Lapatinib: $35,42 \pm 22,44 \%$ vs. co THP-1 Lapatinib: $165,49 \pm 34,92 \%$, $p < 0,001$), führte die gleichzeitige Behandlung mit Napabucasin lediglich zu einer 1,18-fachen Steigerung der vitalen Lapatinib-behandelten THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zur monokultivierten und Lapatinib-behandelten Kontrolle (Mono Lapatinib + Napabucasin: $11,51 \pm 9,07 \%$ vs. co THP-1 Lapatinib + Napabucasin: $13,62 \pm 12,07 \%$, $p > 0,99$) (**Abb. 34C**).

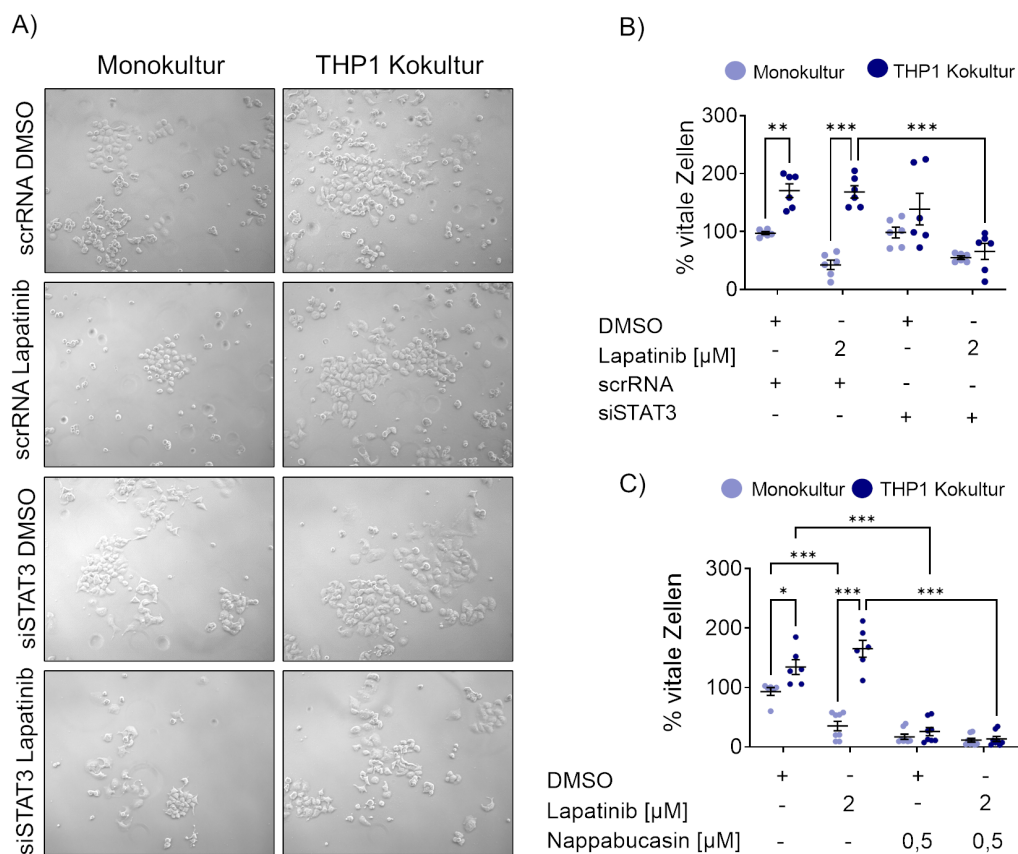


Abbildung 34: A) Repräsentative Phasenkontrastbilder der siSTAT3-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit $2 \mu\text{M}$ Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation des Anteils der vitalen scrRNA- bzw. siSTAT3-transfizierten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten, DMSO-behandelten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen. **C)** Quantifikation des Anteils der vitalen Napabucasin ($0,5 \mu\text{M}$) und Lapatinib ($2 \mu\text{M}$) behandelten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * $< 0,05$, ** $< 0,002$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$

Um die vorliegenden Befunde weiter zu verifizieren, wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen die Proliferationsaktivität untersucht. Zunächst wiesen die STAT3-defizienten PT1590-Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten PT1590-Zellen einen leicht und nicht signifikant geringeren Proliferationsindex auf (Mono scrRNA DMSO: 37,21 % $\pm$ 5,39 % vs. Mono siSTAT3 DMSO: 24,19 % $\pm$ 9,77 %, $p = 0,22$). Die scrRNA-transfizierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen zeigten einen 1,65-fach höheren Proliferationsindex auf, als die scrRNA-transfizierten und monokultivierten PT1590-Zellen (Mono scrRNA DMSO: 37,21 % $\pm$ 5,39 % vs. co THP-1 scrRNA DMSO: 61,60 % $\pm$ 7,03 %, $p < 0,001$). Während die Lapatinib-Behandlung die Menge an Ki67-positiven und monokulturierten PT1590-Zellen reduzierte, wies der Proliferationsindex der scrRNA-transfizierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen mit 54,38 % keine Reduktion auf (Mono scrRNA Lapatinib: 24,86 % $\pm$ 9,77 % vs. co THP-1 scrRNA Lapatinib: 54,38 % $\pm$ 12,73 %, $p < 0,001$) (**Abb. 35AB**).

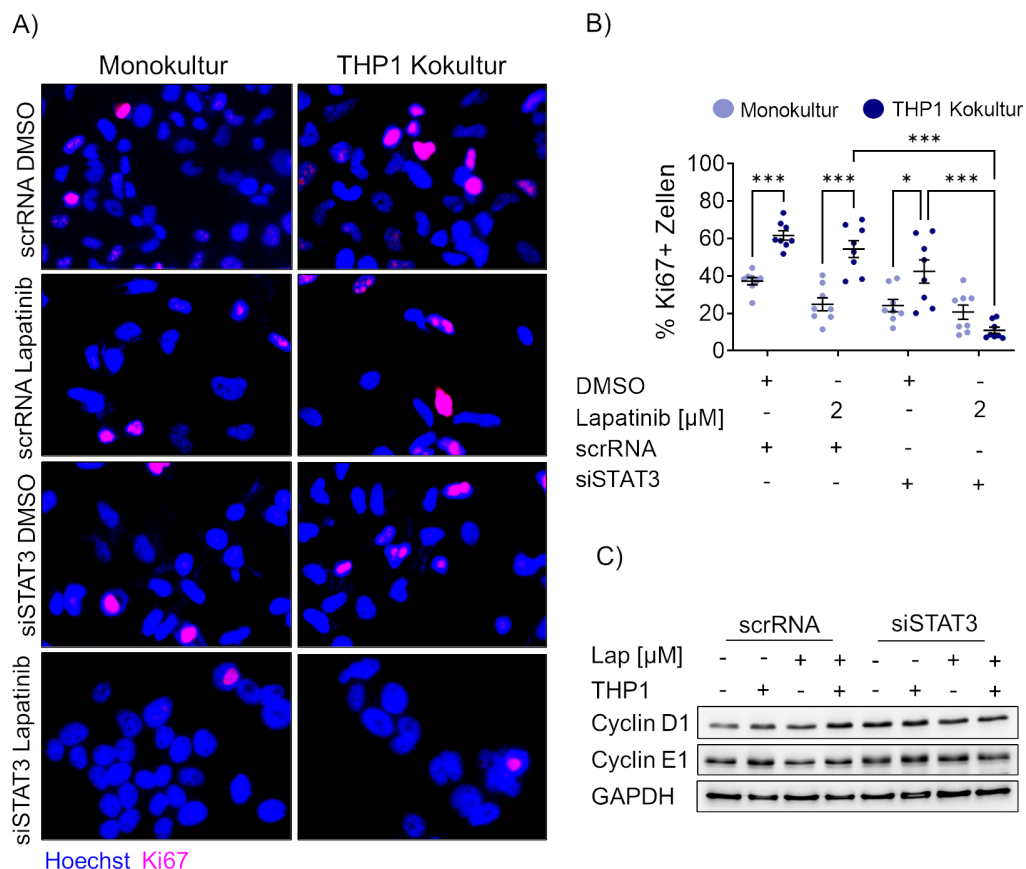


Abbildung 35: A) Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der siSTAT3-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 µM Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten DMSO-behandelten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. **C)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der mono- bzw. THP1-kokultierten siRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 µg Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine Cyclin D1 und Cyclin E1 detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * $p < 0,05$, ** $p < 0,002$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$.

Ferner zeigte sich, dass die verminderte STAT3 Expression die Makrophagen vermittelte Proliferation nicht beeinflusst. So wiesen auch die STAT3 defizienten und THP-1-kokultivierten PT1590 eine signifikant höhere Anzahl an Ki67 positiven Zellen auf, als die STAT3 defizienten und monokultivierten PT1590 Zellen (Mono siSTAT3 DMSO: $24,19 \% \pm 9,35 \%$ vs. co THP-1 siSTAT3 DMSO: $42,36 \% \pm 17,62 \%$, $p = 0,02$). Darüber hinaus hatte die STAT3 Defizienz keinen Einfluss auf die Wirkung von Lapatinib in den monokultivierten PT1590 Zellen. Allerdings führte der STAT3 Knockdown zu einem erneuten Ansprechen auf den Inhibitor Lapatinib in den THP-1-kokultivierten PT1590 Zellen. Hier wiesen die STAT3 defizienten, monokultivierten und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen einen Proliferationsindex von $20,68 \%$ auf. Die STAT3 defizienten, THP-1-kokultivierten und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen zeigten einen Proliferationsindex von $10,84 \%$ (Mono siSTAT3 Lapatinib: $20,68 \% \pm 10,78 \%$ vs. co THP-1 siSTAT3 Lapatinib: $10,84 \% \pm 4,72 \%$, $p = 0,57$) (**Abb. 35A,B**). Wie bereits in **4.2.1** demonstriert, führte die THP1-Kokultur zu einer erhöhten Konzentration der regulatorischen Zellzyklus Proteine Cyclin D1 und Cyclin E1. Aus diesem Grund wurde abschließend mittels Western Blot Analysen die Menge an Cyclin D1 und Cyclin E1 in den STAT3 defizienten, mono- bzw. THP-1-kokultivierten und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen untersucht. Dabei stellte sich zunächst dar, dass die Menge an Cyclin D1 und Cyclin E1 moderat höher in THP-1-kokultivierten und scrRNA transfizierten PT1590 Zellen, als in den monokultivierten und scrRNA transfizierten PT1590 Zellen war. In Anwesenheit der THP-1-Makrophagen waren diese erhöhten Mengen auch in den scrRNA transfizierten und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen zu detektieren, während die Lapatinib Behandlung die Proteinmenge an Cyclin D1 und Cyclin E1 in den monokultivierten und scrRNA transfizierten PT1590 Zellen reduzierte. Der STAT3 Knockdown führte in den PT1590 Zellen zu einer höheren Basalmenge an Cyclin D1 und Cyclin E1. Ferner hatte die Anwesenheit der THP-1-Makrophagen in den STAT3 defizienten und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen keinen Einfluss auf die Proteinmenge von Cyclin D1 und Cyclin E1 (**Abb. 35C**). Insgesamt kann festgehalten werden, dass STAT3 keinen Einfluss auf die Makrophagen vermittelte Proliferation in den PT1590 Zellen hat. Jedoch konnte demonstriert werden, dass STAT3 Einfluss auf die Makrophagen vermittelte Lapatinib Resistenz hat.

4.4 Charakterisierung Makrophagen-sekretierter Faktoren und ihr Einfluss auf GEAC-Zellen

4.4.1 Sekretom-Analyse identifiziert differenziell regulierte Zytokine und Wachstumsfaktoren in THP-1 Makrophagen

Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen wurde die Interaktion der Makrophagen mit den GEAC-Zellen über lösliche Faktoren untersucht. Dabei können diese entweder von den Makrophagen selbst freigesetzt oder durch die Anwesenheit der GEAC-Zellen induziert, gebildet und in den Überstand sezerniert werden. Zusätzlich kann der Einfluss der Makrophagen die Bildung von Sekretionsfaktoren in den GEAC-Zellen fördern, welche ebenfalls in das Medium abgegeben werden können.

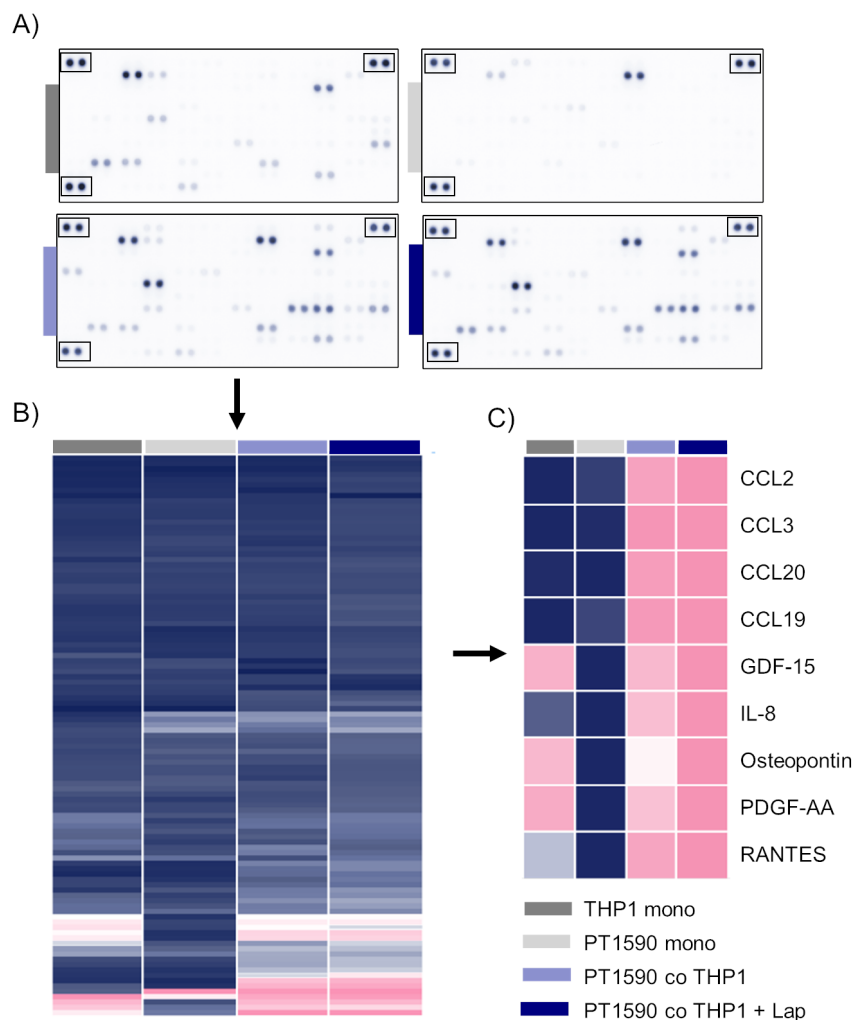


Abbildung 36: **A)** Repräsentative Bilder der Sekretom-Analyse mittels membranbasierter Antikörper-Arrays der Kokultur-Überstände der Lapatinib- bzw. DMSO-behandelten PT1590-Zellen und THP1-Zellen. Eine Monokultur der THP1-Makrophagen und PT1590-Zellen diente als Kontrolle. **B)** Die Spotintensitäten der 105 verschiedenen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wurden densitometrisch ausgewertet und als log2-adjustierte Daten in einer Heatmap dargestellt. Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte nach euklidischer Distanzmessung. **C)** Absolute Signalintensitäten der differenziell sezernierten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (CCL2, CCL3, CCL20, CCL19, GDF-15, IL-8, Osteopontin, PDGF-AA und RANTES).

Dabei können diese Faktoren erheblichen Einfluss auf die Proliferation, Metastasierung und Therapieresistenz von Tumoren haben. Um den makrophagen-sezernierten Faktor, welcher den Einfluss auf die Proliferation und HER2-TKI-Therapieresistenz vermittelt, zu identifizieren, wurde eine Sekretom-Analyse der Zellkulturüberstände durchgeführt. Das Sekretom beschreibt die Gesamtheit aller Proteine, die von Zellen, Geweben oder einem Organismus in die extrazelluläre Umgebung ausgeschüttet werden. Mit Hilfe eines Antikörper-basierten Systems konnten 105 unterschiedliche Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren analysiert werden (**Abb. 36A**). Dabei wurden die Überstände der monokultivierten THP-1- und PT1590-Zellen sowie die Überstände der kokultivierten THP-1- und PT1590-Zellen untersucht. Zusätzlich erfolgte die Messung des Zellkulturüberstandes der kokultivierten und Lapatinib-behandelten THP-1- und PT1590-Zellen. Die Identifizierung der differenziell sezernierten Faktoren erfolgte über ein hierarchisches Clustering mittels euklidischer Distanzmessung mit Bezug auf die Zellkulturüberstände der monokultivierten PT1590 (**Abb. 36B**). Als differenziell wurden jene Faktoren betrachtet, die in einer 2,5-fach höheren Konzentration im Zellkulturüberstand detektiert wurden als im Zellkulturüberstand der PT150-Monokultur. Mit dieser Methode wurden insgesamt 15 differenziell sezernierte Faktoren detektiert (Chitinase 3-like-1, CD14, Complement D, GDF-15, IL-8, CCL2, CCL3, CCL20, CCL19, MMP-9, Osteopontin, PDGF-AA, RANTES, uPAR und TIM-3). Während die Konzentration der Faktoren Chitinase 3-like-1, Complement D, GDF-15, MMP-9, Osteopontin, PDGF-AA und TIM-3 in den Überständen der monokultivierten THP-1 und kokultivierten THP-1 und PT1590 keine Unterschiede aufwies, waren die gemessenen Konzentrationen der Faktoren CCL1, CCL2, CCL3, CCL20, CCL19, CD14, IL8, RANTES und uPAR in den Zellkulturüberständen der kokultivierten THP-1 und PT1590-Zellen höher als in den Überständen der monokultivierten THP-1 und PT1590-Zellen. Insbesondere die Chemokine CCL1, CCL2, CCL3/4, IL8, CCL19 und CCL20 zeigten in der Kokultur die höchste Konzentration, welche in Anwesenheit von Lapatinib keine Veränderung zeigte. Das Chemokin CCL20 zeigte sich mit einer 11,58-fach höheren Konzentration im Kokulturüberstand am stärksten reguliert (Faktor THP-1 Mono: 1,15; Faktor THP-1 co PT1590: 11,58; Faktor THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 12,12). Darüber hinaus wiesen die Chemokine CCL1 (Faktor THP-1 Mono: 0,78; Faktor THP-1 co PT1590: 4,28; Faktor THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 3,66), CCL2 (Faktor THP-1 Mono: 0,85; Faktor THP-1 co PT1590: 2,92; Faktor THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 3,09), CCL3/4 (Faktor THP-1 Mono: 0,87; Faktor THP-1 co PT1590: 10,51; Faktor THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 10,61), IL-8 (Faktor THP-1 Mono: 2,39; Faktor THP-1 co PT1590: 8,33; Faktor THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 10,17) und RANTES (Faktor THP-1 Mono: 3,75; Faktor THP-1 co PT1590: 6,86; Faktor THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 7,39) ebenfalls eine deutlich höhere Konzentration im Kokulturüberstand auf als in den THP-1 und PT1590 Monokulturüberständen (**Abb. 36C**).

4.4.2 PDGF-AA induziert Proliferation und vermittelt Lapatinib Resistenz in PT1590 Zellen

Um den Effekt der makrophagen-sezernierten Faktoren auf die Proliferation und das Ansprechen auf den HER2 TKI Lapatinib genauer zu untersuchen, wurden die PT1590-Zellen mit einer Auswahl an differenziell sezernierten Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren in zwei unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und anschließend mit Lapatinib behandelt. Nach insgesamt 73 Stunden wurde mit Hilfe einer MTT-Analyse der Anteil an vitalen Zellen bestimmt.

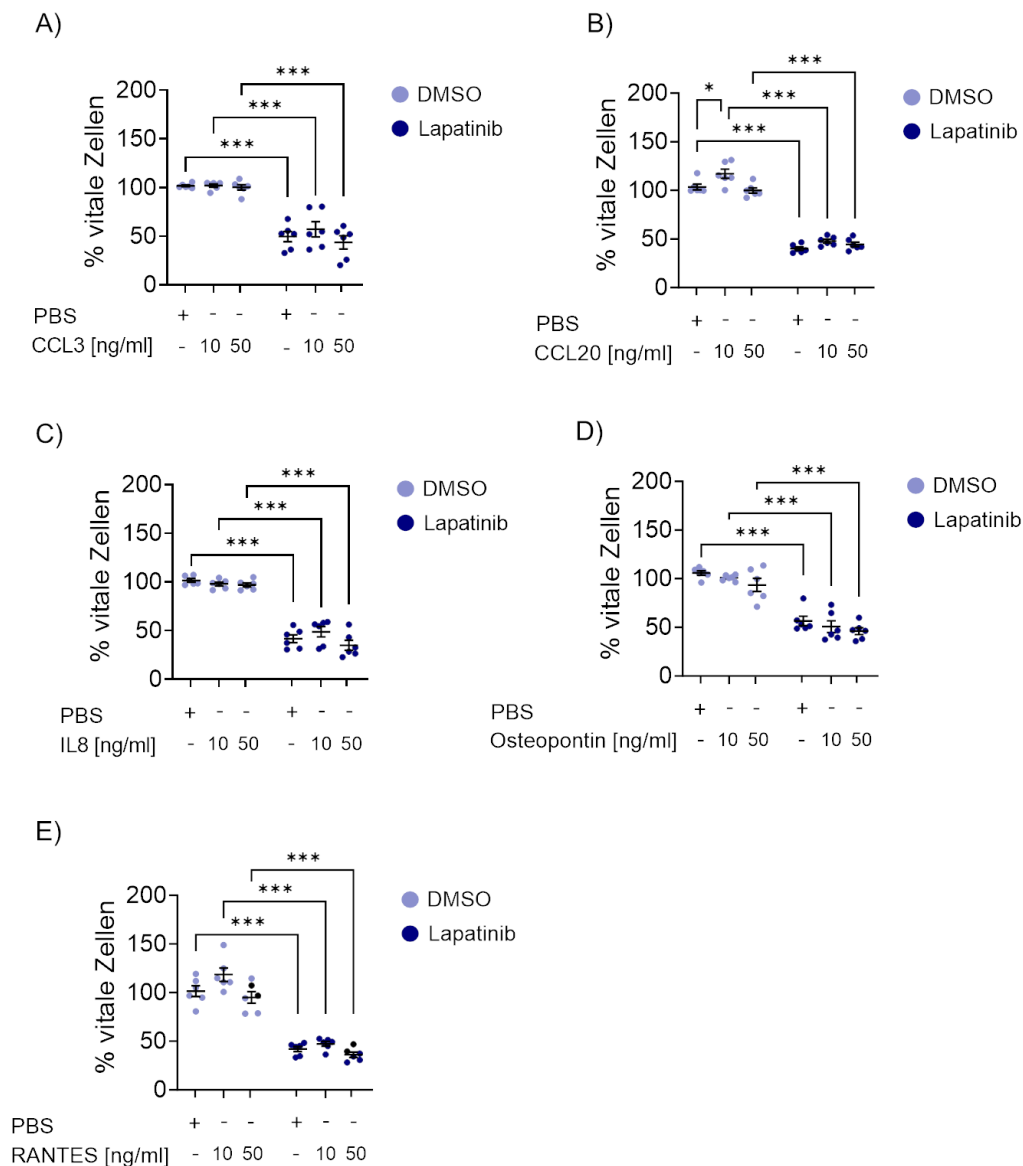


Abbildung 37: Quantifikation des Anteils der vitalen PT1590-Zellen nach Stimulation mit **A)** CCL3, **B)** CCL20, **C)** IL-8, **D)** Osteopontin, **E)** RANTES. Die PT1590-Zellen wurden für 72 Std mit 10 ng/ml oder 50 ng/ml Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Parallel wurden die Zellen für 48 Std mit 2 μ M Lapatinib behandelt. PBS und DMSO dienten dabei als Kontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der PBS-stimulierten und DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$

Für die Chemokine CCL3, CCL20, IL-8, RANTES und Osteopontin konnte kein signifikanter Effekt auf den Anteil vitaler PT1590-Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte die Stimulation mit diesen Faktoren keinen wesentlichen Einfluss auf das Ansprechen des HER2-TKI Lapatinib. Es konnte zunächst demonstriert werden, dass die Behandlung mit 2 μ M Lapatinib eine Reduktion der vitalen auf ca. 50 % verursachte. Die Stimulation der PT1590-Zellen mit 10 ng/ml und 50 ng/ml des Chemokins CCL3 veränderte den Anteil vitaler PT1590-Zellen nicht (PBS: 101,75 % $\pm$ 2,20 % vs. 10 ng/ml CCL3 101,88 % $\pm$ 4,05 % vs. 50 ng/ml CCL3 100,19 % $\pm$ 6,86 %). Ebenfalls wurde das Ansprechen der PT1590-Zellen auf Lapatinib durch die Stimulation mit CCL3 nicht wesentlich beeinflusst. Jedoch konnten im Vergleich zur PBS Kontrolle 17,05 % mehr vitale Zellen nach 10 ng/ml CCL3-Stimulation und Lapatinib-Behandlung detektiert werden. Dieser Effekt konnte durch eine Steigerung der CCL3-Konzentration nicht erhöht werden (PBS + Lapatinib: 49,51 % $\pm$ 12,98 % vs. 10 ng/ml CCL3 + Lapatinib: 57,05 % $\pm$ 19,19 % vs. 50 ng/ml CCL3 + Lapatinib: 43,62 % $\pm$ 16,49 %) (**Abb. 37A**). Die Stimulation der PT1590-Zellen mit 10 ng/ml CCL20 zeigte dagegen eine signifikante Steigerung des Anteils an vitalen Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Auch hier stellte sich keine CCL20-Dosis-abhängige Steigerung der vitalen Zellen dar (PBS: 103,55 % $\pm$ 7,12 % vs. 10 ng/ml CCL20: 117,07 % $\pm$ 4,05 % ($p = 0,03$) vs. 50 ng/ml CCL20: 99,92 % $\pm$ 6,66 %). Darüber hinaus modulierte die zusätzliche Stimulation mit CCL20 das Ansprechen der PT1590-Zellen auf Lapatinib nicht (PBS + Lapatinib: 40,11 % $\pm$ 4,23 % vs. 10 ng/ml CCL20 + Lapatinib: 47,81 % $\pm$ 4,58 % vs. 50 ng/ml CCL20 + Lapatinib: 44,40 % $\pm$ 5,82 %) (**Abb. 37B**). Durch die Stimulation der PT1590-Zellen mit 10 ng/ml und 50 ng/ml IL-8 konnte weder eine Erhöhung der vitalen Zellen noch eine Herabsetzung des Ansprechens auf Lapatinib in den PT1590-Zellen nachgewiesen werden (PBS: 101,55 % $\pm$ 4,40 % vs. 10 ng/ml IL-8: 97,86 % $\pm$ 4,67 % vs. 50 ng/ml IL-8: 96,94 % $\pm$ 12,56 %), (PBS + Lapatinib: 41,69 % $\pm$ 10,13 % vs. 10 ng/ml IL-8 + Lapatinib: 48,83 % $\pm$ 12,72 % vs. 50 ng/ml IL-8 + Lapatinib: 34,90 % $\pm$ 12,56 %) (**Abb. 37C**). Auch die Anwesenheit von Osteopontin führte zu keiner dosisabhängigen Modulation der PT1590-Zellmenge (PBS: 100,84 % $\pm$ 3,01 % vs. 10 ng/ml Osteopontin: 105,86 % $\pm$ 5,48 % vs. 50 ng/ml Osteopontin: 93,58 % $\pm$ 16,66 %). Darüber hinaus zeigte sich weiterhin eine deutliche Reduktion der vitalen Zellen unter Lapatinib-Therapie und der zusätzlichen Stimulation von Osteopontin (PBS + Lapatinib: 50,70 % $\pm$ 14,75 % vs. 10 ng/ml Osteopontin + Lapatinib: 56,55 % $\pm$ 11,80 % vs. 50 ng/ml Osteopontin + Lapatinib: 46,10 % $\pm$ 8,63 %) (**Abb. 37D**). Letztendlich zeigte die Stimulation der PT1590-Zellen mit 10 ng/ml RANTES eine leichte Erhöhung des Anteils an viablen PT1590-Zellen auf 118,5 % mit fehlendem Effekt auf den Anteil viabler Zellen bei Steigerung der RANTES-Dosis auf 50 ng/ml (PBS: 101,46 % $\pm$ 13,61 % vs. 10 ng/ml RANTES: 118,52 % $\pm$ 16,84 % vs. 50 ng/ml RANTES: 95,06 % $\pm$ 14,69 %). Einen Einfluss auf das Ansprechen auf Lapatinib durch die Stimulation mit RANTES wurde ebenfalls nicht nachgewiesen (PBS + Lapatinib: 42,05 % $\pm$ 6,316 % vs. 10 ng/ml RANTES + Lapatinib: 47,29 % $\pm$ 5,92 % vs. 50 ng/ml

RANTES + Lapatinib: $36,21 \% \pm 6,70 \%$) (**Abb. 37E**).

Während für die differenziell sezernierten löslichen Faktoren CCL3, CCL20, IL-8, RANTES und Osteopontin kein relevanter Befund erhoben werden konnte, zeigte die PDGF-AA-Stimulation eine signifikante und dosisabhängige Erhöhung des Anteils an vitalen PT1590-Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Hierbei demonstrierten morphologische Analysen eine deutliche Zunahme der Zelldichte sowie Adhärenz mit epithelialen Charakteristika in der Anwesenheit von 10 ng/ml PDGF-AA (PBS: $98,50 \% \pm 5,70 \%$ vs. 10 ng/ml PDGF-AA: $125,44 \% \pm 10,06 \%$ ($p = 0,007$) vs. 50 ng/ml PDGF-AA: $140,42 \% \pm 17,99 \%$ ($p < 0,001$)).

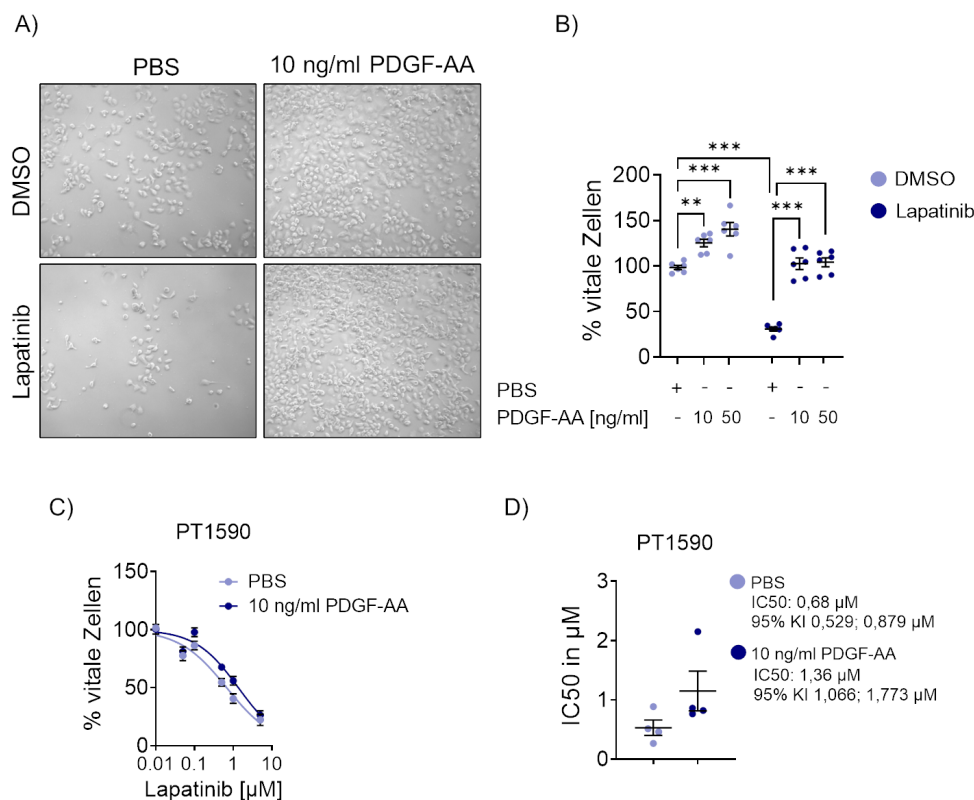


Abbildung 38: **A)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der PT1590-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-AA und 2 μ M Lapatinib-Behandlung. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation des Anteils der vitalen PT1590-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml oder 50 ng/ml PDGF-AA. Die PT1590-Zellen wurden für 72 Std stimuliert und parallel für 48 Std mit 2 μ M Lapatinib behandelt. PBS und DMSO dienten dabei als Kontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der PBS-stimulierten und DMSO-behandelten PT1590-Zellen. **C,D)** Dosis-Wirkungs-Kurve der PT1590-Zellen, die mit einer Verdünnungsreihe (0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5) μ M Lapatinib behandelt und gleichzeitig mit 10 ng/ml PDGF-AA stimuliert. Für die Bestimmung der IC50 (50 %-inhibitorische Konzentration) wurde eine logistische Dosis-Wirkungs-Analyse mit variabler Steigung verwendet. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$

Darüber hinaus zeigte sich unter dem Einfluss von PDGF-AA ein völliger Verlust des Ansprechens auf Lapatinib in den PT1590-Zellen. Während die Behandlung mit Lapatinib den Anteil an vitalen PT1590-Zellen auf 30,94 % reduzierte, führte die Stimulation mit 10 ng/ml und 50 ng/ml PDGF-AA zu einem Anteil an vitalen PT1590-Zellen von 102,59 % bzw. 104,19 % (PBS + Lapatinib: 30,94 % $\pm$ 5,19 % vs. 10 ng/ml PDGF-AA + Lapatinib: 102,59 % $\pm$ 15,61 % ($p < 0,001$) vs. 50 ng/ml PDGF-AA + Lapatinib: 104,19 % $\pm$ 12,19 % ($p < 0,001$)) (**Abb. 38A,B**). Um die erhobenen Befunde noch weiter zu verifizieren, wurde eine Dosis-Wirkungs-Analyse mit Erhebung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) durchgeführt. Hierfür wurden die PT1590-Zellen mit steigenden Lapatinib-Dosen behandelt und zusätzlich mit 10 ng/ml PDGF-AA oder PBS als Kontrolle stimuliert. Zunächst konnte beobachtet werden, dass die Wirksamkeit von Lapatinib unter zusätzlichem Einfluss von 10 ng/ml PDGF-AA deutlich herabgesetzt war. Durch Berechnung der IC₅₀ konnte diese Beobachtung quantifiziert werden. So zeigte sich die Hälfte der maximalen Hemmung der Zellen unter Lapatinib und PBS bei 0,67 μ M Lapatinib. Bei zusätzlicher Gabe von 10 ng/ml PDGF-AA erhöhte sich die IC₅₀ um das Zweifache (PBS + Lapatinib: 0,678 μ M; 95 % KI: (0,529; 0,879) μ M vs. 10 ng/ml PDGF-AA + Lapatinib: 1,36 μ M; 95 % KI: (1,066; 1,773) μ M, $p = 0,0668$) (**Abb. 38C,D**). Die im Rahmen der Sekretom-Analyse erhobenen Befunde über die differenziell sezernierten löslichen Faktoren in den Zellkulturüberständen stellen lediglich relative Daten dar. Darüber hinaus kann keine Aussage über die tatsächliche Quelle des nachgewiesenen PDGF-AA in der Kokultur gemacht werden. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Verifizierung eine ELISA-Analyse der Zellkulturüberstände und eine Genexpressionsanalyse der THP-1- und PT1590-Zellen durchgeführt.

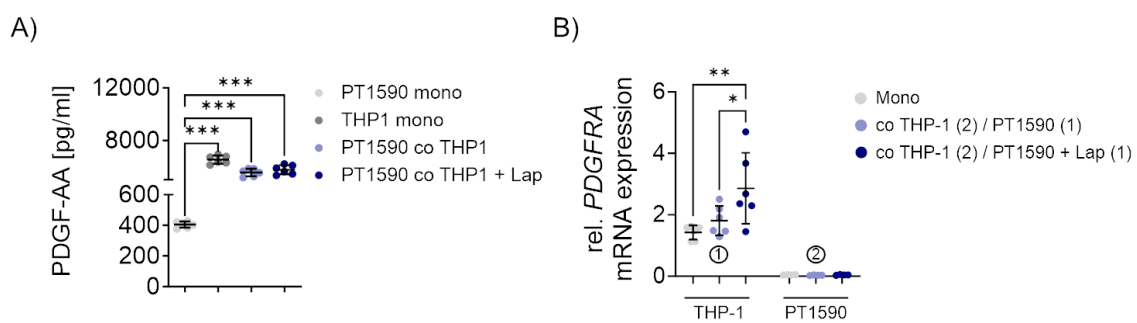


Abbildung 39: A) Quantifikation der PDGF-AA-Konzentration der PT1590- und THP1-Monokultur- bzw. Kokultur-Überstände. Die Konzentration wurde mittels ELISA-Verfahren bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche von mindestens drei biologischen Replikaten. **B)** Relative Genexpressionsanalyse des Gens *PDGFA* nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur und gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib (2 μ M). Die Genexpressionswerte wurden mittels qPCR bestimmt und die *PDGFA*-mRNA-Menge wurde auf GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Zellkulturüberstände der Kulturen mit Anwesenheit der THP-1 hohe Konzentrationen von PDGF-AA aufwiesen. Dabei zeigte das Medium der THP-1-Monokultur eine 16-fach höhere Konzentration an PDGF-AA als das Medium der PT1590-Monokultur (PT1590 Mono: 404,7 pg/ml $\pm$ 20,71 pg/ml vs. THP-1 Mono: 6536,0 pg/ml $\pm$ 313,7 pg/ml, $p < 0,001$). Unterschiede der PDGF-AA-Konzentration zwischen der THP-1-Monokultur und der THP-1 co PT1590-Kokultur wurden nicht detektiert. Darüber hinaus hatte die Lapatinib-Behandlung keinen Einfluss auf die PDGF-AA-Konzentration (THP-1 co PT1590: 5551,0 pg/ml $\pm$ 285,3 pg/ml, THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 5766,0 pg/ml $\pm$ 352,5) (**Abb. 39A**). Um sicherzugehen, dass das im Zellkulturüberstand detektierte PDGF-AA durch die Makrophagen gebildet wurde, erfolgte die Genexpressionsanalyse der THP-1- und PT1590-Zellen, jeweils mono- bzw. kokultiviert. Hier stellte sich zunächst eine deutlich höhere *PDGFA*-Expression in den THP-1 im Vergleich zu den PT1590-Zellen dar (THP-1: 1,42 $\pm$ 0,23 vs. PT1590: 0,045 $\pm$ 0,007; $p = 0,0130$). Während die Anwesenheit der THP-1-Zellen keinen Einfluss auf die *PDGFA* Expression in den PT1590-Zellen hat, zeigte sich eine erhöhte *PDGFA*-Expression in den THP-1-Zellen in der Anwesenheit der PT1590-Zellen (THP-1 Mono: 1,42 $\pm$ 0,23 vs. THP-1 co PT1590: 1,81 $\pm$ 0,48; $p = 0,5585$). Diese zeigte sich zudem durch die Behandlung mit Lapatinib signifikant höher (THP-1 co PT1590: 1,81 $\pm$ 0,48 vs. THP-1 co PT1590 + Lapatinib: 2,86 $\pm$ 1,15; $p = 0,0178$) (**Abb. 39B**). Zusätzlich zeigte die GSEA-Analyse, dass die GEAC-Patienten der M Φ + Gruppe im Vergleich zur M Φ - Gruppe überrepräsentative funktionelle Gengruppen aufwiesen, die mit PDGF-Signalwegen und der PDGFR α -Signaltransduktion assoziiert sind (**Abb. 40A,B**). Insgesamt weisen die Befunde darauf hin, dass Makrophagen die Quelle des PDGF-AA sind und die Anwesenheit der PT1590-Zellen und die Lapatinib-Behandlung die PDGFA-Expression erhöhen.

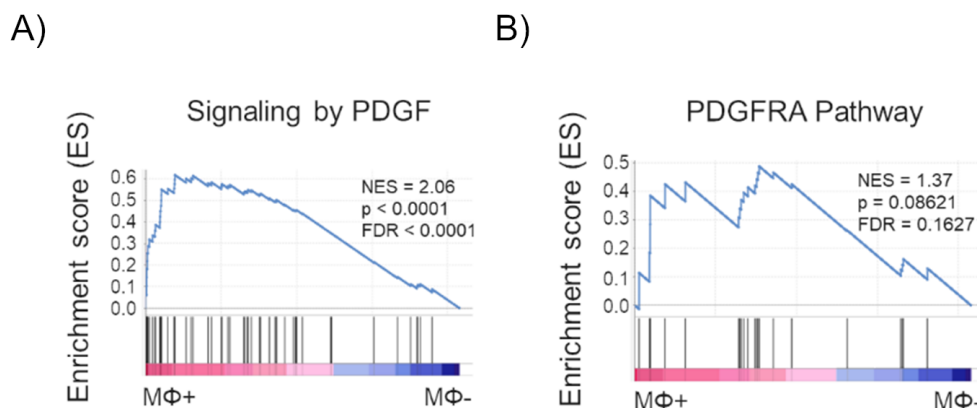


Abbildung 40: Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) der Gensets 'Signaling by PDGF' und **B)** 'PDGFRA-Pathway' in Abhängigkeit vom Phänotyp (M Φ + vs. M Φ -). Der normalisierte Enrichment Score (NES) quantifiziert die Stärke der Anreicherung unter Berücksichtigung der Gen-Set-Größe. Der nominale p-Wert gibt die statistische Signifikanz der beobachteten Anreicherung an, während die False Discovery Rate (FDR) die multiple Testung kontrolliert.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob die Stimulation mit PDGF-AA Einfluss auf die Proliferation der PT1590-Zellen hat. So führte die Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-AA zu einer 1,69-fachen Steigerung des Proliferationsindex in den PT1590-Zellen. Dabei zeigten die PBS-behandelten PT1590-Zellen 14,87 % Ki67-positive Zellen und die PDGF-AA-stimulierten PT1590-Zellen 25,15 % Ki67-positive Zellen (PBS: 14,87 % $\pm$ 6,21 % vs: 10 ng/ml PDGF-AA: 25,15 % $\pm$ 7,33 %, $p = 0,0018$). Zusätzlich sollte analysiert werden, ob die Anwesenheit von PDGF-AA die proliferationsreduzierende Wirkung von Lapatinib in den PT590 Zellen moduliert. Während die Lapatinib-Behandlung zu einer Reduktion der proliferierenden Zellen auf 10,12 % führte, zeigte sich nach Stimulation mit PDGF-AA eine Proliferationsaktivität in den PT1590-Zellen von 20,58 % (PBS+Lapatinib: 10,12 % $\pm$ 4,45 % vs: 10 ng/ml PDGF-AA: 20,58 % $\pm$ 7,35 %, $p = 0,0014$) (**Abb. 41A,B**). Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass THP-1-Makrophagen PDGF-AA freisetzen, welches in den PT1590-Zellen eine erhöhte Proliferation induziert und ferner das Ansprechen auf Lapatinib reduziert.

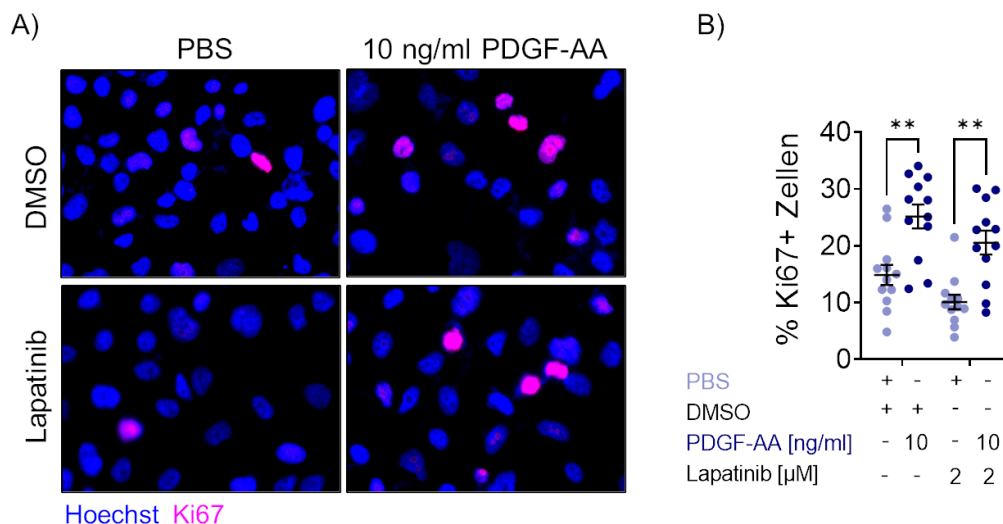


Abbildung 41: **A)** Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der PDGF-AA-stimulierten und Lapatinib (2 μM) behandelten. Eine PBS-Stimulation und DMSO-Behandlung dienten als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der mittlere prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. < 0,05, * < 0,002. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$

4.4.3 PDGF-AA induziert die Phosphorylierung von STAT3, AKT und ERK in PT1590 Zellen

In **Kapitel 4.2.6** konnte demonstriert werden, dass die PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen eine starke STAT3-, AKT- und ERK-Phosphorylierung aufwiesen. Ferner zeigte sich, dass diese Aktivierung auch während der Lapatinib-Behandlung erhalten blieb. Hier stellte sich insbesondere der STAT3-Signalweg als potentieller Mechanismus der THP-1-vermittelten Lapatinib-Resistenz dar. Aus diesem Grund sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob PDGF-AA Einfluss auf die STAT3-, AKT- und ERK-Aktivierung hat. Hier zeigten Western-Blot-Analysen mit anschließender densitometrischer Auswertung, dass PDGF-AA sowohl STAT3 als auch AKT und ERK zeitabhängig aktivieren kann. Alle Signalwege wiesen 15 min und 30 min nach der PDGF-AA-Stimulation die höchste Aktivität auf.

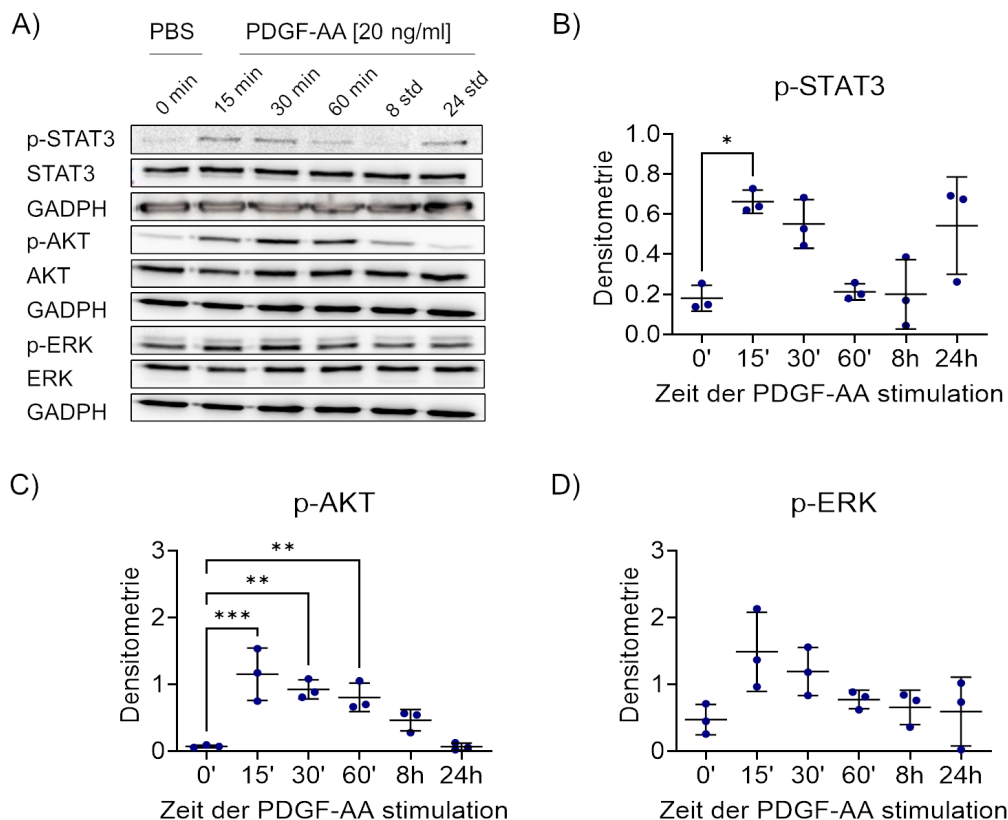


Abbildung 42: textbfA) Repräsentative Western-Blot-Bilder der PT1590-Zellen nach zeitabhängiger Stimulation mit 20 ng/ml PDGF-AA (0 min - 15 min - 30 min - 60 min - 8 Std - 24 Std). PBS diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 µg Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine p-STAT3, STAT3, p-AKT, AKT, p-ERK und ERK detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **B)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteine wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Diese normalisierten Intensitäten wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$

So führte die PDGF-AA-Stimulation nach 15 min zu einer 3,63-fach höheren STAT3-Phosphorylierung als die PBS-Kontrolle (p-STAT3 PBS: $0,1804 \pm 0,064$ vs. p-STAT3 + 20 ng/ml PDGF-AA 15 min: $0,663 \pm 0,057$, $p = 0,0102$) (**Abb. 42A,B**). Des Weiteren offenbarte sich eine zusätzliche Aktivität von STAT3 24 Stunden nach der Stimulation mit PDGF-AA (p-STAT3 PBS: $0,1804 \pm 0,064$ vs. p-STAT3 + 20 ng/ml PDGF-AA 24 Std: $0,543 \pm 0,244$, $p = 0,0616$). Darüber hinaus wiesen die PT1590-Zellen nach Stimulation mit PDGF-AA eine deutliche zeitabhängige Phosphorylierung von AKT auf. Zudem zeigten die PT1590-Zellen nach der PDGF-AA-Stimulation eine deutlich zeitabhängige Phosphorylierung von AKT. Die stärkste Aktivierung von AKT wurde 15 Minuten nach der PDGF-AA-Stimulation beobachtet, wobei eine 21,4-fach höhere AKT-Aktivierung im Vergleich zur PBS-Kontrolle festgestellt wurde. (p-AKT PBS: $0,0706 \pm 0,0186$ vs. p-AKT + 20 ng/ml PDGF-AA 15 min: $1,151 \pm 0,3927$, $p = 0,0003$). Diese blieb auch 60 min nach der PDGF-AA-Stimulation signifikant erhalten (p-AKT + 20 ng/ml PDGF-AA 15 min: $0,805 \pm 0,214$, $p = 0,0085$) (**Abb. 42A,C**). Während 24 Stunden nach der PDGF-AA-Stimulation keine erhöhte AKT-Aktivierung mehr zu beobachten war, zeigte sich acht Stunden nach der Stimulation noch eine 6,57-fach höhere AKT-Aktivität als die PBS-Kontrolle (p-AKT + 20 ng/ml PDGF-AA 15 min: $0,4604 \pm 0,1599$, $p = 0,2496$). Auch das Signalprotein ERK konnte durch die Stimulation mit PDGF-AA aktiviert werden, jedoch in einer weniger ausgeprägten Form. Hier zeigte sich wie bei STAT3 und AKT nach 15 min und 30 min PDGF-AA-Stimulation die stärkste Phosphorylierung. Die PDGF-AA-Stimulation führte nach 15 min zu einer 3,16-fach und nach 30 min zu einer 2,53-fach höheren ERK-Phosphorylierung als die PBS-Kontrolle (p-ERK PBS: $0,471 \pm 0,227$ vs. p-ERK + 20 ng/ml PDGF-AA 15 min: $1,487 \pm 0,5925$, $p = 0,0608$, vs. p-ERK + 20 ng/ml PDGF-AA 30 min: $1,191 \pm 0,3608$, $p = 0,2663$) (**Abb. 42A,D**). Insgesamt konnte demonstriert werden, dass PDGF-AA die Phosphorylierung von STAT3, AKT und ERK vermittelt. Hier zeigte sich insbesondere eine starke AKT-Phosphorylierung in Anwesenheit des PDGF-AA.

4.4.4 Inhibition und Knockdown des PDGFR α vermindert die Makrophagen induzierte Proliferation und Lapatinib Resistenz

Es konnte bisher nachgewiesen werden, dass PDGF-AA in den PT1590-Zellen eine Proliferation induziert und das Ansprechen auf Lapatinib reduziert. Ferner führte die Anwesenheit von PDGF-AA zur Aktivierung der Signalwege STAT3, AKT und ERK. Als Homodimer bindet PDGF-AA ausschließlich an den Transmembranrezeptor PDGFR α . Die PDGF-Rezeptoren sind eine Familie von Rezeptortyrosinkinasen, die Zellproliferation, Migration und Apoptose in vielen unterschiedlichen Zellen beeinflussen kann. Es gibt zwei Haupttypen von PDGF-Rezeptoren: PDGFR α und PDGFR β . Diese Rezeptoren können durch die Ligandenbindung entweder homo- oder heterodimerisieren. Dabei führt die Bindung von PDGF-AA zu einer Homodimerisierung des PDGFR α . In einem nächsten Schritt fokussiert dieser Teil der Arbeit die Rolle des PDGFR α in der makrophagenvermittelten Proliferation und Lapatinib-Therapieresistenz. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, welche GEAC-Zelllinien den PDGFR α und gleichzeitig den HER2-Rezeptor exprimieren. Hier konnte mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden, dass die HER2-positive Zelllinie PT1590 und die HER2-negative Zelllinie PT6216 den PDGFR α -Rezeptor exprimieren, während die HER2-positiven Zelllinien LN1590, NCI-N87 und OE33 und die HER2-negative Zelllinie SKGT4 diesen Rezeptor nicht bilden (**Abb. 43A**). Die IFF der PT1590 und NCI-N87 detektierten eine starke membranöse Expression des HER2-Rezeptors. Der PDGFR α konnte nur in den PT1590-Zellen nachgewiesen werden.

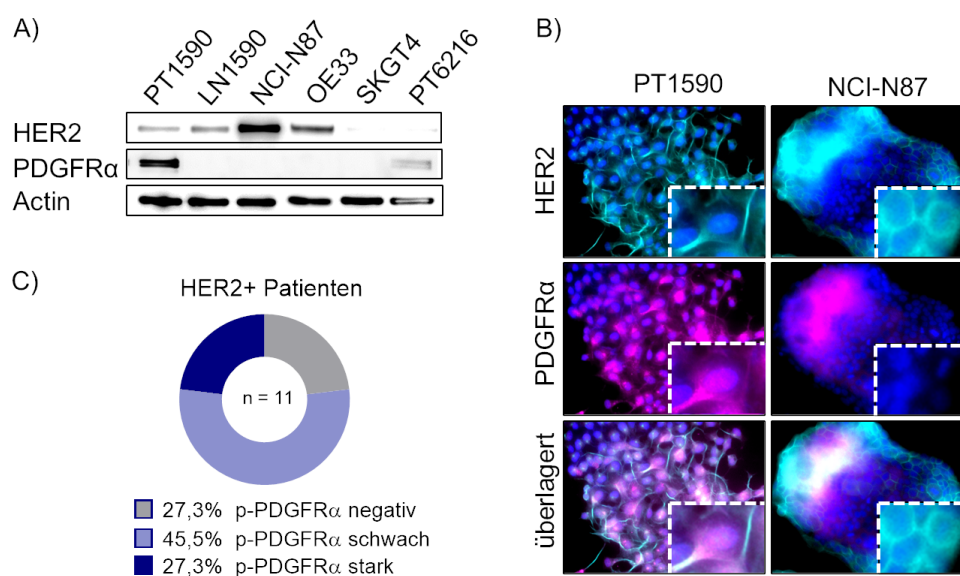


Abbildung 43: **A)** Repräsentative Abbildung der Western Blot Analyse der PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216 Zelllinien. Detektiert wurde der HER2 und PDGFR α . Es wurden 15 μ g Proteinextrakt der unterschiedlichen Zelllinien auf dem Gel beladen. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. **B)** Repräsentative Abbildung des immunfluoreszenz-Detektion von PDGFR α und HER2 der Zelllinien PT1590 und NCI-N87. **C)** Kreisdiagramm der prozentualen Verteilung der HER2 positiven GEAC-Patienten, die eine Aktivität des PDGFR α vorweisen. Diese wurde in negativ, schwach und stark unterschieden.

Auch dieser stellte sich primär membranös dar (**Abb. 43B**). Darüber hinaus sollte in einem nächsten Schritt die klinische Relevanz untersucht werden. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen des p-PDGFR α durchgeführt. Die Etablierung einer immunhistochemischen Detektion des PDGFR α blieb erfolglos. Es konnte jedoch die phosphorylierte und somit aktivierte Form des PDGFR α nachgewiesen werden. Um zu beurteilen, welche Rolle der PDGFR α in der Lapatinib-Resistenz spielt, wurde der Anteil der HER2-positiven Patienten mit PDGFR α -Koexpression ermittelt. In unserer GEAC-Patienten-Kohorte zeigte sich mit 7,4 % lediglich ein kleiner Teil an HER2-positiven Patienten. Von diesen Patienten zeigten 68,8 % eine p-PDGFR α -Koexpression. Darunter wiesen 27,2 % eine schwache und 27,2 % eine starke Färbung des p-PDGFR α auf. Weitere Assoziationsanalysen der HER2 und p-PDGFR α -positiven Patienten im Bezug auf klinisch-pathologische Merkmale konnten aufgrund der niedrigen Patientenanzahl nicht durchgeführt werden (**Abb. 43C**). In einem darauffolgenden Schritt sollte untersucht werden, ob das makrophagen-sekretierte PDGF-AA über eine Aktivierung des PDGFR α die Proliferation und die Resistenz gegenüber der HER2-spezifischen Therapie mit Lapatinib vermittelt. Hierfür wurde zunächst ein siRNA-vermittelter Knockdown des PDGFR α in den PT1590-Zellen etabliert. Die Analyse der *PDGFRA*-Genexpression zeigte eine signifikante Verminderung der PDGFA-mRNA. Dabei wies der siRNA-vermittelte Knockdown eine Effizienz in den monokultivierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen von 97,48 % bzw. 97,58 % auf (**Abb. 44A**). Zusätzlich zeigte sich ein ausbleibender immunvermittelter Nachweis des PDGFR α in den siPDGFR α -transfizierten PT1590-Zellen (**Abb. 44B**).

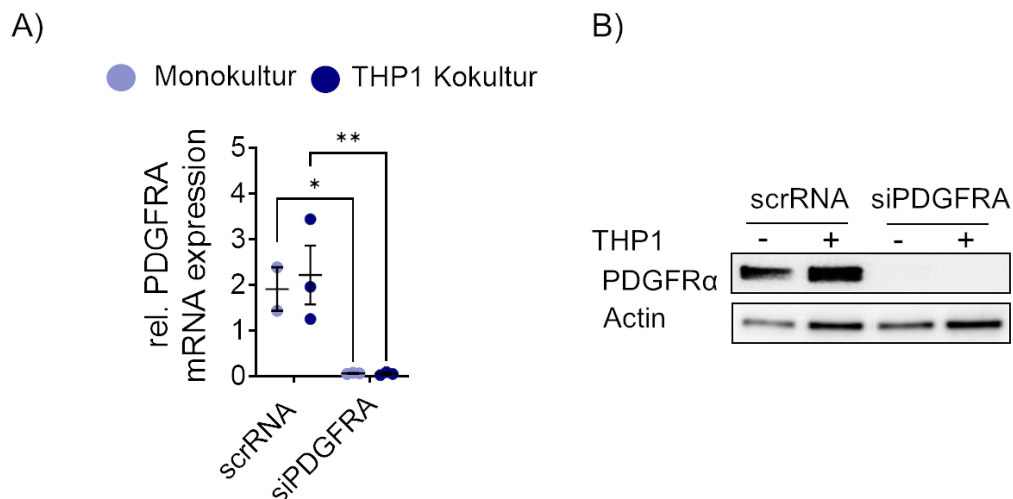


Abbildung 44: **A)** Relative Genexpressionsanalyse des Gens *PDGFRA* nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur und gleichzeitigem siRNA-vermitteltem Knockdown von *PDGFRA* (siPDGFR α). Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Genexpressionswerte wurden mittels qPCR bestimmt und die *PDGFRA*-mRNA-Menge wurde auf GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche. **B)** Repräsentative Western-Blotbilder der PDGFR α -Proteinmenge der siPDGFR α - bzw. scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur. Es wurden 15 μ g Proteinlysate verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. * < 0,05, ** < 0,002, ***: p < 0,002, ****: p < 0,0001.

In einem nächsten Schritt wurden die siPDGFR α -transfizierte PT1590-Zellen mit Lapatinib behandelt und in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen kokultiviert und anschließend der Anteil der vitalen Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten hierbei die monokultivierten, scrRNA-transfizierten und DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es stellten sich zunächst vergleichbare Befunde wie in **Kapitel 4.2.5** dar. Dabei zeigte sich ein deutlich höherer Anteil vitaler Zellen in den scrRNA-transfizierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zu den scrRNA-transfizierten monokultivierten PT1590-Zellen. Hier konnte ebenfalls demonstriert werden, dass durch die THP-1-Kokultur das Ansprechen auf Lapatinib in den scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen sich deutlich reduziert darstellte. Diese THP-1-Makrophagen vermittelte Proliferation und Lapatinib-Resistenz konnte durch den Knockdown des PDGFR α unterbrochen werden.

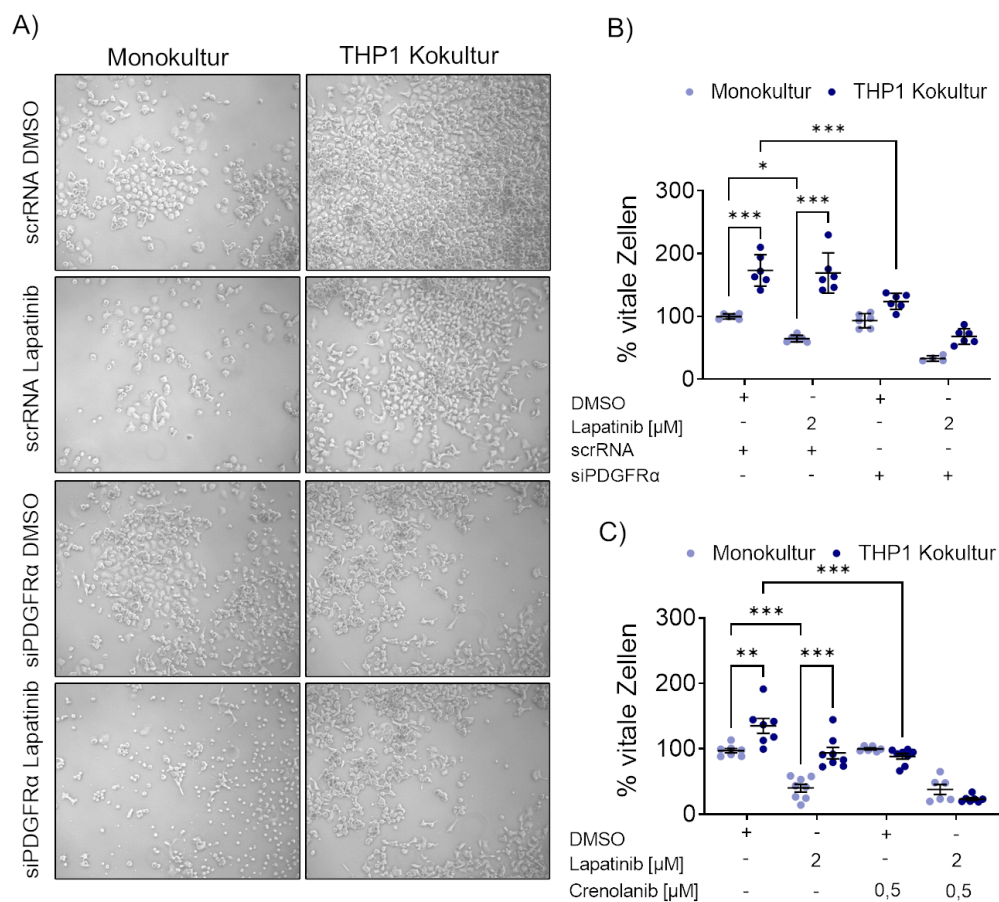


Abbildung 45: A) Repräsentative Phasenkontrastbilder der siPDGFR α -transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 μ M Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation des Anteils der vitalen scrRNA- bzw. siPDGFR α -transfizierten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten, DMSO-behandelten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen. **C)** Quantifikation des Anteils der vitalen Crenolanib (0,5 μ M) und Lapatinib (2 μ M) behandelten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001.

Während die scrRNA-transfizierten PT1590 in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen einen 73,32 % höheren Anteil an vitalen Zellen im Vergleich zu den scrRNA-transfizierten und monokultivierten PT1590-Zellen aufwiesen (Mono scrRNA DMSO: 100,0 % $\pm$ 4,0 % vs. co THP-1 scrRNA DMSO: 173,32 $\pm$ 24,90 %, $p < 0,001$), zeigten die siPDGFRA-transfizierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zu den monokultivierten PT1590-Zellen eine deutlich geringere und nicht signifikante Steigerung von 30,5 % (Mono siPDGFRA DMSO: 93,36 % $\pm$ 11,23 % vs. co THP-1 siPDGFRA DMSO: 123,85 $\pm$ 12,84 %, $p = 0,09$). Korrespondierende Befunde konnten für die Lapatinib behandelten PT1590-Zellen erhoben werden. Hier zeigten die scrRNA-transfizierten, Lapatinib behandelten und monokultivierten PT1590-Zellen einen Anteil an vitalen Zellen von 64,75 %. Dieser Anteil konnte durch die Anwesenheit der THP-1-Makrophagen auf 169,3 % gesteigert werden (Mono scrRNA Lapatinib: 64,75 % $\pm$ 5,42 % vs. co THP-1 scrRNA Lapatinib: 169,30 $\pm$ 32,02 %, $p < 0,001$). Durch den *PDGFRA*-Knockdown und die Lapatinib-Behandlung reduzierte sich der Anteil vitaler PT1590-Zellen im Vergleich zur scrRNA-transfizierten Kontrolle auf 33,11 %. Im Vergleich zu den siPDGFRA-transfizierten, Lapatinib-behandelten und monokultivierten PT1590-Zellen zeigte sich eine nicht signifikante Steigerung des Anteils an vitalen Zellen von 34,89 % in den siPDGFRA-transfizierten, Lapatinib-behandelten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen. Somit führte die PDGFR α -Defizienz zu einem Ausbleiben der THP-1-Makrophagen vermittelte Resistenz gegenüber Lapatinib (Mono siPDGFRA Lapatinib: 33,11 % $\pm$ 4,47 % vs. co THP-1 siPDGFRA Lapatinib: 68,04 % $\pm$ 12,35 %, $p = 0,07$) (**Abb. 45A,B**).

Neben der genetischen Manipulation des PDGFR α wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob die erhobenen Befunde mit einer pharmakologischen Inhibition des Rezeptors verifiziert werden konnten. Hierfür wurde der TKI Crenolanib verwendet. Dieser experimentell und oral verfügbare TKI hemmt spezifisch die Rezeptor-assoziierte Kinase von mutierten und überexprimierten FLT3- und PDGFR α -Rezeptoren. Auch hier konnte beobachtet werden, dass durch die Inhibition des PDGFR α mit Crenolanib die THP-1-vermittelte Erhöhung des Anteils an vitalen Zellen ohne und unter Lapatinib-behandlung deutlich reduziert werden konnte. Hier zeigte sich, dass durch die Behandlung mit Crenolanib der Anteil der vitalen Zellen in den THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen signifikant um 46,6 % reduziert werden konnte, während kein Unterschied zwischen den DMSO- und Crenolanib-behandelten monokultivierten PT1590-Zellen beobachtet werden konnte (co THP-1 DMSO: 135,03 % $\pm$ 29,81 % vs. co THP-1 Crenolanib: 88,42 % $\pm$ 12,04 %, $p < 0,001$). Darüber hinaus konnte durch die Behandlung mit Crenolanib die THP-1-vermittelte Lapatinib-Resistenz aufgehoben werden. Während die THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen einen deutlich höheren Anteil an vitalen Zellen im Vergleich zu den monokultivierten PT1590 aufwiesen (Mono Lapatinib: 40,10 % $\pm$ 16,67 % vs. co THP-1 Lapatinib: 93,57 % $\pm$ 24,26 %, $p < 0,001$) führte die gleichzeitige Behandlung mit Crenolanib zu einer deutlichen Reduktion der vitalen THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten Zellen (Mono Lapatinib + Crenolanib:

37,83 % $\pm$ 18,59 % vs. co THP-1 Lapatinib + Crenolanib: 23,22 % $\pm$ 5,10 %, $p = 0,98$ (**Abb. 45A,C**). Korrespondierende Ergebnisse konnten in den Ki67-Proliferationsanalysen beobachtet werden. Hier zeigte sich, wie bereits in **Kapitel 4.2.5** demonstriert, dass die PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen eine erhöhte Ki67-Proliferationsrate aufwiesen als die monokultivierten PT1590-Zellen. Darüber hinaus zeigte die Lapatinib-Behandlung in den THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen keine proliferationsreduzierende Wirkung, während die monokultivierten PT1590-Zellen durch die Lapatinib-Behandlung deutlich weniger Ki67-positive Zellen aufwiesen. In einem nächsten Schritt sollte der Einfluss des PDGFR α auf die Makrophagen vermittelte Proliferation und Lapatinib-Resistenz untersucht werden. So zeigte sich, dass durch den transienten Knockdown des PDGFR α der proliferationsinduzierende Effekt der Makrophagen auf die PT1590-Zellen unterbrochen und das Ansprechen auf Lapatinib wiederhergestellt werden konnte. Dabei wiesen die THP-1-kokultivierten und PDGFR α -defizienten PT1590-Zellen eine vergleichbare Ki67-Proliferationsrate wie die monokultivierten PDGFR α -defizienten PT1590-Zellen auf (Mono siPDGFRA DMSO: 11,35 % $\pm$ 4,16 % vs. co THP-1 siPDGFRA DMSO: 11,38 % $\pm$ 4,79 %, $p > 0,999$). Im Vergleich zu der scrRNA-Kontrolle wiesen die THP-1-kokultivierten und PDGFR α -defizienten PT1590-Zellen eine signifikante Verminderung der Ki67-Proliferationsrate um 65,7 % auf (co THP-1 scrRNA DMSO: 33,48 % $\pm$ 11,47 % vs. co THP-1 siPDGFRA DMSO: 11,38 % $\pm$ 4,79 %, $p < 0,001$). Auch die THP-1-vermittelte Lapatinib-Resistenz konnte durch den siRNA-vermittelten Knockdown des PDGFR α aufgehoben werden. Während die THP-1-kokultivierten, scrRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen eine Ki67-Proliferationsrate von 32,1 % aufwiesen, so zeigten die THP-1-kokultivierten, siPDGFRA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen eine Ki67-Proliferationsrate von lediglich 8,9 % und somit signifikant geringer (co THP-1 scrRNA Lapatinib: 32,02 % $\pm$ 8,54 % vs. co THP-1 siPDGFRA Lapatinib: 8,92 % $\pm$ 4,88 %, $p < 0,001$). Zusätzlich ergaben sich therapeutische Synergien durch die verminderte PDGFRA-Expression und gleichzeitige Lapatinib-Behandlung. Während die Lapatinib-Behandlung in den scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen zu einer Reduktion der Ki67-Proliferationsrate von 36,0 % führte, konnte bei gleichzeitigem Knockdown des PDGFR α eine Reduktion der Ki67-Proliferationsrate von 62,7 % erreicht werden (Mono scrRNA DMSO: 16,07 % $\pm$ 5,12 % vs. Mono scrRNA Lapatinib: 10,37 % $\pm$ 4,16 % vs. Mono siPDGFRA Lapatinib: 6,01 % $\pm$ 2,62 %, $p = 0,004$) (**Abb. 46A,B**). Wie in vorherigen Befunden gezeigt ist die THP-1-Makrophagen vermittelte Proliferation unter anderem durch eine erhöhte Bildung der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 und Cyclin E1 zu erklären. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss des PDGFR α auf die THP-1-induzierte Bildung der Proteine Cyclin D1 und Cyclin E1 untersucht. Hier führte der funktionelle Verlust des PDGFR α zu einer deutlichen Verminderung der THP-1-induzierten Cyclin D1- und Cyclin E1-Expression – insbesondere bei gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib. Dabei zeigten densitometrische Analysen zunächst, dass die Menge an Cyclin D1 und Cyclin E1 4,6-fach bzw. 1,5-fach höher in den

THP-1-kokultivierten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen als in den monokultivierten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen war (Mono scrRNA DMSO: $0,149 \pm 0,059$ vs. co THP-1 scrRNA DMSO: $0,694 \pm 0,254$, $p = 0,0305$). In Anwesenheit der THP-1-Makrophagen waren diese erhöhten Mengen auch in den scrRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen zu detektieren. Dieser Effekt war insbesondere für Cyclin D1 zu beobachten. Hier stellte sich im Vergleich zu den monokultivierten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen eine 2,6-fach höhere Menge an Cyclin D1 dar (Mono scrRNA Lapatinib: $0,279 \pm 0,124$ vs. co THP-1 scrRNA Lapatinib: $0,725 \pm 0,360$, $p = 0,0714$). Diese Befunde waren in den siPDGFR α -transfizierten PT1590-Zellen nicht mehr zu beobachten.

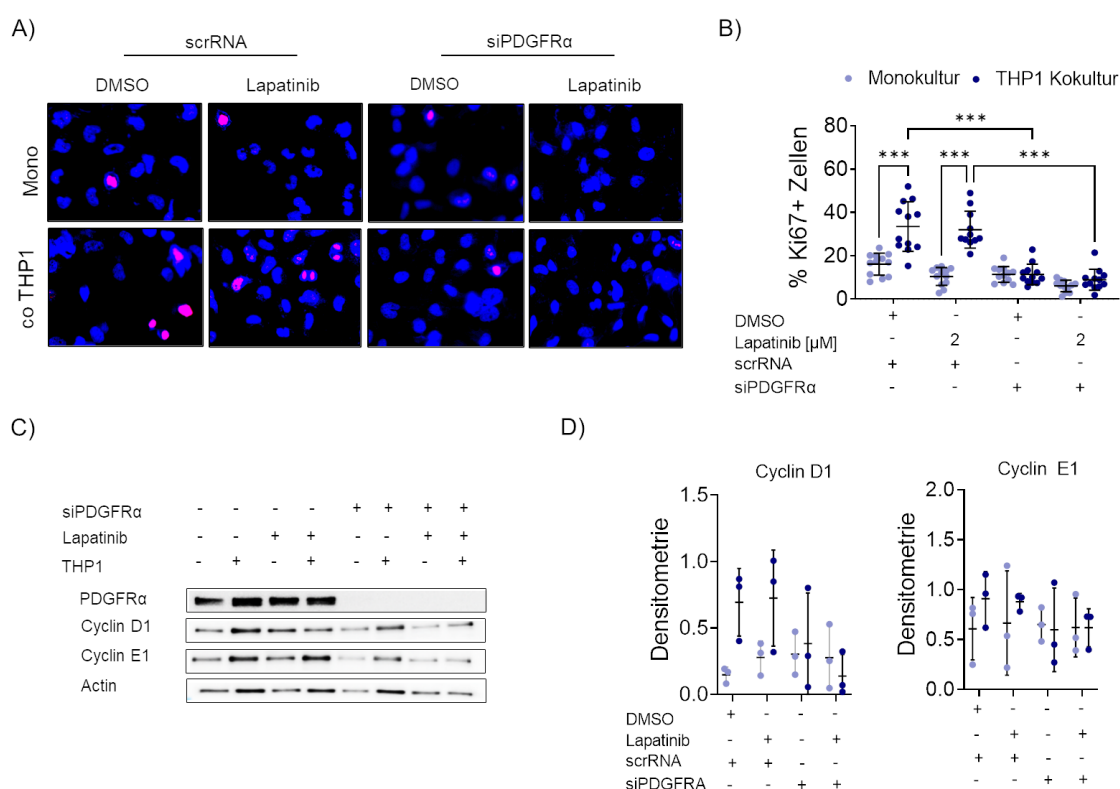


Abbildung 46: A) Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der siPDGFR α -transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 μ M Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen. **C)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der mono- bzw. THP1-kokultierten siRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μ g Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine PDGFR α , Cyclin D1 und Cyclin E1 detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **D)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

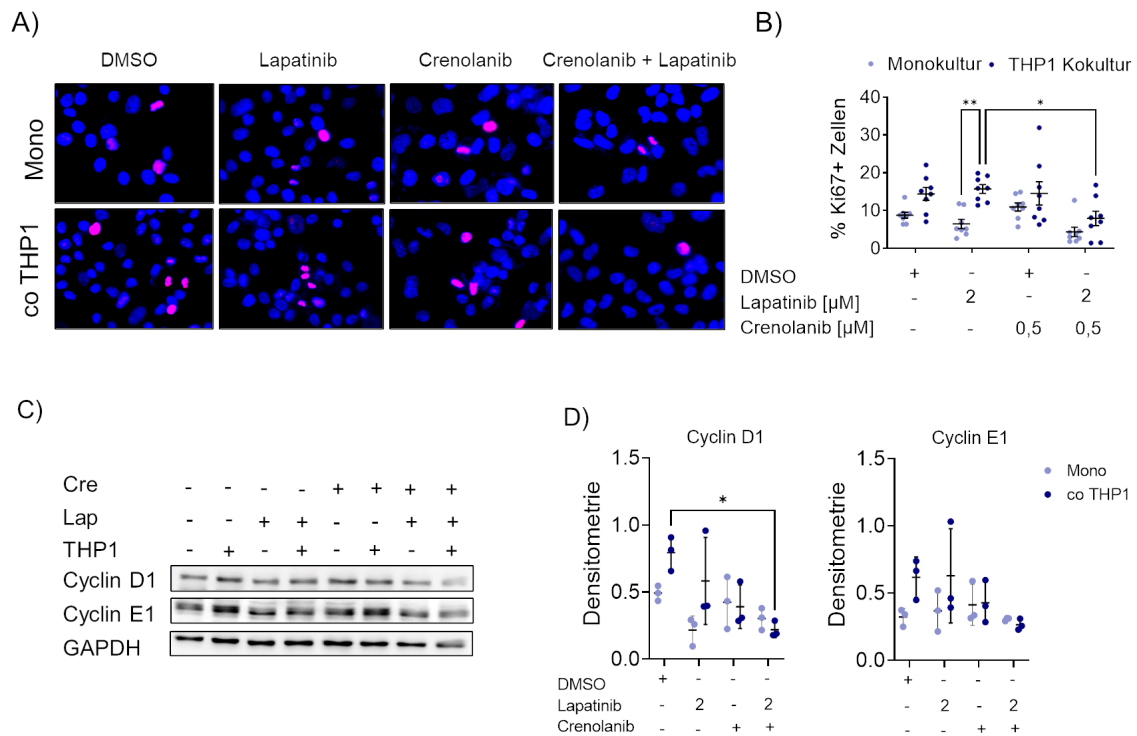


Abbildung 47: **A)** Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der Crenolanib (0,5 µM) und Lapatinib (2 µM) behandelten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen. **C)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der mono- bzw. THP1-kokultivierten siRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 µg Proteinlysat beladen. Es wurden die Proteine Cyclin D1 und Cyclin E1 detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **D)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Dabei zeigten die densitometrischen Analysen keinen Unterschied in der Proteinmenge von Cyclin D1 und Cyclin E1 in den siPDGFRA-transfizierten und THP-1-kokultivierten bzw. monokultivierten PT1590-Zellen. Vor allem bei gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib konnte durch die *PDGFRA*-Defizienz eine deutliche Reduktion der Cyclin-D1- und Cyclin-E1-Expression in den mono- und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen detektiert werden (co THP-1 scrRNA Lapatinib: $0,725 \pm 0,360$ vs. co THP-1 siPDGFRA Lapatinib: $0,138 \pm 0,162$, $p = 0,0532$) (**Abb. 46C,D**). Auch durch die pharmakologische Inhibition des PDGFR α konnten vergleichbare Befunde erhoben werden. In diesem Abschnitt wird aufgrund von Redundanz ausschließlich auf den Einfluss des Inhibitors Crenolanib auf die THP-1 vermittelten Effekte eingegangen. Hier zeigten die Ki67-Proliferationsanalysen, dass die Behandlung der Mono- bzw. THP-1-kokultivierten PT1590 Zellen mit Crenolanib zu vergleichbaren Proliferationsraten führte (Mono Crenolanib: $10,94 \% \pm 3,07 \%$ vs. co THP-1 Crenolanib: $14,53 \% \pm 8,71 \%$, $p = 0,79$). Im Vergleich zu den Versuchen mit den siPDGFRA transfizierten PT1590 Zellen sind diese Befunde jedoch deutlich weniger ausgeprägt. Die Gleichzeitige Behandlung der Mono- bzw. THP-1-kokultivierten PT1590 Zellen mit Crenolanib und Lapatinib bewirkte sowohl in den monokultivierten

als auch in den THP-1-kokultivierten PT1590 eine deutliche Reduktion der Proliferation im Vergleich zur mono-bzw. THP-1-kokultivierten DMSO oder Lapatinib behandelten Kontrolle (Mono Crenolanib Lapatinib: $4,34 \% \pm 3,52 \%$ vs. co THP-1 Crenolanib Lapatinib: $7,90 \% \pm 5,39 \%$, $p = 0,80$) (**Abb. 47A,B**). Zuletzt stellte sich in Western Blot und anschließenden densitometrischen Analysen eine verminderte Bildung von Cyclin D1 und Cyclin E1 in den THP-1-kokultivierten und Crenolanib behandelten PT1590 Zellen im Vergleich zu den THP-1-kokultivierten und DMSO behandelten PT1590 Zellen dar. Ebenfalls wiesen die THP-1-kokultivierten Crenolanib und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen gegenüber den THP-1-kokultivierten und Lapatinib behandelten PT1590 Zellen eine Reduktion der Cyclin D1 und Cyclin E1 Expression um 63,8 % bzw. 58,1 (Cyclin D1: co THP-1 Lapatinib: $0,58 \% \pm 0,32 \%$ vs. co THP-1 Crenolanib Lapatinib: $0,21 \% \pm 0,06 \%$, $p = 0,03$) (**Abb. 47C,D**).

4.4.5 Neutralisierung des löslichen PDGF-AA sensibilisiert PT1590 Zellen gegenüber Lapatinib

Neben der genetischen Manipulation und pharmakologischen Inhibition des PDGFR α sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob vergleichbare Befunde mit der antikörpervermittelten Neutralisierung des PDGF-AA im Überstand der Kokultur erhoben werden konnten. So zeigte sich zunächst, wie bereits mehrfach oben demonstriert, dass die Anwesenheit der THP-1-Makrophagen zu einem erhöhten Anteil an vitalen Zellen führt und die Reduktion des Anteils an vitalen PT1590-Zellen durch die Behandlung mit Lapatinib in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen aufgehoben werden kann (Mono DMSO: $100,31 \% \pm 12,51 \%$ vs. co THP-1 DMSO = $129,96 \% \pm 13,90 \%$, $p = 0,08$) (Mono Lapatinib: $44,67 \% \pm 12,51 \%$ vs. co THP-1 Lapatinib: $104,68 \% \pm 25,70 \%$, $p < 0,002$). Durch die Zugabe eines neutralisierenden PDGF-AA-Antikörpers in den Zellkulturüberstand konnte der Einfluss auf die THP-1 vermittelte Erhöhung der vitalen Zellen deutlich reduziert werden. Dabei führte die Neutralisierung des PDGF-AA zu einer Reduktion der vitalen THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen um 21,05 % im Vergleich zur PBS-behandelten und THP-1-kokultivierten Kontrolle. Während die Anwesenheit der THP-1-Makrophagen zur einer 1,3 fach höheren Anzahl an vitalen und PBS-behandelten PT1590-Zellen führte, stellte sich der THP-1-vermittelte Effekt mit einem 1,1-fach höheren Anteil an vitalen und Anti-PDGF-AA-Antikörper-behandelten PT1590-Zellen deutlich geringer dar (Mono neutr. PDGF-AA: $87,50 \% \pm 11,77 \%$ vs. co THP-1 neutr. PDGF-AA = $108,91 \% \pm 3,77 \%$, $p = 0,54$). Zusätzlich konnte durch die Zugabe des neutralisierenden PDGF-AA-Antikörpers die THP-1-Makrophagen vermittelte Lapatinib-Resistenz in den PT1590-Zellen aufgehoben werden. Durch die Lapatinib-Behandlung zeigte sich eine Reduktion der vitalen monokultivierten PT1590-Zellen auf 44,66 % , während die THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen durch die Behandlung mit Lapatinib einen Anteil an vitalen Zellen von 104,68 % aufwiesen. Durch die zusätzliche Behandlung der Zellen

mit dem anti-PDGF-AA-Antikörper zeigte die PT1590-Monokultur einen Anteil an vitalen Zellen von 31,91 % während die THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen einen Anteil an vitalen Zellen von 44,31 % aufwiesen. Damit reduzierte sich der THP-1-Makrophagen vermittelte Effekt statistisch signifikant um 57,69 %. (Mono Lapatinib neutr. PDGF-AA: 31,91 % $\pm$ 9,77 % vs. co THP-1 Lapatinib neutr. PDGF-AA = 44,31 % $\pm$ 24,62 %, $p > 0,99$), (co THP-1 Lapatinib: 104,68 % $\pm$ 25,70 % vs. co THP-1 Lapatinib neutr. PDGF-AA = 44,31 % $\pm$ 24,62 %, $p < 0,001$) (**Abb. 48**). Insgesamt konnte durch die erhobenen Befunde demonstriert werden, dass durch die Neutralisierung des PDGF-AA im Zellkulturüberstand die THP-1-vermittelte Induktion der Proliferation und Lapatinib-resistenz in den PT1590-Zellen aufgehoben werden kann.

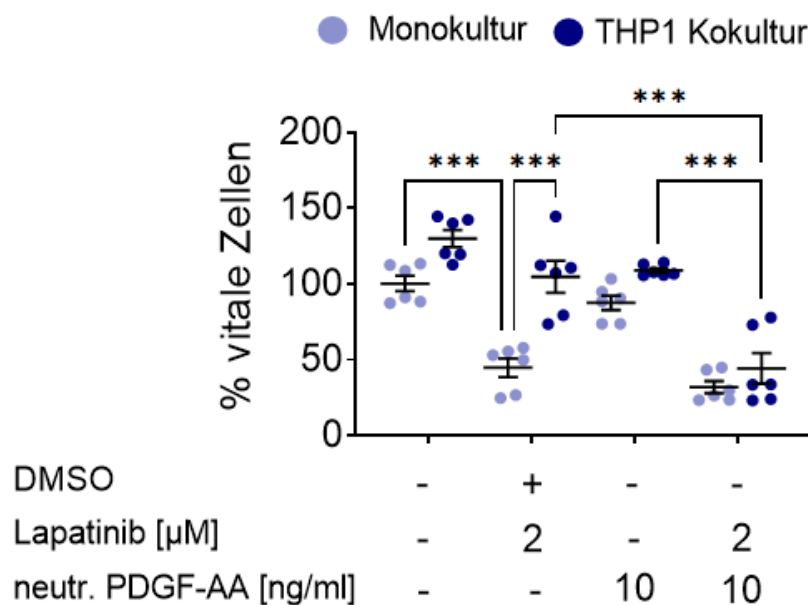


Abbildung 48: Darstellung des prozentualen Anteils an vitalen PT1590-Zellen. Die PT1590 Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1 kokultiviert und mit 2 μLapatinib und bzw. oder mit 10 ng/ml eines neutralisierenden anti-PDGF-AA Antikörpers behandelt. DMSO oder PBS wurden als Kontrolle verwendet. Die Bestimmung der vitalen Zellen wurde mit Hilfe einer MTT-Analyse durchgeführt. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt. Die zweifaktorielle ANOVA wurde für die statistische Analyse verwendet und der multiple Vergleichstest nach Šidák wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanzen herangezogen. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

4.4.6 THP-1 vermittelte AKT und ERK Aktivierung wird durch Inhibition und Knockdown des PDGFR α vermindert

Es zeigte sich, dass die Anwesenheit der Makrophagen zu einer starken Aktivierung der onkogenen Signale STAT3, AKT und ERK führt. Dabei war die Aktivierung des STAT3-Signalweges am stärksten ausgeprägt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit PDGF-AA zu einer deutlichen Phosphorylierung von STAT3, AKT und ERK führt. Ferner führte die siRNA-vermittelte Reduktion der STAT3-Expression zu einem erneuten Ansprechen auf Lapatinib in den THP-1-kokultivierten und Lapatinib-resistenten PT1590-Zellen. Nun soll untersucht werden, ob die genetische Manipulation und die pharmakologische Inhibition des PDGFR α Einfluss auf die Makrophagen-vermittelte Aktivierung von STAT3, AKT und ERK haben.

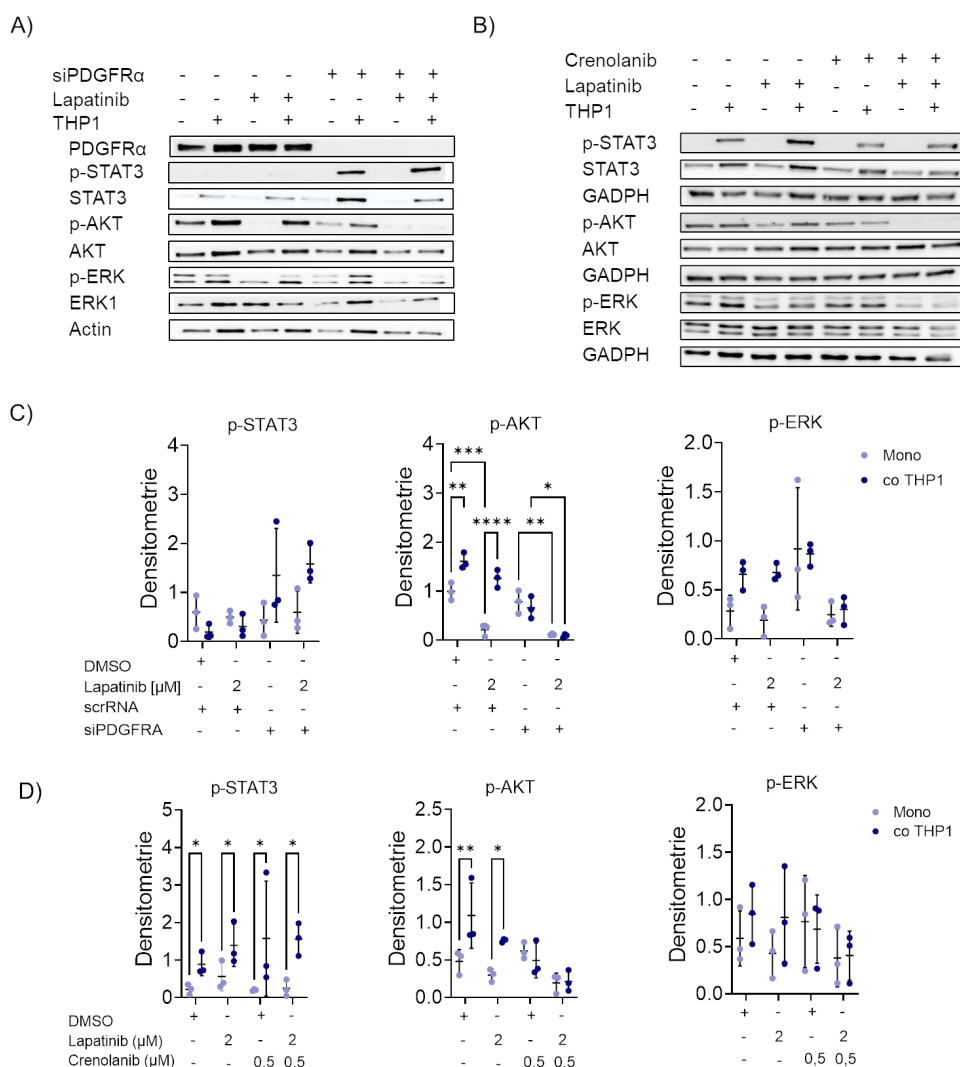


Abbildung 49: Repräsentative Abbildungen der Western Blot Analysen von mono- bzw. THP-1-kokultivierten **A)** siPDGFR α transfizierten und **B)** Crenolanib behandelten PT1590-Zellen. Gele wurden mit 15 μ g Proteinextrakt beladen und Actin und GAPDH wurden als Ladekontrolle verwendet. Densitometrische Auswertung von der Phosphorylierungsaktivität von STAT3, AKT und ERK in **C)** siPDGFR α transfizierten und **D)** Crenolanib behandelten PT1590 Zellen. Die zweifaktorielle ANOVA wurde für die statistische Analyse verwendet und der multiple Vergleichstest nach Šídák's wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanzen herangezogen. (* < 0,0332, ** < 0,0021, *** < 0,0002, **** < 0,0001)

Hierfür wurden siPDGFRA- und scrRNA-transfizierte PT1590-Zellen entweder mono- bzw. THP-1-kokultiviert und zusätzlich mit Lapatinib behandelt. Zunächst zeigte sich durch den fehlenden Nachweis des PDGFR α in den siPDGFRA-transfizierten PT1590-Zellen ein erfolgreicher siRNA-vermittelter Knockdown des Rezeptors. Ein Effekt auf die THP-1 vermittelte Aktivierung des STAT3-Signalweges konnte durch den Expressionsverlust des PDGFRA in den PT1590-Zellen nicht beobachtet werden. Es zeigte sich weiterhin eine starke STAT3-Phosphorylierung in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen. Dabei stellte sich sogar eine stärkere STAT3-Aktivierung in den siPDGFRA-transfizierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen dar. Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Einfluss der PDGFR α Defizienz auf die THP-1-induzierte Aktivierung des AKT-Signalwegs. Wie bereits in **Kapitel 4.2.6** führt die THP-1-Kokultur im Vergleich zur Monokultur zu einer signifikanten AKT-Phosphorylierung in den PT1590-Zellen. Hier zeigte die Densitometrie eine 1,6-fach stärkere AKT-Phosphorylierung in den THP-1-kokultivierten PT1590 im Vergleich zur PT1590-Monokultur (Mono DMSO: $0,99 \pm 0,179$ vs. co THP-1 DMSO: $1,61 \pm 0,161$, $p = 0,0085$). Ferner reduzierte die Lapatinib-Behandlung deutlich die AKT-Aktivierung in den monokultivierten PT1590-Zellen, während die THP-1-kokultivierten PT1590 eine anhaltend starke AKT-Aktivierung aufwiesen. Dabei zeigten die THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen eine 6,1-fach stärkere AKT-Aktivierung als die monokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen (Mono Lapatinib: $0,212 \pm 0,121$ vs. co THP-1 Lapatinib: $1,26 \pm 0,183$, $p < 0,0001$). Durch den Knockdown des PDGFR α in den PT1590-Zellen konnte der Einfluss der THP-1-Makrophagen auf den AKT-Signalweg aufgehoben werden. So stellten sich keine Unterschiede mehr in der AKT-Aktivierung in den mono- bzw. THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen dar (Mono siPDGFRA: $0,78 \pm 0,235$ vs. co THP-1 siPDGFRA: $0,65 \pm 0,227$, $p > 0,999$). Zusätzlich konnte durch die PDGFR α -Defizienz die erhöhte AKT-Aktivierung in den THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen wieder auf das Niveau der monokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen reduziert werden (Mono Lapatinib siPDGFRA: $0,12 \pm 0,017$ vs. co THP-1 Lapatinib siPDGFRA: $0,09 \pm 0,039$, $p > 0,999$). Ähnliche Befunde konnten für den ERK-Signalweg erhoben werden. Auch hier zeigten sich zunächst vergleichbare Befunde wie in Kapitel **Kapitel 4.2.6** dargestellt. Die PDGFRA-Defizienz führte dabei nur in Kombination mit Lapatinib zu einer deutlichen Reduktion der ERK-Aktivierung in den THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen. Während die scrRNA-transfizierten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen im Vergleich zu den monokultivierten PT1590-Zellen eine 132 % stärkere ERK-Phosphorylierung aufwiesen, zeigten die PDGFRA-defizienten PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen und der Monokultur keinen Unterschied in der ERK-Aktivierung (Mono scrRNA: $0,26 \pm 0,161$ vs. co THP-1 scrRNA: $0,66 \pm 0,148$, $p > 0,9475$), (Mono siPDGFRA: $0,92 \pm 0,624$ vs. co THP-1 siPDGFRA: $0,87 \pm 0,117$, $p = 0,999$). Darüber hinaus führte die PDGFRA-Defizienz zu einer ausbleibenden ERK-Aktivierung in den THP-1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen (Mo-

no siPDGFRA Lapatinib: $0,25 \pm 0,119$ vs. co THP-1 siPDGFRA Lapatinib: $0,29 \pm 0,143$, $p > 0,999$) (**Abb. 49A,C**). Neben der genetischen Manipulation des PDGFR α konnten durch die pharmakologische Inhibition des PDGFR α durch Crenolanib die erhobenen Befunde verifiziert werden. Auch durch Inhibition des PDGFR α mit Crenolanib konnte die THP-1-vermittelte STAT3-Aktivierung nicht beeinflusst werden. Allerdings hob die Crenolanib-Behandlung die THP-1-Makrophagen vermittelte AKT-Phosphorylierung in den PT1590-Zellen auf. Während die DMSO-behandelten PT1590-Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen eine 2,3-fach höhere AKT-Phosphorylierung als die monokultierten PT1590-Zellen aufwiesen, zeigten die Crenolanib-behandelten PT1590-Zellen eine sogar im Durchschnitt 0,80-fach reduzierte AKT-Phosphorylierung als die monokultivierten PT1590-Zellen (Mono DMSO: $0,48 \pm 0,159$ vs. co THP-1 DMSO: $1,09 \pm 0,435$, $p = 0,0053$), (Mono Crenolanib: $0,62 \pm 0,109$ vs. co THP-1 Crenolanib: $0,49 \pm 0,233$, $p = 0,8287$). Auch die erhöhte AKT-Aktivierung in den Lapatinib-behandelten und THP-1-kokultivierten PT1590-Zellen stellte sich bei gleichzeitiger Behandlung mit Crenolanib um 71,3 % geringer dar und zeigte auch keine Unterschiede zur PT1590-Monokultur (Mono Lapatinib Crenolanib: $0,19 \pm 0,127$ vs. co THP-1 Lapatinib Crenolanib: $0,22 \pm 0,139$, $p = 0,999$). Die densitometrischen Analysen der ERK-Phosphorylierung zeigten keinen erheblichen Einfluss (**Abb. 49B,D**). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen durch Freisetzung von PDGF-AA mit anschließender Aktivierung des PDGFR α vor allem eine AKT-Aktivierung induzieren.

4.5 Charakterisierung der STAT3 Signaltransduktion in GEAC-Patienten

4.5.1 STAT3 Aktivierung korreliert mit Infiltration CD68+ und CD163+ Makrophagen in GEAC-Patienten

In diesem Teil des Projektes sollten die *in vitro* erhobenen Befunde in der GEAC-Patientenkohorte verifiziert werden. Wir konnten im ersten und zweiten Teil des Projektes zeigen, dass Makrophagen den STAT3-Signalweg aktivieren und darüber unter anderem zum Teil die Lapatinib-Resistenz vermitteln. Diese *in vitro* erhobenen Befunde sollen nun mit Hilfe des GEAC-TMA verifiziert werden. Hierfür wurden die Makrophagenmarker CD68 und CD163 sowie STAT3 und p-STAT3 immunhistochemisch gefärbt. Die Auswertung der Makrophagen erfolgte wie bereits im ersten Kapitel beschrieben. Die Analyse der STAT3- und p-STAT3-Färbung erfolgte, analog zur Ki67-Färbung, durch das Zählen p-STAT3- und STAT3-positiver Zellen. Die Phosphorylierung des STAT3-Proteins führt zu einer Dimerisierung mit anschließender Translokation in den Zellkern. Aus diesem Grund wurden nur Tumorzellen gezählt, die eine nukleare STAT3-Färbung zeigten. Dieser wurde dann als prozentualer Anteil ausgedrückt (**Abb. 50A**). Die Menge der CD68- oder CD163-positiven Makrophagen wurde anschließend mit der Menge an p-STAT3-positiven und nukleären STAT3-positiven Tumorzellen korreliert. Hierfür konnten die CD68- und CD163-Färbungen von 178 bzw. 158 Patienten für die Analyse berücksichtigt werden. Initial erfolgte die Spearman-Korrelationsanalyse der CD68-positiven Makrophagen mit den p-STAT3-positiven Tumorzellen. Hierfür konnten die Färbungen von 178 Patienten für die Analyse berücksichtigt werden. Dabei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen CD68 und p-STAT3 ($r = 0,3643$, $p < 0,0001$) (**Abb. 50B**). Dabei wiesen insbesondere die Gewebe, die durch eine starke Infiltration mit CD68-positiven Makrophagen charakterisiert waren, eine signifikant höhere Anzahl an p-STAT3-positiven Tumorzellen auf (CD68 schwach: 70 (95% KI 65 - 98) vs. CD68 stark: 125 (95% KI 117 - 137) $p < 0,0001$) (**Abb. 50C**). Zusätzlich stellte sich eine eindeutig positive Korrelation für CD68 und nukleares STAT3 dar ($r = 0,2917$, $p = 0,0006$) (**Abb. 50 B**). Auch hier zeigte sich, dass vor allem die Gewebe mit einer hohen Anzahl an CD68-positiven Makrophagen vermehrt Tumorzellen mit positiver nuklearer STAT3-Färbung aufwiesen (CD68 schwach: 62 (95% KI 45 - 66) vs. CD68 stark: 76 (95% KI 64 - 73) $p = 0,0322$) (**Abb. 50 C**). Die Korrelationsanalyse für CD163 zeigte vergleichbare, aber weniger stark ausgeprägte Befunde. Dabei zeigte sich eine positiv signifikante Korrelation für CD163 und p-STAT3 ($r = 0,2186$, $p = 0,0066$), aber nicht für CD163 und nukleares STAT3 ($r = 0,168$, $p = 0,0599$) (**Abb. 50 A,B**). Auch die Analyse der Anzahl an p-STAT3- oder nukleären STAT3-positiven Tumorzellen in Tumoren mit starker oder schwacher Infiltration von CD163-positiven Makrophagen wies keine relevanten Unterschiede auf (**Abb. 50C**).

Insgesamt konnten die Korrelationsanalysen die Annahme, dass Makrophagen den STAT3-Signalweg in den Tumorzellen aktivieren, unterstützen.

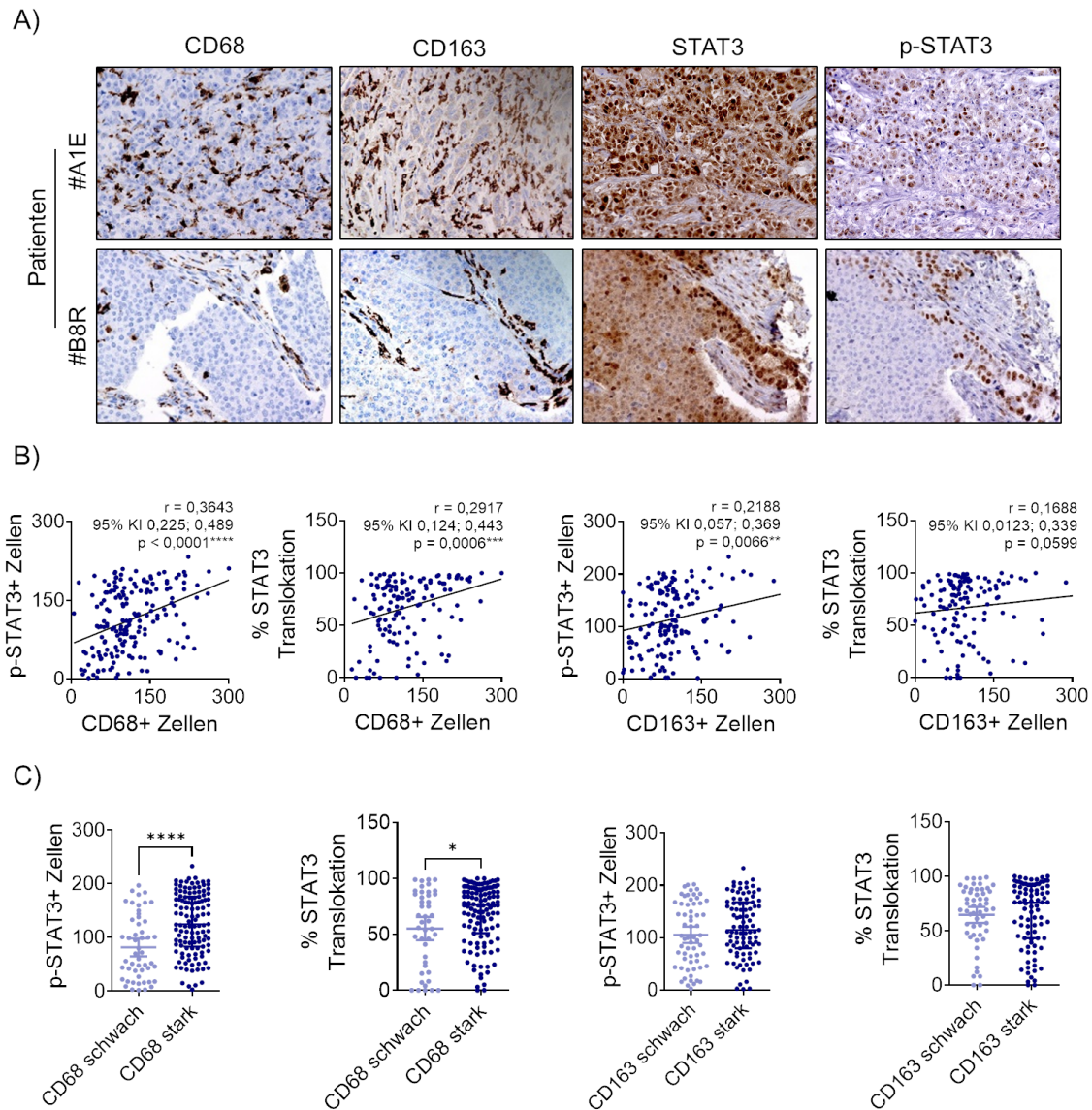


Abbildung 50: A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von CD68, CD163, STAT3 und p-STAT3 in zwei repräsentativen Patienten. **B)** Korrelationsanalyse der CD68-, CD163-positiven Makrophagen mit der Anzahl p-STAT3-positiver Tumorzellen sowie dem prozentualen Anteil STAT3 positiver Zellkerne (% STAT3-Translokation). Korrelationskoeffizient und statistische Signifikanz wurden bei nicht normalverteilten Daten mittels Spearman-Korrelation (Rangkorrelation) bestimmt. **C)** Quantifizierung der p-STAT3-positiven Tumorzellen sowie des prozentualen Anteils STAT3 positiver Zellkerne in Patienten mit schwacher bzw. starker CD68-, CD163-Infiltration. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Bestimmung der statistischen Signifikanz und des p-Werts durch den Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.)

4.5.2 p-STAT3/STAT3 Level korrelieren mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen

Als Nächstes erfolgten die Analysen der p-STAT3- und STAT3-Level hinsichtlich verschiedener klinischer Prognoseparameter. Initial wurden Gewebeslots, die aufgrund des Fehlens größerer Gewebeanteile oder verminderter Färbequalität nicht auswertbar waren, von der Analyse ausgeschlossen. So konnten insgesamt 126 Patienten für p-STAT3 und 113 Patienten für nukleares STAT3 untersucht werden. Die mediane Anzahl p-STAT3-positiver Zellen betrug 111, die niedrigste 2 und die höchste Anzahl detektierbarer p-STAT3-positiver Tumorzellen betrug 233. Ab einer Anzahl von ≥ 150 positiven Zellen wurde die Färbung als stark kategorisiert. Eine darunter liegende Anzahl als schwach eingestuft. Daraus resultiert, dass 66 (34 %) Patienten eine starke und 129 (66 %) eine schwache p-STAT3-Färbung aufwiesen (**Abb. 51 A,B**). Der mediane prozentuale Anteil der positiven nuklearen STAT3-Färbung betrug 73 %, der höchste 100 % und der niedrigste 0 %. Sobald Gewebeslots 60 % positive nukleare STAT3-Tumorzellen aufwiesen, wurden diese als stark eingestuft und darunterliegend als schwach. So zeigten 113 Patienten (63 %) eine starke nukleare STAT3 und 67 Patienten (37 %) eine schwache nukleare STAT3-Färbung (**Abb. 51C,D**). Mit Hilfe dieser Einteilung wurden anschließend mittels Chi-Quadrat-Test Assoziationen zu klinischen Prognoseparametern untersucht. Zunächst zeigte sich keine Korrelation der p-STAT3- oder nuklearen STAT3-Färbung mit dem Alter oder dem Geschlecht der Patienten.

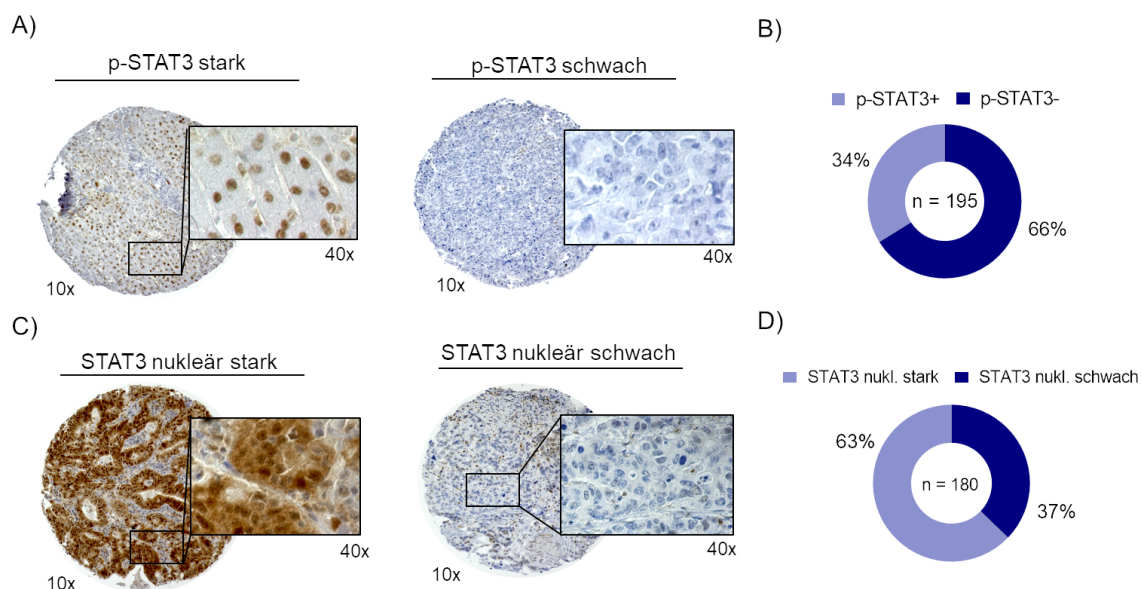


Abbildung 51: Immunhistologische Untersuchung des Tissue Microarray: Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung von **A**) p-STAT3, **C**) nukleares STAT3. Exemplarisch ist für jeden Marker eine als stark und eine schwach kategorisierte Färbung dargestellt. Die Aufnahmen wurden in 100x und 400x Vergrößerung aufgenommen. Prozentuale Verteilung der Patienten mit starker und schwacher Färbung von **B**) p-STAT3 **D**) nukleares STAT3

Ferner zeigte sich keine statistische Assoziation zwischen den p-STAT3- und nukleares STAT3-Level und dem Tumorstadium, dem UICC-Stadium, dem Auftreten von Fernmetastasen, dem Grading sowie dem Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand. Allerdings korrelierte das Auftreten von Lymphknotenmetastasen mit der Anzahl an p-STAT3-positiven Tumorzellen ($\chi^2 = 10,32$; $p = 0,0161$) und mit der Häufigkeit der nuklearen STAT3-Translokation. Hier zeigte sich zum Beispiel, dass 2,1 mal mehr Patienten mit einer ausgedehnten Lymphknotenmetastasierung pN3 einen hohen Anteil an nuklearem STAT3 aufwiesen ($\chi^2 = 8,281$; $p = 0,0405$) (**Tab. 4.7**). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass GEAC-Patienten mit einer starken p-STAT3- und nuklearen STAT3-Färbung häufiger Lymphknotenmetastasen aufweisen.

Tabelle 4.7: Korrelationsanalyse mit Chi-Quadrat Test von p-STAT3 und nuklearen STAT3 mit klinisch-pathologischen Parametern

		p-STAT3					STAT3 Translokation [%]				
		n	≥ 150	< 150	Mittelwert	Median	n	≥ 60	< 60	Mittelwert	Median
Alle		195	66	129	112	111	180	113	67	63.9	73
Alter	> 60	126	41	85	0,2715	0,6024	116	75	41	0,4921	0,483
	< 60	69	25	44			64	38	26		
Geschlecht	männlich	163	59	104	2,45	0,1175	150	95	55	0,1189	0,7303
	weiblich	32	7	25			30	18	12		
Tumorstadium	pT1a	6	1	5	1,925	0,9969	4	2	2	1,892	0,8639
	pT1b	27	11	16			29	20	9		
	pT2	18	6	12			18	11	7		
	pT3	127	44	83			116	73	43		
	pT4a	9	2	7			8	5	3		
	pT4b	3	1	2			3	1	2		
	pN0	51	21	30			46	35	11		
Lymphknoten- metastasen	pN1	40	8	32	10,32	0,0161*	37	19	18	8,281	0,0405*
	pN2	43	10	33			43	23	20		
	pN3	52	24	28			47	32	15		
	pN4	1	0	1			1	0	1		
UICC Stadium	IA	29	12	17	11,07	0,1357	26	18	8	12,63	0,0815
	IB	6	1	5			5	3	2		
	IIA	19	9	10			17	15	2		
	IIB	7	3	4			8	3	5		
	IIIA	37	6	31			36	20	16		
	IIIB	29	8	21			28	14	14		
	IIIC	43	19	24			36	27	9		
	IV	22	7	15			22	13	9		
Fernmetastasen	M0	170	57	113	0,0594	0,8074	156	99	57	0,008	0,9275
	M1	25	9	16			24	15	9		
Grading	G1	9	2	7	1,39	0,7079	5	3	2	0,6937	0,8747
	G2	68	22	46			66	41	25		
	G3	108	38	70			101	65	36		
	G4	6	3	3			5	4	1		
Resektionsrand	R0	140	43	97	2,276	0,1314	128	83	45	0,2599	0,6102
	R1	52	22	30			51	31	20		

χ^2 -Wert, p-Wert

4.5.3 Das mediane Gesamtüberleben der GEAC-Patienten korreliert nicht mit der STAT3 Aktivierung

Die STAT3-Phosphorylierung und STAT3-Translokation als Ausdruck der Aktivierung korrelierte signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Ob diese auch Einfluss auf das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten hat, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden. Auch hier war der Beobachtungszeitraum wie oben beschrieben 143 Monate und Patienten, die 30 Tage nach der Operation verstorben sind, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Für die Log-Rank-Überlebenszeitanalyse der p-STAT3-Färbung konnten 195 Patienten eingeschlossen werden. Insgesamt stellte sich kein signifikanter Unterschied des medianen Gesamtüberlebens der Patienten mit starker oder schwacher p-STAT3-Färbung dar. Allerdings zeigte sich ein Trend zu einem verkürzten medianen Gesamtüberleben bei starker p-STAT3-Färbung, insbesondere in der frühen Beobachtungsphase. Hier zeigte sich eine 1-JÜLR von 48,4 % für Patienten mit starker p-STAT3-Färbung und eine 1-JÜLR von 65,2 % für Patienten mit schwacher p-STAT3-Färbung (**Abb. 52 A,B**).

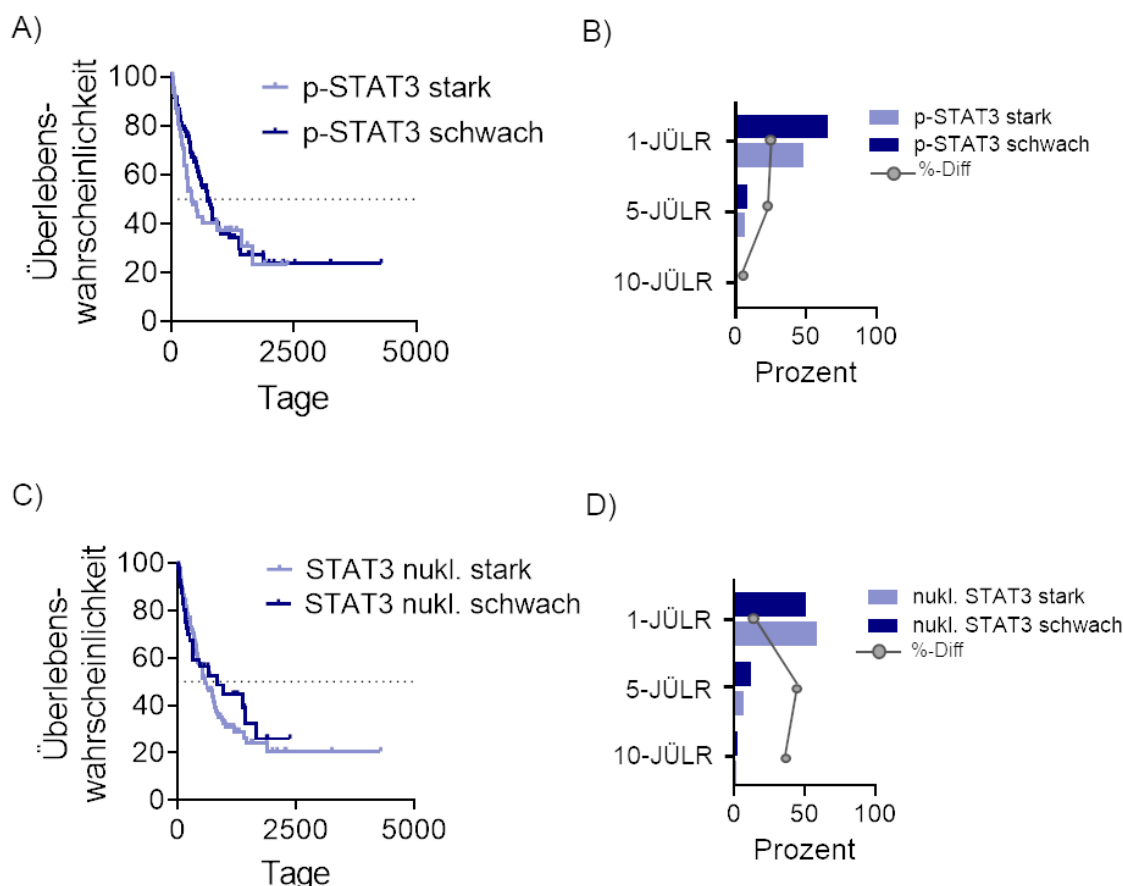


Abbildung 52: Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von **A)** p-STAT3 und **C)** nukl. STAT3. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Darstellung der 1-5- und 10 Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz von **B)** p-STAT und **D)** nukl. STAT3

Dabei ist das mediane Gesamtüberleben von 14 Monaten für Patienten mit starker p-STAT3-Färbung deutlich geringer und das Sterberisiko mit 24,7 % deutlich höher als bei Patienten mit schwacher p-STAT3-Intensität (p-STAT3 stark: 14 Monate vs. p-STAT3 schwach: 25 Monate), (p-STAT3 stark: 1,25 (95 % KI 0,822 - 1,891), $p = 0,2788$) (**Tab. 4.8**). Vergleichbare Beobachtungen konnten für die nukleare STAT3-Färbung gemacht werden. Zunächst stellte sich auch hier kein signifikanter Zusammenhang der STAT3-Translokation mit dem Gesamtüberleben der GEAC-Patienten dar. Jedoch zeigte die Log-Rank-Analyse eine tendenziell niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einer starken STAT3-Translokation im Vergleich zu Patienten mit niedriger STAT3-Translokation. Das spiegelte sich vor allem in der 5-JÜLR wieder. Hier war die Anzahl überlebender Patienten mit starker STAT3-Translokation 45,8 % niedriger als mit schwacher STAT3-Translokation und das mediane Gesamtüberleben 9 Monate kürzer (nukl. STAT3 stark: 19 Monate vs. nukl. STAT3 schwach: 28 Monate) (**Abb. 52 C,D**). Gleichzeitig wiesen die Patienten mit starker STAT3-Translokation ein 12,8 % höheres, aber nicht signifikantes Sterberisiko auf als Patienten mit schwacher STAT3-Translokation (**Tab. 4.8**).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Analyse des GEAC-TMA gezeigt hat, dass die Menge der Makrophagen mit der STAT3-Aktivierung zusammenhängt und eine erhöhte Aktivierung mit dem Auftreten von Lymphknoten assoziiert ist. Allerdings konnte kein signifikanter Nachweis erbracht werden, dass die STAT3-Aktivierung einen Einfluss auf das Gesamtüberleben von GEAC-Patienten hat.

Tabelle 4.8: Log-Rank (Mantel-Cox) Überlebenszeitanalyse des Tissue Microarray der Marker p-STAT3 und nukleares STAT3

	HR	95% Konfidenzintervall		P-Wert	Medianes Überleben	5 Jahres Überlebensrate
		unteres	oberes			
p-STAT3 stark	1,247	0,8219	1,891	0,2788	14 Monate	6,3%
p-STAT3 schwach	0,802	0,5287	1,217		25 Monate	8,3%
nukl. STAT3 stark	1,128	0,7194	1,769	0,6088	19 Monate	6,6 %
nukl. STAT3 schwach	0,8865	0,5652	1,390		28 Monate	12,2 %

4.6 Charakterisierung der PDGF-AA/PDGFR α Signaltransduktion in GEAC-Patienten

4.6.1 Barrett-Ösophagus und GEAC-Patienten zeigen eine erhöhte Expression von PDGFA und PDGFRA

Dieser Teil der Arbeit ging der Frage nach, ob die *in vitro* erhobenen Befunde der Makrophagen vermittelten Proliferation über die Freisetzung von PDGF-AA mit Aktivierung des PDGFR α auch eine klinische Relevanz hat. Hierfür wurde initial der Datensatz des cDNA Microarray GSE13898 genutzt, um die Expression von *PDGFA* und *PDGFRA* in NT, BAR und EAC Gewebe zu untersuchen. Hier zeigte sich für *PDGFA* eine signifikant höhere Expression in BAR und EAC Gewebe im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe NT. Dabei betrug der mediane Genexpressionswert für die BAR Patienten $0,465 \pm 0,327$ und für die gesunden Kontrollpatienten $0,182 \pm 0,362$. Folglich stellte sich die *PDGFA* Expression im Barrett-Gewebe 2,5 mal höher dar, als im gesunden nicht neoplastischen Gewebe (NT: $0,181 \pm 0,216$ vs. BAR: $0,465 \pm 0,096$, $p < 0,001$). Ferner zeigte sich auch eine 2,1 mal höhere *PDGFA* Expression im EAC Gewebe im Vergleich zum NT Gewebe. Hier stellte sich im EAC Gewebe ein medianer Genexpressionswert von $0,374 \pm 0,292$ dar (NT: $0,181 \pm 0,216$ vs. EAC: $0,374 \pm 0,292$, $p < 0,001$). Ein relevanter Unterschied der *PDGFA* Genexpression zwischen EAC und NT-Gewebe zeigte sich nicht (**Abb. 53 A**).

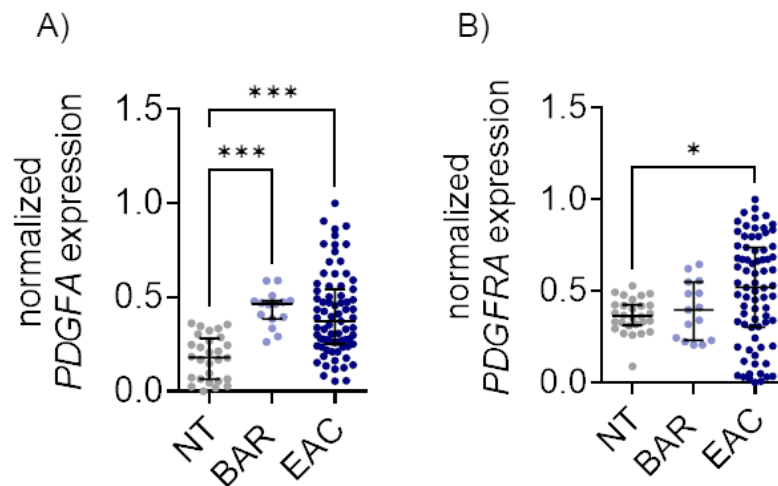


Abbildung 53: Untersuchung der Genexpression des cDNA Microarrays GSE13898. Die normalisierten Expressionswerte der Gene *PDGFA* (A), *PDGFRA* (B) von 28 Patienten mit nicht-neoplastischen Kontrollgewebe (NT), 15 Patienten mit einer Barrett-Vorläuferläsion (BAR) und 64 Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) wurden aus dem Array extrahiert und als mediane Expressionswerte mit dem 25 % - 75 % interquartilen Abstand dargestellt. Der Kruskal-Wallis One-Way ANOVA Test wurde für die statistische Analyse verwendet. Mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparisons Test wurden die adjustierten P-Werte berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Als Nächstes wurde die *PDGFRA*-Expression untersucht. Hier stellten sich zunächst keine Unterschiede zwischen dem NT- und dem BAR-Gewebe dar. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede in der *PDGFRA*-Genexpression im BAR- und EAC-Gewebe. Allerdings konnte im Vergleich mit dem NT-Gewebe eine um 41,7 % signifikant höhere *PDGFRA*-Expression im EAC-Gewebe detektiert werden. Auch hier stellten sich keine Unterschiede in der Genexpression des *PDGFRA* im BAR- und EAC-Gewebe dar (NT: $0,364 \pm 0,112$ vs. EAC: $0,519 \pm 0,437$, $p < 0,0394$) (**Abb. 53 B**). Folglich konnten erste Expressionsanalysen demonstrieren, dass relevant höhere Mengen von *PDGFA* und des korrespondierenden Rezeptors *PDGFRA* im Tumorgewebe und auch in der präkanzerösen Vorläuferläsion exprimiert werden.

4.6.2 CD68+ Makrophagen exprimieren PDGFA und Expression korreliert mit makrophagen-assoziierten Genen in GEAC-Patienten

Aus den Sekretom-Analysen ging hervor, dass PDGF-AA in hohen Konzentrationen in das Zellkultur-Medium sekretiert wurde. Aus den ersten Genexpressionsuntersuchungen konnten die THP-1-Makrophagen als vermutliche Quelle abgeleitet werden. Auch die cDNA-Array-Analysen zeigten eine höhere *PDGFA*-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Kontrollgewebe. Nun stellte sich die Frage, ob die Makrophagen auch im Patientengewebe die Quelle des freigesetzten PDGF-AA sind. Hierfür wurden zunächst mit Daten aus dem cDNA-Microarray GSE13898 Korrelationsanalysen für *CD68* und *CD163* mit *PDGFA* durchgeführt. Dabei zeigte die Genexpression von *CD68* eine signifikant positive Korrelation zu *PDGFA* ($r = 0,3985$, $p = 0,0004$) (**Abb. 54A**).

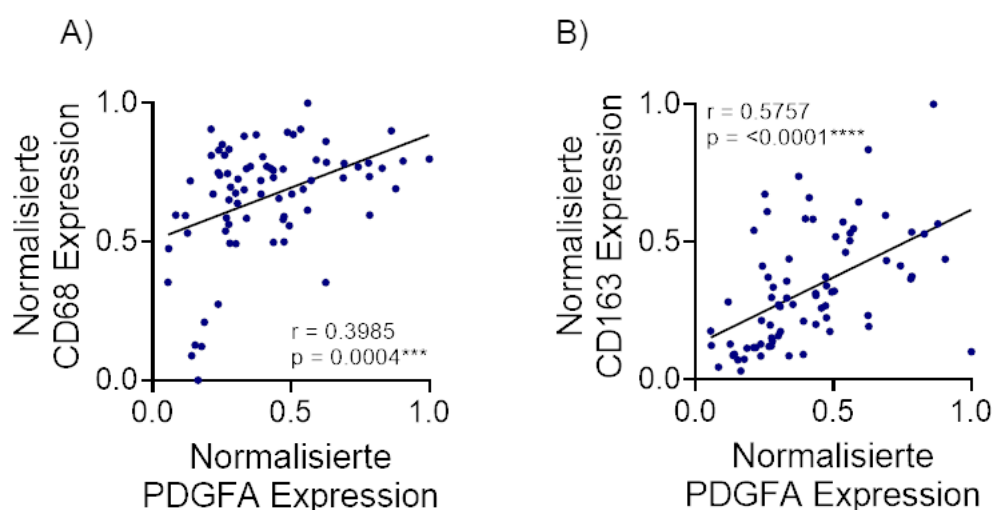
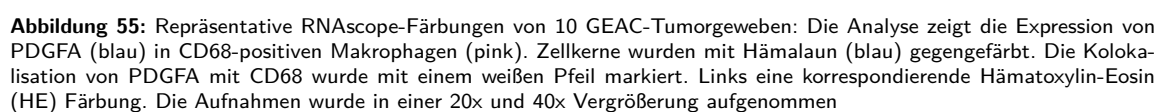


Abbildung 54: Korrelationsanalyse der normalisierten Expressionswerte der Gene **A)** *CD68* und **B)** *CD163* mit *PDGFA*. Für die Analyse wurden die Daten von 64 EAC Patienten des cDNA Microarrays GSE13898 verwendet. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelationsanalyse. Ein Korrelationskoeffizient $r > 0$ wurde dabei als positive Assoziation gewertet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$



Aufgrund fehlender Verfügbarkeit einer *CD163*-Sonde konnte keine RNA-Scope-Analyse mit *CD163* durchgeführt werden. Zunächst konnten in allen Proben *CD68* und *PDGFA* nachgewiesen werden. *CD68* wurde sowohl intratumoral als auch im peritumoralen Stroma detektiert. Dabei konnten wiederkehrend vereinzelt Bereiche beobachtet werden, die durch eine sehr starke *CD68*-Expression gekennzeichnet waren. Eine Expression in den Tumorzellen konnte nicht beobachtet werden. Die Expression von *PDGFA* zeigte sich ebenfalls intratumoral sowie peritumoral. Hier konnten allerdings auch tubuläre Tumorstrukturen detektiert werden, die eine sehr hohe Expression von *PDGFA* aufwiesen. In allen Proben konnte eine kolokalisierte Expression von *CD68* und *PDGFA* nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich in den meisten Fällen, dass die intratumoralen *CD68*-positiven Bereiche nahezu immer eine Koexpression von *PDGFA* aufwiesen. Demgegenüber gab es auch sehr viele Bereiche, in denen vor allem Tumorzellen eine alleinige *PDGFA*-Expression aufwiesen. Darüber hinaus konnte auch *CD68* negatives Stroma mit *PDGFA*-Expression detektiert werden (**Abb. 55**).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass sowohl *PDGFA* als auch *PDGFRA* in GEAC-Patienten exprimiert werden und dass die *PDGFA*-Expression positiv mit den Makrophagenmarkern *CD68* und *CD163* korreliert. Darüber hinaus konnten wir im GEAC-Tumorgewebe *CD68*-positive Makrophagen nachweisen, die *PDGFA* exprimieren. Eine *PDGFA*-Expression war jedoch ebenso in Tumor- wie in weiteren Stromazellpopulationen nachweisbar.

4.6.3 PDGFR α Aktivierung korreliert mit der Menge an CD163+ Makrophagen

PDGF-AA bindet und aktiviert hochselektiv den PDGFR α . Durch die Neutralisierung von PDGF-AA und durch die genetische und pharmakologische Manipulation des PDGFR α konnte die Makrophagen vermittelte Proliferation und Lapatinib-Resistenz in vitro aufgehoben werden. Darüber hinaus konnten wir in GEAC-Gewebe eine kolokalisierte Expression von *PDGFA* und *CD68* nachweisen. Als nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Menge an intratumoralen Makrophagen mit der Aktivierung des PDGFR α zusammenhängt. Hierzu führten wir immunhistochemische Färbungen für p-PDGFR α , *CD163* und *CD68* auf einem GEAC-TMA durch. Dabei konnten für *CD68* 64 und für *CD163* 109 Gewebespots untersucht werden. Anschließend verglichen wir die Anzahl *CD68*- und *CD163*-positiver Makrophagen in Tumoren mit starker und schwacher membranöser PDGFR α -Phosphorylierung. In GEAC-Tumoren mit starker membranöser PDGFR α -Phosphorylierung konnten insgesamt mehr Makrophagen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich tendenziell mehr *CD68*-positive Makrophagen in GEAC-Tumoren mit starker membranöser PDGFR α Aktivierung (membr. p-PDGFR α schwach: 95 ± 92 vs. membr. p-PDGFR α stark: 110 ± 80 , $p = 0,2935$) (**Abb. 56B**). Ein vergleichbarer Befund konnte für *CD163* erhoben werden. Während GEAC-Tumoren mit schwacher membra-

nöser PDGFR α Phosphorylierung im Median 78 CD163-positive Makrophagen aufwiesen, zeigten GEAC-Tumoren mit starker membranöser PDGFR α -Phosphorylierung 93 CD163-positive Makrophagen (membr. p-PDGFR α schwach: 78 ± 65 vs. membr. p-PDGFR α stark: 93 ± 63 , $p = 0,0558$) (**Abb. 56C**). Durch Überlagerung der immunhistochemischen Färbungen ließ sich insbesondere in Bereichen mit starker membranöser p-PDGFR α -Signalausprägung eine räumliche Assoziation zu CD163-positiven Makrophagen erkennen (**Abb. 56A**).

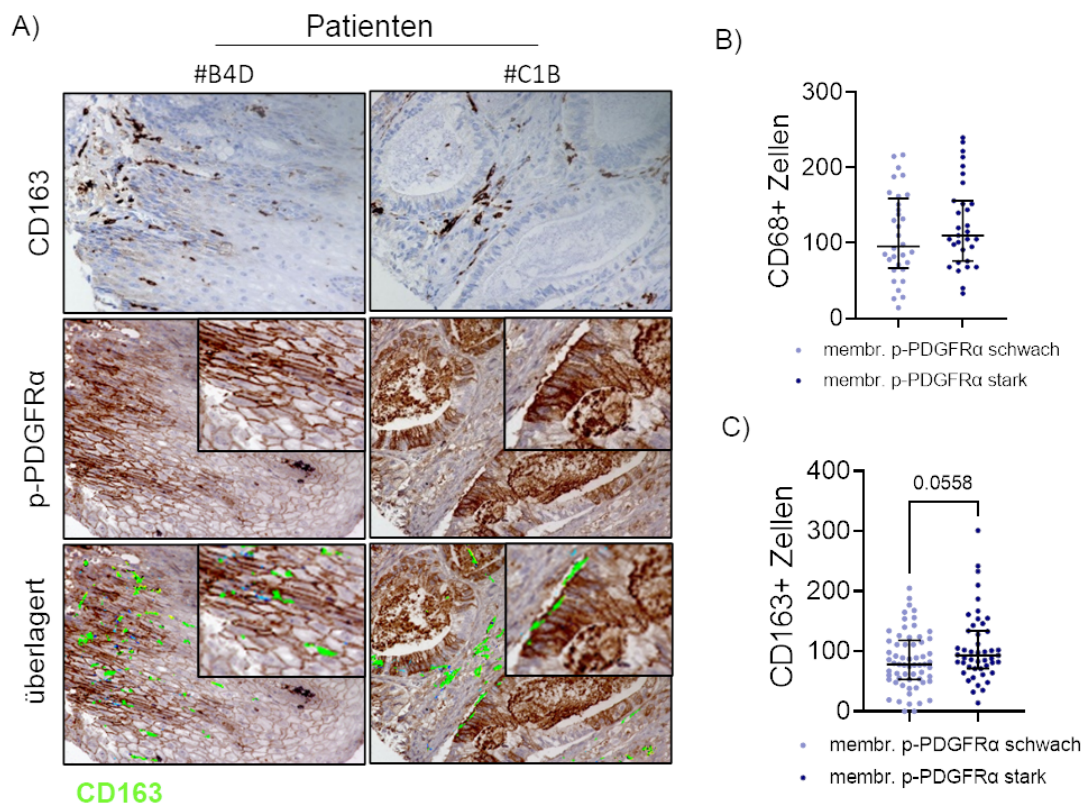


Abbildung 56: A) Repräsentative Bilder einer immunhistochemischen Färbung von CD163 und PDGFR α von zwei GEAC-Patienten. Nach Überlagerung der Bilder sind die CD163-positiven Makrophagen in grün dargestellt. Die Aufnahme erfolgte in 20x und 40x Vergrößerung und die Zellkerne wurde mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Quantitative Auswertung der Anzahl CD68-positiver A) und CD163-positiver B) Makrophagen in GEAC-Tumoren. Für CD68 konnten 64 und für CD163 109 Gewebesots untersucht werden. Ergebnisse wurden als mediane Makrophagenanzahl und interquartiler Abstand dargestellt. Für die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Mittels Fischer-Exakt-Test konnten die Befunde noch weiter verifiziert werden. Obwohl für CD68 kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Aktivierung des p-PDGFR α beobachtet werden konnte, so zeigte sich für CD163 eine signifikante Assoziation zu einer starken membranösen p-PDGFR α Färbung ($\chi^2 = 5,221$; $p = 0,0223$) (**Tab. 4.9**).

Insgesamt konnte demonstriert werden, dass GEAC-Tumore mit Nachweis einer -starken PDGFR α Aktivierung im Trend mehr tumorinfiltrierende CD163-positive Makrophagen aufweisen. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass in Arealen mit starker PDGFR α -Aktivierung eine auffällige räumliche Häufung von CD163-positiven Makrophagen zu finden war, was auf eine mögliche Interaktion hindeuten könnte.

Tabelle 4.9: Korrelationsanalyse mit Fischer-Exakt Test von CD68 und CD163 positiven Makrophagen und starker und schwacher membranöser PDGFR α Phosphorylierung

		membr. p-PDGFR α			χ^2 -Wert	p-Wert
		n	stark	schwach		
CD68	schwach	19	8	11	0,4338	0,5101
	stark	45	23	22		
CD163	schwach	46	14	32	5,221	0,0223*
	stark	63	33	30		

4.6.4 Membranöse PDGFR α Aktivierung ist mit einer Krankheitsprogression und einem schlechten Gesamtüberleben von GEAC-Patienten assoziiert

In **Kapitel 4.4.4** wurde bereits gezeigt, dass in GEAC-Tumoren eine Aktivierung von PDGFR α nachweisbar ist. Auch *in vitro* konnte demonstriert werden, dass die Freisetzung von PDGF-AA durch Makrophagen eine Aktivierung von PDGFR α sowie der nachgeschalteten Signalwege AKT, ERK und STAT3 in GEAC-Zellen induziert. Diese Signalkaskade führte zu einer gesteigerten Proliferation und einer erhöhten Resistenz gegenüber Lapatinib. In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die PDGFR α -Aktivierung auch einen Einfluss auf klinisch-pathologische Parameter sowie auf das Gesamtüberleben von GEAC-Patienten hat. Folglich wurde mittels Chi-Quadrat-Test untersucht, ob die PDGFR α -Phosphorylierung mit einer Krankheitsprogression assoziiert ist. Hierfür wurde die Aktivierung des PDGFR α in unterschiedliche Kategorien eingeteilt und miteinander verglichen. Auch hier galt, dass Gewebespots, die durch das Fehlen größerer Gewebeanteile oder verminderte Färbequalität nicht auswertbar waren, von der Analyse ausgeschlossen wurden. Zu Beginn erfolgte ein Vergleich zwischen GEAC-Patienten mit starker, unabhängig von der Lokalisation auftretender PDGFR α -Phosphorylierung (tum. p-PDGFR α) und Patienten ohne immunhistologisch nachweisbare tum. p-PDGFR α -Signale. Hierfür konnten Gewebespots von 174 Patienten untersucht werden, von denen 59 Patienten (34%) eine starke p-PDGFR α -Färbung und 116 Patienten (66 %) eine negative p-PDGFR α -Färbung aufwiesen (**Abb. 57A,B**). Für diese Kategorisierung der p-PDGFR α -Färbung konnte kein signifikanter Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern wie Al-

ter, Geschlecht, Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung, UICC-Stadium, Fernmetastasen, Grading und dem Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand beobachtet werden (**Tab. 4.10**). Da PDGFR α als Transmembranrezeptor seine Funktion primär an der Zellmembran entfaltet, wurden im nächsten Schritt ausschließlich GEAC-Tumoren analysiert, die eine klar membranöse Färbung des phosphorylierten PDGFR α (membr. p-PDGFR α) aufwiesen. Zur gezielten Beurteilung der Rezeptoraktivität wurden GEAC-Patienten mit starker membr. p-PDGFR α -Färbung mit solchen mit schwacher membranöser Färbung verglichen. Tumoren ohne nachweisbares p-PDGFR α -Signal wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für diese Analyse konnten Gewebesspots von 113 Patienten eingeschlossen werden, von denen 51 Patienten (45 %) eine starkes und 63 (55 %) ein schwaches membr. p-PDGFR α -Signal zeigten (**Abb. 57C,D**).

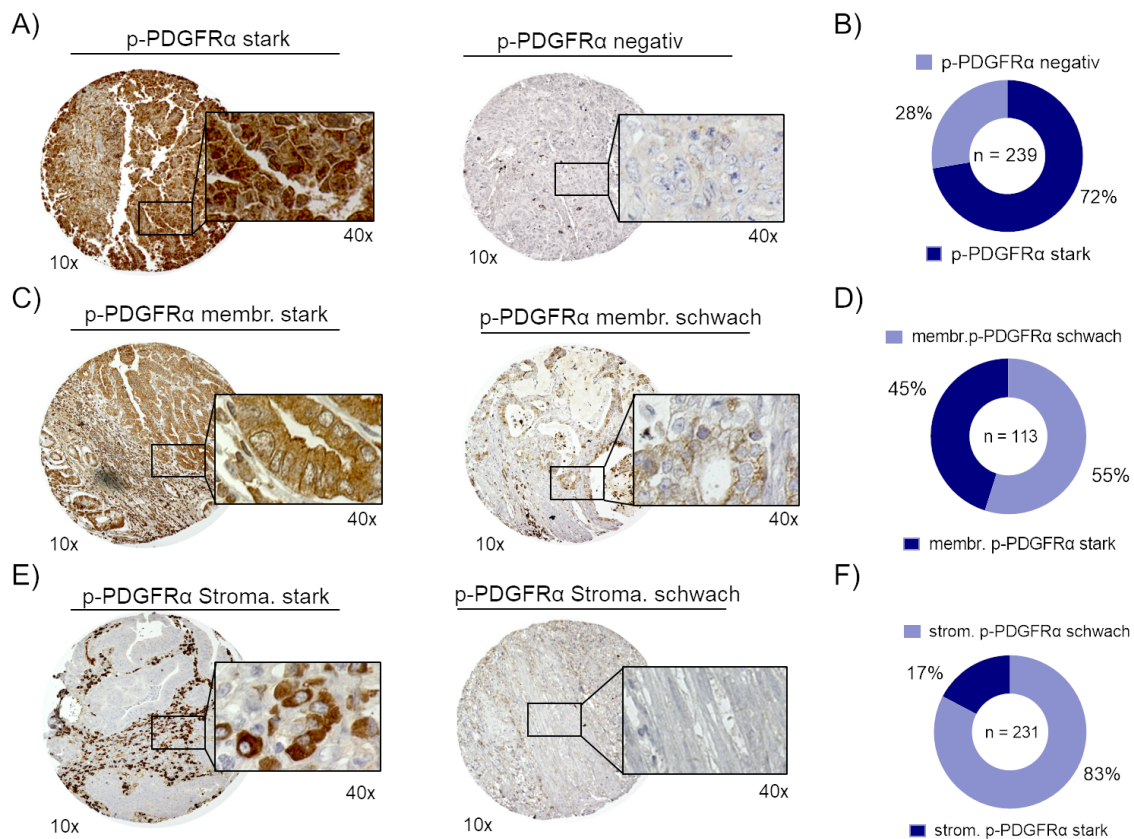


Abbildung 57: Immunhistologische Untersuchung des Tissue Microarray: Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung von **A)** tum. p-PDGFR α **C)** membr. p-PDGFR α und **E)** strom p-PDGFR α . Exemplarisch ist für jede p-PDGFR α Färbung eine als stark, eine als schwach und eine negativ kategorisierte Färbung dargestellt. Die Aufnahmen wurden in 10x und 40x Vergrößerung aufgenommen. Prozentuale Verteilung der Patienten mit starker und schwacher Färbung von **B)** tum. p-PDGFR α , **D)** membr. p-PDGFR α und **F)** strom. p-PDGFR α

Tabelle 4.10: Chi-Quadrat-Test zur Untersuchung der Zusammenhänge von tum. p-PDGFRα , membr. p-PDGFRα und strom. p-PDGFRα mit klinisch-pathologischen Parametern

	p-PDGFRα				membr. P-PDGFRα				strom. PDGFRα			
	n	stark	schwach	n	stark	schwach	n	stark	schwach	n	stark	schwach
Alle	174	59	116	113	51	63	191	88	103			
Alter												
> 60	116	42	74	77	42	35	120	57	63			
< 60	57	17	41	36	20	16	73	32	41	0.1453	0.6204	
Geschlecht												
männlich	147	147	99	99	41	58	163	77	86	0.2191	0.6397	
weiblich	26	10	16	13	10	3	26	11	15			
Tumorstadium												
pT1a	7	3	4	5	0	5	9	9	0			
pT1b	25	8	17	18	6	12	27	14	13			
pT2	16	3	13	9	2	7	21	9	12	14.6	0.0119*	
pT3	114	40	74	74	37	37	120	50	70			
pT4a	7	4	3	5	4	1	11	4	7			
pT4b	2	0	1	1	1	0	2	2	0			
Lymphknoten- metastasen												
pN0	47	16	31	34	11	23	50	25	25			
pN1	31	11	20	20	10	10	33	14	19	0.6881	0.876	
pN2	36	12	24	20	11	9	43	19	24			
pN3	50	17	33	35	17	18	58	25	33			
UICC Stadium												
IA	25	7	18	19	5	14	26	19	7			
IB	9	2	7	5	2	3	11	4	7			
IIA	17	7	10	11	5	6	17	5	12			
IIB	6	2	4	4	1	3	7	2	5	12.08	0.098	
IIIA	25	10	15	16	10	6	34	17	17			
IIIB	30	10	20	17	8	9	30	11	19			
IIIC	39	16	23	28	15	13	43	20	23			
IV	19	3	16	11	5	6	21	10	11			
Fernmetastasen												
M0	152	54	98	100	45	55	166	77	89	0.0227	0.8801	
M1	21	4	17	12	5	7	25	12	13			
Grading												
G1	12	2	10	8	0	8	10	8	2			
G2	60	17	43	42	18	24	65	30	35	6.406	0.0934	
G3	97	38	59	61	33	28	112	50	62			
G4	1	0	1	1	0	1	2	0	2			
Resektionsrand												
R0	124	39	85	82	36	46	139	66	73	0.1792	0.6721	
R1	46	18	28	30	15	15	50	22	28			

x² -Wert, p-Wert

Zunächst zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang der membr. p-PDGFR α -Färbung mit dem Geschlecht der GEAC-Patienten. So wiesen insbesondere Frauen eine starke membr. p-PDGFR α -Färbung auf ($\chi^2 = 5,842$; $p = 0,0192$). Ferner konnte eine signifikante Assoziation des membr. p-PDGFR α -Signals mit dem Tumorstadium erhoben werden ($\chi^2 = 11,42$; $p = 0,0436$). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass z.B. 5-fach häufiger GEAC-Patienten im pT4-Stadium eine starke membr. p-PDGFR α -Färbung aufwiesen. Zusätzlich stellte sich ein signifikanter Zusammengang zwischen der Differenzierung und der Stärke der membr. p-PDGFR α -Färbung ($\chi^2 = 9,449$; $p = 0,0239$). Eine Korrelation der membr. p-PDGFR α -Färbung mit dem Alter, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, dem UICC-Stadium, dem Auftreten von Fernmetastasen und den Verbleib von Tumorzellen am Resektionrand konnte nicht detektiert werden. Der PDGFR α wird neben den Tumorzellen auch von Zellen innerhalb des Stromas gebildet. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine starke p-PDGFR α -Färbung innerhalb des Tumorstromas ebenfalls einen Einfluss auf die Krankheitsprogression hat. Auch hierbei konnten signifikante Assoziationen beobachtet werden. So zeigte sich eine Korrelation zwischen der Intensität der p-PDGFR α -Färbung im Stroma und dem Tumorstadium ($\chi^2 = 14,6$; $p = 0,0119$). Auffällig war jedoch, dass GEAC-Patienten mit einem niedrigeren Tumorstadium eine stärkere p-PDGFR α -Färbung aufwiesen. Weitere Zusammenhänge konnten nicht detektiert werden (**Tab. 4.10**).

In einen nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der durch die Aktivierung des PDGFR α beobachtete Krankheitsprogress auch Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Auch wie in **Kapitel 4.1.4** bereits beschrieben betrug der Beobachtungszeitraum insgesamt 143 Monaten und Patienten die innerhalb eines Zeitraums von 30 Tagen nach Operation verstorben sind, wurde aus der Analyse ausgeschlossen. Zu Beginn wurde die Intensität der p-PDGFR α -Färbung, unabhängig von ihrer subzellulären Lokalisation, in die Kategorien p-PDGFR α -negativ, p-PDGFR α -schwach und p-PDGFR α -stark eingeteilt und im Hinblick auf das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten analysiert.

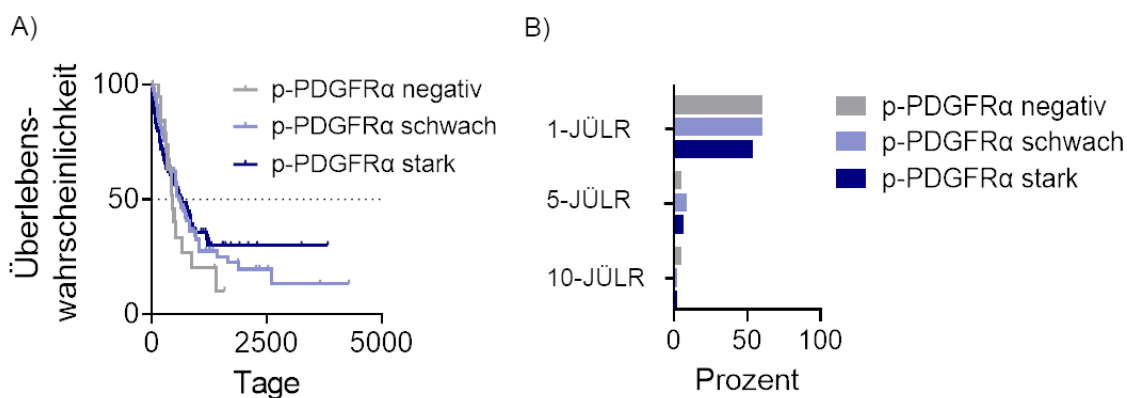


Abbildung 58: A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von p-PDGFR α . Kategorien die miteinander verglichen wurden sind: p-PDGFR α negativ, p-PDGFR α schwach, p-PDGFR α stark. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. B) Darstellung der 1-5- und 10-Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz (graue Linie) von p-PDGFR α .

In die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse mit Log-Rank-Test konnten insgesamt 239 Patienten eingeschlossen werden. In dieser Analyse zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der p-PDGFR α -Intensität und dem Gesamtüberleben. Allerdings wiesen Patienten mit negativer p-PDGFR α -Färbung ein tendenziell schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit positiver Färbung auf (**Abb. 58A**). Signifikante Unterschiede in der 1-, 5- und 10-JÜLR konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (**Abb. 58B**).

Die vorangegangene Chi-Quadrat-Test-Analyse zeigte, dass eine starke membranöse Phosphorylierung des PDGFR α deutlich mit einem Krankheitsprogress verbunden war. Aus diesem Grund wurde die Intensität der p-PDGFR α -Färbung zusätzlich unter Berücksichtigung ihrer subzellulären Lokalisation im Hinblick auf ihren Einfluss auf das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten untersucht.

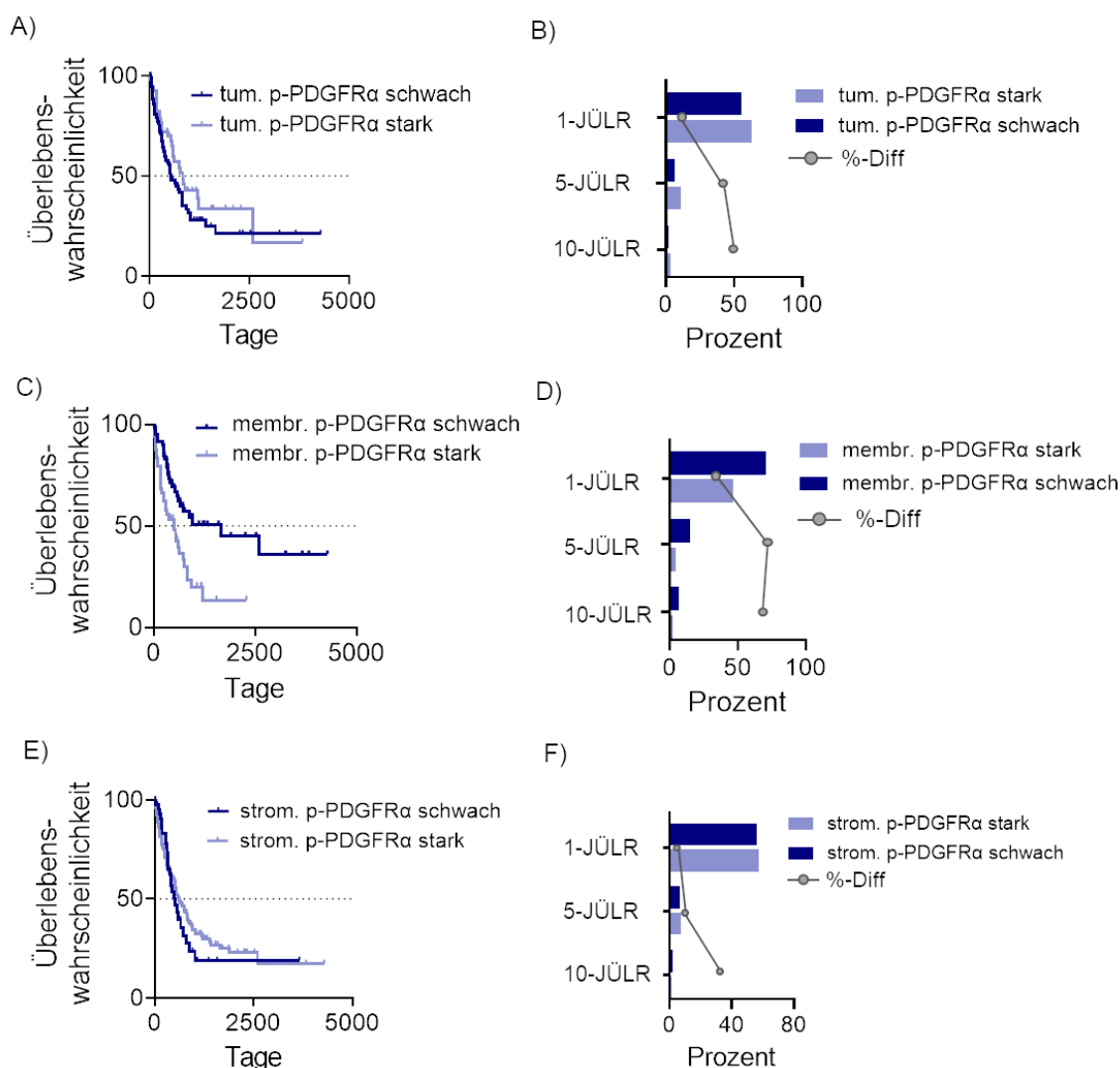


Abbildung 59: Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von **A)** tum. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach), **C)** membr. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach) sowie **E)** stroma. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach). Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet. Darstellung der 1-5- und 10 Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz von **B)** tum. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach), **D)** membr. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach) sowie **F)** stroma. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach)

Hierfür wurden die Kategorien tum. p-PDGFR α -Expression (stark und schwach), membr. p-PDGFR α -Expression (stark und schwach) sowie stroma. p-PDGFR α -Expression (stark und schwach) miteinander verglichen. Für die Analyse der tumoralen p-PDGFR α -Färbung konnten 173 GEAC-Patienten eingeschlossen werden. Insgesamt stellte sich signifikanter Unterschied des medianen Gesamtüberlebens der Patienten mit starker bzw. schwacher tum. p-PDGFR α -Expression dar. Mit 28 Monaten zeigte sich jedoch ein tendenziell längeres medianes Gesamtüberleben für GEAC-Patienten mit starker tum. p-PDGFR α -Färbung. Demgegenüber konnte jedoch ein deutlich signifikanter Einfluss der membranösen Färbintensität des p-PDGFR α auf das mediane Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Hier zeigte sich das Patienten, die eine starke membranöse PDGFR α -Phosphorylierung aufwiesen ein 128 % höheres Sterberisiko aufwiesen als Patienten mit schwacher membranöser PDGFR α -Phosphorylierung (membr. p-PDGFR α : HR = 1,57 (95% KI, 1,440 - 4,182), $p = 0,0026$). (**Abb. 59C**) (**Tab. 4.11**). Ferner betrugen die 1-, 5- und 10-Jahres-Überlebensraten für Patienten mit starker membranöser p-PDGFR α -Färbung 46,8 %, 4,3 % bzw. 2,1 %, während diese bei Patienten mit schwacher membranöser p-PDGFR α -Färbung 70,1 %, 14,8 % bzw. 6,5 % betrugen. Somit lebten nach fünf Jahren 3,4-mal mehr Patienten mit schwacher im Vergleich zu starker membranöser p-PDGFR α -Färbung (**Abb. 59D**). Davon abweichende Befunde konnten für stromale p-PDGFR α -Färbung erhoben werden. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Stärke der stromalen PDGFR α -Phosphorylierung und dem medianen Gesamtüberleben der GEAC-Patienten (**Abb. 59E,F**).

Tabelle 4.11: Log-rank (Mantel-Cox) Überlebenszeitanalyse des Tissue Microarray

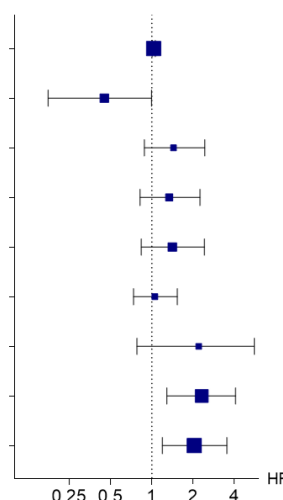
	HR	95% Konfidenzintervall		P-Wert	Medianes Überleben	5 Jahres Überlebensrate
		unteres	oberes			
tum. p-PDGFR α stark	0,7406	0,48	1,115	0,1636	28 Monate	11,1 %
tum. p-PDGFR α schwach	1,367	0,425	0,956		18 Monate	6,5 %
membr. p-PDGFR α stark	2,281	1,440	4,182	0,0026**	17 Monate	4,1%
membr. p-PDGFR α schwach	0,4075	0,2391	0,6945		55 Monate	8,4%
strom. p-PDGFR α stark	0,859	0,552	1,336	0,4772	20 Monate	7,1 %
strom. p-PDGFR α schwach	1,164	0,748	1,811		17 Monate	4.6%

Wie bereits in **Kapitel 4.1.4** beschrieben, wird das Gesamtüberleben insbesondere bei Krebserkrankungen durch eine Vielzahl unterschiedlicher klinischer, pathologischer und molekularer Einflussfaktoren bestimmt. Um zu testen, ob eine starke membranöse PDGFR α -Phosphorylierung als unabhängiger Risikofaktor das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten reduziert, wurde eine multivariate Cox-Regression durchgeführt. Hier stellten sich zunächst das Alter und der Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand als unabhängige, prognosebestimmende Einflussgrößen dar. Das Risiko der GEAC-Patienten, zu versterben, stieg pro Lebensjahr signifikant um 3 % (Alter: HR = 1,03 (95% KI, 1,005 - 1,059), $p = 0,0023$). Für Patienten, die eine R1-Resektion aufwiesen, war das Sterberisiko unabhängig anderer Einflussgrößen um das 2,31-fache höher im Vergleich zu Patienten mit R0-Resektion (Resektionsrand: HR = 2,31, (95% KI, 1,287 - 4,078), $p = 0,0042$). Letztlich konnte eine starke membranöse PDGFR α -Phosphorylierung als unabhängiger prognosebestimmender Parameter für ein erhöhtes Sterberisiko der GEAC-Patienten bestimmt werden. Dabei hatten Patienten mit starker membranöser p-PDGFR α -Färbung ein etwa verdoppeltes Mortalitätsrisiko, unabhängig von Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Grading und Metastasierung (membr. p-PDGFR α : HR = 2,04, (95% KI, 1,193 - 3,526), $p = 0,0096$) (**Tab. 4.12**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das von Makrophagen sekretierte PDGF-AA über die Aktivierung des PDGFR α /AKT/ERK-Signalwegs maßgeblich und unabhängig von anderen Einflussgrößen die Krankheitsprogression sowie das Gesamtüberleben beeinflusst.

Tabelle 4.12: Multivariate Analyse mittels Cox Regressionsmodell des Tissue Microarray

	HR	95% Konfidenzintervall		P-Wert
		unteres	oberes	
Alter	1,03	1,005	1,059	0,023*
Geschlecht (weiblich)	0,45	0,175	0,993	0,0656
Tumorstadium	1,44	0,881	2,434	0,1589
Lymphknotenmetastasen	1,34	0,820	2,243	0,2492
Grading	1,41	0,837	2,417	0,2033
UICC Stadium	1,05	0,734	1,533	0,7781
Fernmetastasen	2,20	0,779	5,597	0,1156
Resektionsrand	2,31	1,287	4,078	0,0042**
membr. p-PDGFRα	2,04	1,193	3,526	0,0096**



4.6.5 Erhöhte PDGF-AA Konzentration im Serum von GEAC-Patienten korrelieren mit Krankheitsprogression

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass PDGF-AA auch im Serum von Tumore-Patienten nachweisbar ist. Dabei zeigte sich in vielen Fällen ein enger Zusammenhang zwischen der Konzentration von PDGF-AA und der Krankheitsprogression. Aus diesem Grund führten wir Serumanalysen von PDGF-AA durch, um das Potenzial von PDGF-AA als prognostischen Marker für das GEAC zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Analyse wurden 56 GEAC-Patienten eingeschlossen. Die Serumproben wurden in einem Zeitraum von 2008 - 2011 am Universitätsklinikum gesammelt. Die Kontrollkohorte bestand aus 30 Adipositas-Patienten (WHO Grad III, BMI > 40), die vor bariatrischer Operation eine Ösophagogastroduodenoskopie erhalten haben, in der ein GEAC ausgeschlossen werden konnte. Das Geschlecht war für 55 Patienten bekannt und verteilte sich mit der überwiegenden Mehrheit von 46 (83,6 %) Patienten auf das männliche Geschlecht, während 9 (16,4 %) Patienten weiblich waren. Informationen über das Tumorstadium konnten für 54 Patienten erhoben werden und zeigte folgenden Verteilung: Das sehr frühe Tumorstadium pT1 wurde bei 13 (24,1 %) Patienten festgestellt. Ferner zeigten 4 (7,4 %) Patienten das Tumorstadium pT2. Mit 31 (57,4 %) Patienten verteilte sich die größte Mehrheit der Patienten auf das Tumorstadium pT3, während 6 (11,1 %) das fortgeschrittene Tumorstadium pT4 aufwiesen.

Tabelle 4.13: Charakterisierung der GEAC-Patientenkohorte der Serumproben

Anzahl: n (Absolut) n (Prozent)			
Alle		56	100.0
Geschlecht	n	55	100.0
	männlich	46	83.6
	weiblich	9	16.4
Tumorstadium	n	54	100.0
	T1	13	24.1
	T2	4	7.4
	T3	31	57.4
	T4	6	11.1
Lymphknoten-metastasen	n	55	100.0
	N0	18	32.7
	N1	15	27.3
	N2	14	25.5
	N3	8	14.5
Lymph-gefäßinvasion	n	53	100.0
	L0	14	26.4
	L1	39	73.6
Blut-gefäßinvasion	n	54	100.0
	V0	36	66.7
	V1	18	33.3

Anzahl: n (Absolut) n (Prozent)			
Grading	n	55	100.0
	G1	3	5.5
	G2	18	32.7
	G3	32	58.2
	G4	2	3.6
Resektionsrand	n	55	100.0
	R0	45	81.8
	R1	10	18.2
Neoadjuvante Therapie	n	45	100.0
	NTx 0	18	40.0
	NTx 1	27	60.0

Der Status der Lymphknotenmetastasierung konnte bei 55 Patienten erhoben werden und zeigte, dass bei 18 (32,7 %) Patienten keine Infiltration der Lymphknoten vorlag. Bei 67,3 % der Patienten wurde hingegen eine Lymphknotenmetastasierung festgestellt, die sich auf folgende Stadien verteilt: 15 (27,3 %) Patienten zeigen ein pN1, 14 (25,5 %) Patienten ein pN2 und 8 (14,5 %) Patienten ein pN3-Stadium. Für 53 Patienten konnten Informationen über die Lymphgefäßinvasion erhoben werden. Hier wurden 14 (26,4 %) identifiziert, die keine Lymphgefäßinvasion aufwiesen, während 39 (73,6 %) Patienten Tumorzellen im Lymphgefäßsystem zeigten. Zusätzlich wurde bei 64 Patienten der Status der Blutgefäßinvasion erhoben. Hier wurde bei 18 (33,3 %) Patienten eine Blutgefäßinvasion nachgewiesen. Ferner wurde bei 55 Patienten der Grad der Differenzierung des Tumors (Grading) erhoben. Dieser verteilte sich mit 3 (5,5 %) Patienten auf die G1-Differenzierung und mit 18 (32,7 %) Patienten auf die G2-Differenzierung. Tumore mit einer G3-Differenzierung wurden bei 32 (58,2 %) Patienten und Tumore mit einer G4-Differenzierung bei 2 (3,6 %) Patienten nachgewiesen. In dieser Patientenkohorte wurde darüber hinaus festgehalten, ob der Absetzungsrand des entnommenen Tumorgewebes frei von Tumorzellen (R0) oder ob dieser noch restliche Tumorzellen enthielt (R1). Für 55 Patienten waren Informationen über den Resektionsrand bekannt. Dieser war bei 45 Patienten frei von Tumorzellen (R0), jedoch zeigten 10 Patienten einen Absetzungsrand welcher Tumorzellen enthielt (R1). Abschließend wurden Informationen über die Neoadjuvante Therapie der Patienten erhoben. Während 27 (60 %) Patienten eine neoadjuvante Therapie erhalten haben, wurde diese bei 18 (40 %) der Patienten nicht durchgeführt (Tab. 4.11).

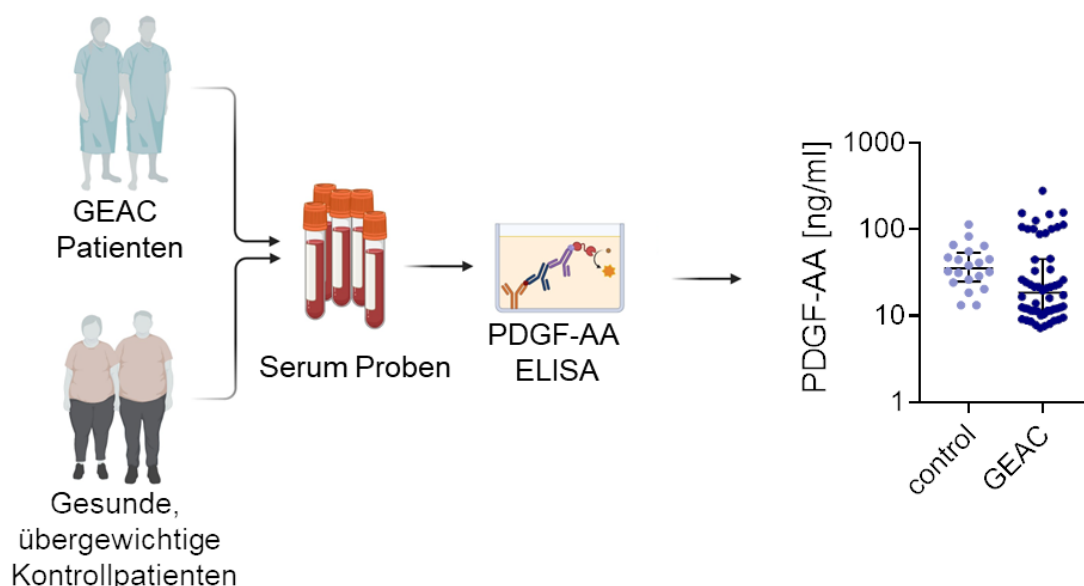


Abbildung 60: Schematische Darstellung des Patientenkollektivs sowie der Kontrollgruppe. Es wurden Serum-Proben von 56 GEAC-Patienten in die Analyse eingeschlossen. Die absolute Konzentration des PDGF-AA wurde mittels ELISA-Verfahren bestimmt. Das PDGF-AA wurde in ng/ml quantifiziert und logarithmisch dargestellt Median und Interquartilabstand dargestellt. Für die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test verwendet.

Insgesamt zeigte die Kontrollgruppe eine tendenziell höhere PDGF-AA-Serumkonzentration als die GEAC-Patienten. Dabei betrug der Median der PDGF-AA-Serumkonzentration 18,46 ng/ml in der GEAC-Gruppe und 35,43 ng/ml in der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der PDGF-AA-Serumkonzentration betrug 42,28 ng/ml in den GEAC-Patienten und 41,96 ng/ml in der Kontrollgruppe (Kontrolle: 41,96 ng/ml $\pm$ 24,99 ng/ml vs. GEAC: 42,67 ng/ml $\pm$ 53,87 ng/ml, $p = 0,9549$) (**Abb. 60**). Basierend auf dem Median der PDGF-AA-Konzentration wurden die GEAC-Patienten in eine Gruppe mit niedrigem PDGF-AA (< 18 ng/ml) und hohem PDGF-AA (≥ 18 ng/ml) eingeteilt. Die niedrigste PDGF-AA-Serumkonzentration wurde mit 7,28 ng/ml gemessen und die höchste PDGF-AA-Serumkonzentration betrug 279,52 ng/ml.

Tabelle 4.14: Analyse der Assoziation zwischen der Hohe des Serums-PDGF-AA und den klinisch-pathologisch Parametern im GEAC

		PDGF-AA Serum				
		n	stark	schwach	χ^2 -Wert	p-Wert
Alle		56	46	10		
Geschlecht	männlich	46	40	6	2,264	0,5630
	weiblich	9	6	3		
Tumorstadium	T1	13	5	8	7,972	0,0466*
	T2	4	0	4		
	T3	31	20	11		
	T4	6	2	4		
Lymphknoten-metastasen	N0	18	8	10	3,415	0,3320
	N1	15	8	7		
	N2	14	5	9		
	N3	8	6	2		
Lymph-gefäßinvasion	L0	14	5	9	1,355	0,2444
	L1	39	21	18		
Blut-gefäßinvasion	V0	37	17	20	0,4474	0,5036
	V1	18	10	8		
Grading	G1	3	1	2	9,408	0,0243*
	G2	18	4	14		
	G3	31	19	12		
	G4	2	2	0		
Fernmetastasen	M0	46	20	26	1,491	0,2221
	M1	2	0	2		
Resektionsrand	R0	45	22	23	0,0040	0,9493
	R1	10	5	5		
Neoadjuvante Therapie	NTx 0	45	27	18	10,80	0,0010**
	NTx 1	9	0	9		

In der Häufigkeitsverteilung, die mittels Chi-Quadrat-Test und Fisher's Exaktem Test analysiert wurde, konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der PDGF-AA-Serumkonzentration und einem fortgeschrittenen Tumorstadium festgestellt werden ($\chi^2 = 9,01$ $p = 0,0267$). Darüber hinaus wurde bei Betrachtung der absoluten Menge eine signifikant höhere PDGF-AA-Serumkonzentration in den fortgeschrittenen Tumorstadien detektiert (pT1-pT2: $11,28 \text{ ng/ml} \pm 8,51 \text{ ng/ml}$ vs. pT3-pT4: $21,98 \text{ ng/ml} \pm 66,43 \text{ ng/ml}$, $p = 0,0016$) (**Abb. 61A**). Zusätzlich zeigte der Grad der Differenzierung der Tumorzellen eine signifikante Assoziation mit der Höhe der PDGF-AA-Serumkonzentration. ($\chi^2 = 9,408$; $p = 0,0243$) (**Tab. 4.11**). Auch die mediane PDGF-AA-Serumkonzentration stellte sich höher in Patienten mit einer G3-G4-Differenzierung im Vergleich zu Patienten mit einer G1-G2-Differenzierung (G1-G2: $12,42 \text{ ng/ml} \pm 8,38 \text{ ng/ml}$ vs. G3-G4: $24,28 \text{ ng/ml} \pm 89,3 \text{ ng/ml}$, $p = 0,00155$) (**Abb. 61E**).

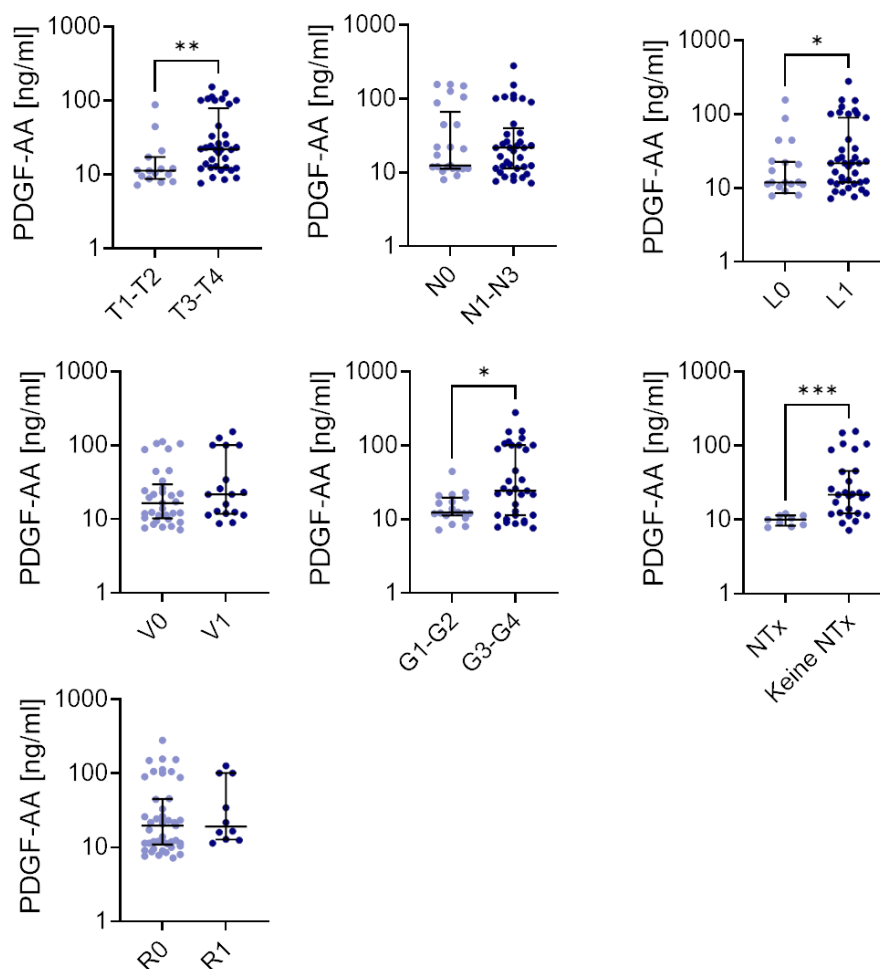


Abbildung 61: Absolute Konzentration des Serum-PDGF-AA in GEAC-Patienten mit verschiedenen klinisch-pathologischen Stadien. Verglichen wurde jeweils der Progress der Tumorinfiltration (T1-T2 vs. T3-T4), das Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung (N0 vs. N1-N3), der Lymphangioinvasion (L0 vs. L1), der Gefäßinvasion (V0 vs. V1), der Grad der Differenzierung (G1-G2 vs. G3-G4), der durchgeführten neoadjuvanten Chemotherapie (NTx vs. keine NTx) und dem Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand (R0 vs. R1). Ergebnisse wurden als mediane PDGF-AA-Konzentration und interquartilen Abstand dargestellt. Für die Analyse der nicht parametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney Test verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. mbox*: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.

Obwohl in der Analyse der Häufigkeitsverteilung keine Assoziation der PDGF-AA-Serumkonzentration mit dem Auftreten einer Lymphgefäßinvasion beobachtet werden konnte, so zeigte sich jedoch eine signifikant höhere mediane PDGF-AA-Serumkonzentration in Patienten mit Lymphgefäßinvasion im Vergleich zu Patienten ohne Lymphgefäßinvasion (L0: 11,89 ng/ml $\pm$ 14,21 ng/ml vs. L1: 21,70 ng/ml $\pm$ 77,99 ng/ml, $p = 0,0313$) **(Tab. 4.11) (Abb. 61C)**. Abschließend zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation der neoadjuvant durchgeführten Therapie der GEAC-Patienten mit der Höhe der PDGF-AA-Serumkonzentration ($\chi^2 = 10,80$; $p = 0,0010$). So zeigte sich eine deutliche Verminderung der PDGF-AA-Serumkonzentration bei Patienten, die eine neoadjuvante Therapie durchlaufen haben, im Vergleich zu Patienten ohne neoadjuvante Therapie (Ntx: 10,02 ng/ml $\pm$ 3,10 ng/ml vs. keine Ntx: 21,75 ng/ml $\pm$ 33,33 ng/ml, $p = 0,0002$) **(Abb. 61F)**. Ein Zusammenhang der PDGF-AA-Konzentration mit dem Geschlecht, der Lymphknotenmetastasierung, der Blutgefäßinvasion und dem Resektionsrand konnte nicht festgestellt werden.

In der Zusammenschau zeigen die Befunde, dass die PDGF-AA-Serumkonzentration nicht häufiger erhöht ist in GEAC-Tumorpatienten, aber deutlich mit klinisch-pathologischen Parametern assoziiert ist und somit einen potenziellen prognostischen Biomarker im GEAC darstellt.

5. Diskussion

5.1 Makrophagen als Progressionsfaktoren im GEAC

Das GEAC ist durch eine außerordentlich schlechte Prognose charakterisiert. Neben der verspäteten Diagnose und der biologischen Aggressivität des GEAC ist die schlechte Prognose auch durch die Entwicklung von Therapieresistenzen zu erklären. Dabei stellen Therapieresistenzen eine erhebliche klinische Herausforderung für die Behandlung dieser Patienten dar. Deswegen ist die Identifizierung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen besonders wichtig, um neue Behandlungsstrategien für therapierefraktäre GEAC-Patienten zu entwickeln

Makrophagen als Teil des nicht-neoplastischen Tumorstroma können einen großen Einfluss auf die Karzinogenese und Tumorprogression haben. Während der Einfluss von Makrophagen auf die Tumorigenese in zahlreichen soliden Tumoren bereits nachgewiesen ist, liegen für das GEAC bislang nur begrenzte Erkenntnisse vor. Deshalb wurden zu Beginn des vorliegenden Projektes die Expression makrophagen-spezifischer Gene und die Menge an infiltrierenden Makrophagen in zwei unabhängigen GEAC-Patienten-Kohorten untersucht. In der ersten Kohorte, die als „Discovery-Set“ diente, konnte beobachtet werden, dass die Gene *CD163*, *MSR1* und *NOS2A* signifikant stärker in GEAC-Gewebe als in Barrett- und Kontrollgewebe exprimiert wurden. Darüber hinaus war das Barrett-Gewebe durch eine stärkere *NOS2A*-Expression charakterisiert als das Kontrollgewebe. Während *CD163* und *MSR1* als klassische M2- und protumorigene Makrophagen-Marker klassifiziert werden, stellt *NOS2A* einen M1-Marker dar, welcher als proinflammatorisch gilt. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass das Barrett-Gewebe als Vorläufer-Läsion des GEAC ein chronisch proinflammatorisches Mikromilieu darstellt. Vergleichende Untersuchungen konnten eine erhöhte *NOS2A*-Expression in sämtlichen Stadien der Barrett-Karzinogenese nachweisen, einschließlich der GERD, des Barrett-Ösophagus sowie des GEAC [313–315]. Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass Biopsien aus Barrett-Gewebe eine erhöhte Expression von *NOS2A* aufwiesen. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass die erhöhte Expression durch eine kontinuierliche Reizung des Gewebes mit Gallensäuren zu erklären ist. Eine dauerhafte Therapie mit Protonenpumpen-Inhibitoren (PPI) reduzierte die *NOS2A*-Expression. Hier schlussfolgerten die Autoren, dass eine frühzeitige Behandlung mit PPI eine Möglichkeit sein könnte, um die durch Saurereflux ausgelösten irreversiblen molekularen Veränderungen zu verhindern, die eine Progression zum GEAC begünstigen [316]. Ob Makrophagen eine Rolle in der neoplastischen Progression vom Barrett-Gewebe

hin zum GEAC spielen, bleibt bis heute unklar. Allerdings zeigten bereits mehrere immunhistochemische Analysen, dass die Barrett-Mukosa durch eine ausgeprägte Infiltration von Immunzellen wie Makrophagen charakterisiert ist. Zusätzlich zeigten vorherige Studien, dass proinflammatorische Zytokine und Chemokine mit konsekutiver Aktivierung proinflammatorischer Signalwege wie der NF- κ B-Signalweg mit der malignen Transformation der Barrett-Mukosa assoziiert sind. So konnte eine Studie aus 2005 eine erhöhte Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in der Barrett-Mukosa und GEAC-Proben nachweisen [317]. Dieser Signalweg reguliert die Expression verschiedener proinflammatorischer und wachstumsfördernder Zytokine, darunter TNF- α . TNF- α selbst wird überwiegend von Makrophagen sekretiert und kann in den Barrett-Zellen den β -Catenin-Signalweg stimulieren. Diese Aktivierung führt zur Induktion der Expression des Protoonkogens *MYC*, das in der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt [318, 318]. Weitere Hinweise darauf, dass das Tumorstroma und insbesondere Makrophagen eine Rolle in der Progression vom Barrett-Gewebe zum GEAC spielen, liefern Daten aus dem genetischen L2-IL-1 β -GEAC-Mausmodell. Dieses Mausmodell ist durch die Überexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β im gastroösophagealen Übergang charakterisiert. Diese Überexpression führt über eine Ösophagitis zu einer Dysplasie mit anschließender Entwicklung eines GEAC [319]. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die Expression von IL-6 und TNF- α induziert und diese wiederum das proinflammatorische Mikromilieu durch Rekrutierung weiterer Entzündungszellen wie T-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen fördert [49, 320]. Die durch Immunzellen freigesetzten ROS können DNA-Schäden verursachen, die Anhäufung von Mutationen begünstigen und so zur Progression vom Barrett-Ösophagus zum GEAC beitragen [46]. Eine weitere Studie, die mit Hilfe des L2-IL-1 β -GEAC-Mausmodells durchgeführt wurde, zeigte, dass IL-8 die Entwicklung des Barrett-Ösophagus und des GEAC unter anderem durch die Rekrutierung unreifer Lgr5+ CXCR2+ intestinaler Stammzellen in das dysplastische Gewebe fördert [321]. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass Lgr5+ Zellen aus der Kardia des Magens den zellulären Ursprung des Barrett-Ösophagus und des GEAC darstellen [322]. Auch wenn der Ursprung der Zytokine in den durchgeführten Studien nicht eindeutig geklärt wurde und die genetische Induktion einer IL-1 β -Überexpression im Ösophagusepithel die Untersuchung eines direkten Einflusses von Makrophagen auf die Barrett-GEAC-Progression erschwert, sind alle nachgewiesenen Zytokine dafür bekannt, von Makrophagen freigesetzt zu werden. Zusammenfassend stützen die Befunde der vorliegenden Arbeit sowie die vorhandene Literatur die Hypothese, dass Makrophagen den neoplastischen Progress der Barrett-Mukosa hin zum GEAC fördern.

Die vorliegenden Befunde implizieren jedoch, dass Makrophagen eine größere Rolle in der Tumorprogression des GEAC spielen. Die initiale GSEA-Analyse der vorliegenden Arbeit zeigte, dass Patienten mit besonders hoher *CD68*- und *CD163*-Expression funktionelle Gengruppen überrepräsentiert aufwiesen, die mit Tumorprogression, Metastasierung und Therapieresistenz assoziiert sind. Darüber hinaus zeigte sich ein stark verändertes Mus-

ter des gesamten Transkriptoms zwischen Patienten mit hoher und niedriger Expression von *CD68* und *CD163*. Da diese ersten explorativen Analysen primär der Hypothesengenerierung dienten, wurde im Rahmen dieses Projekts auf die Untersuchung einzelner differenziell exprimierter Gene verzichtet. Stattdessen lag der Fokus auf der Identifikation unterschiedlicher relevanter biologischer Prozesse mithilfe der GSEA-Analyse. Für diese Analyse wurden die Transkriptome von jeweils vier GEAC-Patienten ausgewählt. Diese Patienten zeigten entweder eine hohe Expression von *CD68* und *CD163* oder eine niedrigere *CD68* und *CD163*-Expression. Auch wenn diese Selektion trotz einer sorgfältigen Quantil-Normalisierung künstliche Unterschiede verstärken (Selection Bias) und dadurch zu einer Überschätzung biologischer Zusammenhänge führen kann, stellt sie jedoch eine hilfreiche Vorgehensweise dar, um interessante Hypothesen zu generieren. Auf Grundlage dieser Ergebnisse konnten wir die Hypothese aufstellen, dass Makrophagen die Tumورprogression und Metastasierung des GEAC fördern und das Ansprechen auf bestimmte Therapien beeinflussen. Um diese Hypothesen zu prüfen, wurde die Makrophageninfiltration im Tumorgewebe des GEAC mithilfe des GEAC-TMA durch immunhistochemische Färbungen für *CD68*, *CD163* und *iNOS* quantifiziert und anschließend mit klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung und Gesamtüberleben korreliert. Hier zeigte sich, dass die Menge an *CD68*- und *CD163*-positiven Makrophagen signifikant mit dem Tumorstadium und dem Grading korreliert. Zusätzlich stellte sich ein Zusammenhang mit der Infiltration von *CD163*-positiven Makrophagen und dem Auftreten einer Lymphknotenmetastasierung dar. *CD68* gilt als Pan-Makrophagenmarker, der sowohl M1- als auch M2-Makrophagenpopulationen erfasst, während *CD163* eher M2-polarisierte Makrophagen detektiert. Auf Grundlage dieser Annahme deuten die vorliegenden Befunde darauf, dass Makrophagen mit kombinierten M1- und M2-Eigenschaften eher die Tumورprogression und die Dedifferenzierung fördern, während M2-polarisierte Makrophagen zusätzlich noch das Invasionsverhalten der Tumorzellen beeinflussen. Diese Beobachtung wird durch mehrere Studien gestützt. So konnte eine Studie zeigen, dass das Auftreten von Lymphknotenmetastasen mit einer verstärkten Infiltration von mononukleären Zellen im GEAC-Tumormikromilieu assoziiert ist [323]. Darüber hinaus demonstrierten Cao *et al.*, dass ein höherer Anteil an M2-Makrophagen im Tumorgewebe des GEAC signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert. Die Autoren wiesen darüber hinaus nach, dass die Gesamtzahl an *CD68*-positiven Makrophagen keinen Zusammenhang mit der Lymphknotenmetastasierung aufwies, und bestätigten damit die Befunde der vorliegenden Arbeit [324]. Eine weitere Arbeit unterstützte unsere Befunde zur Korrelation der Menge an *CD68*-positiven Makrophagen mit dem Tumorstadium. Hier zeigte eine Studie aus dem Jahr 2020, dass sowohl die Menge an *CD68*- und *CD163*-positiven Makrophagen signifikant mit dem Auftreten eines höheren Tumorstadiums und einer zunehmenden Dedifferenzierung assoziiert ist. Die Autoren konnten zudem, im Gegensatz zu den Befunden der vorliegenden Arbeit, einen Zusammenhang zwischen der Infiltration von *CD68*-positiven Makrophagen und dem Nachweis von Tumorzellen in Lymphknoten auf-

zeigen. Zusätzlich wiesen sie eine signifikante Assoziation zwischen der Menge an CD68- und CD163-positiven Makrophagen und dem Gesamtüberleben von GEAC-Patienten nach [325]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Makrophagen auf das Gesamtüberleben von GEAC-Patienten untersucht. Die Kaplan-Meier-Analysen zeigten, dass sowohl die Anzahl der CD68- als auch der CD163-positiven Makrophagen signifikant mit dem Gesamtüberleben korrelierte. In der anschließenden multivariaten Cox-Regression konnte jedoch keiner der untersuchten Makrophagenmarker als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich durch die bereits etablierten starken unabhängigen Prädiktoren wie Tumorstadium, histologisches Grading und Lymphknotenmetastasierung erklären. Der prognostische Effekt der Makrophageninfiltration könnte in der multivariaten Analyse durch diese Parameter überlagert werden. Eine weitere mögliche Erklärung besteht darin, dass die Infiltration von Makrophagen weniger eine eigenständige prognoserelevante Einflussgröße darstellt, sondern vielmehr eine Reaktion des Immunsystems auf die Tumorprogression widerspiegelt. In diesem Sinne stellen Makrophagen einen Biomarker für einen aggressiveren Tumorphänotyp dar, ohne jedoch die Ursache dafür zu sein. Jedoch finden sich in der Literatur auch Befunde, die Makrophagen als unabhängigen prognostischen Risikofaktor identifizieren. So konnten Jeremiasen *et al.* CD68 als unabhängigen prognostischen Marker im GEAC nachweisen [325]. Weitere Studien belegen einen prognostischen Einfluss von Makrophagen auf das Gesamtüberleben bei Patienten mit Magenkarzinom, welches dem GEAC biologisch sehr ähnlich ist [326, 327]. In einer Studie von Zhang *et al.*, wurde gezeigt, dass eine hohe Infiltration von CD68-positiven Makrophagen mit dem Tumorstadium, der Lymphknotenmetastasierung, der Fernmetastasierung und dem Grading des Magenkarzinoms assoziiert ist und als unabhängiger negativer Prognosefaktor gilt. Darüber hinaus konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen CD68-positiven Makrophagen und der Expression von E-Cadherin sowie Vimentin herstellen und schließen daraus, dass der aggressivere Phänotyp des Magenkarzinoms durch eine von Makrophagen induzierte EMT in den Tumorzellen erklärt werden könnte [328]. Ergebnisse einer weiteren Studie zeigten, dass die Infiltration von CD163- und CD68-positiven Makrophagen im Magenkarzinomgewebe signifikant erhöht war und jeweils unabhängig mit der Prognose der Patienten assoziiert ist. In der multivariaten Cox-Analyse erwies sich jedoch die Infiltration von CD163-positiven Zellen als der stärkere Prädiktor für die Prognose im Vergleich zu CD68-positiven Zellen [329]. Zusätzlich zeigte eine weitere Studie, dass eine hohe Dichte CD68-positiver Makrophagen mit einer ungünstigen Prognose bei Patienten mit Magenkarzinom assoziiert ist. Dies führten die Autoren vornehmlich auf eine IL-6-induzierte Aktivierung des STAT3/IRF4-Signalwegs zurück, die zu einer Polarisierung der Makrophagen sowie zu einer gesteigerten Tumordinvasion in den Magenkarzinomzellen *in vitro* führt [330]. In einem nächsten Schritt wurde in diesem Projekt untersucht, ob Makrophagen in GEAC-Zellen einen biologisch aggressiveren Phänotyp induzieren können und welche Mechanismen hier zugrunde liegen. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein indirektes *in vitro*-Kokultursystem etabliert, mit

dem Makrophagen über das Kulturmedium mit GEAC-Zellen in Kontakt gebracht werden konnten. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Makrophagen-sezernierten Faktoren auf die GEAC-Zellen untersucht werden. Als Makrophagen-Modell diente die Monozyten-Zelllinie THP-1. Diese Zelllinie wurde bereits in vielen Arbeiten charakterisiert und stellt ein solides Modell für naive Makrophagen dar [331]. Um die Ergebnisse jedoch weiter zu validieren, wurden die GEAC-Zellen noch zusätzlich mit MDM in Kontakt gebracht. Als Modell für das GEAC wurden die Zelllinien PT1590, LN1590, NCI-N87, SKGT4, OE33 und PT6216 verwendet. Zunächst zeigte sich nach drei Tagen Kokultur mit den THP-1 und MDM ein erhöhter Anteil an vitalen PT1590- und LN1590-Zellen. Die Makrophagen hatten keinen Einfluss auf die Vitalität der restlichen Zellen. Dabei zeigten die NCI-N87- und PT6216-Zellen tendenziell weniger vitale Zellen in Anwesenheit der Makrophagen. Die Ki67-Proliferationsanalysen und Western-Blot-Analysen der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 und Cyclin E1 bestätigten dabei die Beobachtungen der PT1590- und LN1590-Zellen. Die unterschiedliche Reaktion der GEAC-Zelllinien auf THP-1-Makrophagen könnte auf die Expression verschiedener Rezeptoren sowie die Aktivierung divergenter Signalwege zurückzuführen sein. Während PT1590 und LN1590 offenbar durch makrophagenvermittelte parakrine Faktoren proliferative und überlebensfördernde Signale erhalten, weisen NCI-N87 und PT6216 auf eine makrophagenabhängige Reduktion der Zellvitalität hin, was möglicherweise durch pro-inflammatorische und zytotoxische Mediatoren vermittelt wird. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass Tumorzellen selbst die Polarisierung der Makrophagen beeinflussen können und dadurch die Freisetzung unterschiedlicher Faktoren induzieren, die wiederum variabel auf GEAC-Zellen zurückwirken [332]. Der Einfluss der Tumorzellen auf die Makrophagen-Polarisierung wurde in diesem Projekt bewusst nicht weiter untersucht, da dies Gegenstand anderer Projekte ist. Die divergenten Befunde der MTT- und Ki67-Proliferationsanalyse der NCI-N87-Zellen werden im nächsten Kapitel im Detail diskutiert. Während in der Literatur überwiegend ein proliferationsfördernder Einfluss von Makrophagen auf Tumorzellen beschrieben wird, existieren auch Studien, die gegenteilige Effekte nachweisen konnten. So demonstrierten Cui *et al.*, dass Makrophagen freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) zu einer DNA-Fragmentierung mit anschließender Apoptose in den Tumorzellen führten. Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass Makrophagen durch die Sekretion von TNF- α eine Apoptose in der malignen Mastozytom-Zelllinie P815 induzieren. Weitere Studien belegen einen zytotoxischen Effekt von Makrophagen auf Tumorzellen, der durch direkten Zellkontakt vermittelt wird und in der Phagozytose von Tumorzellen resultiert [333–335]. In einem weiteren Schritt wurde der mitogene Einfluss von Makrophagen auf GEAC-Zellen mit unserem GEAC-TMA überprüft. Dazu wurde der Proliferationsmarker Ki67 in Tumorgewebe von 204 GEAC-Patienten immunhistochemisch gefärbt und in drei Kategorien stratifiziert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit klinisch-pathologischen Parametern sowie der Infiltrationsdichte von CD68- und CD163-positiven Makrophagen korreliert. Zunächst zeigte sich eine Korrelation der Proliferation von GEAC-Tumoren mit dem Tumorstadium, dem UICC-Stadium

und der Fernmetastasierung. Diese Beobachtung konnte bereits in vielen Studien für das GEAC, aber auch für das Magenkarzinom demonstriert werden [336–339]. Im Weiteren zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration von CD68- und CD163-positiven Makrophagen und der Höhe des Ki67-Proliferationsindex. Die Spearman-Korrelationsanalysen ergaben dabei insbesondere für CD68-positive Makrophagen einen ausgeprägten Zusammenhang mit der Proliferationsaktivität der GEAC-Tumoren. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in anderen Krebsentitäten durch immunhistologische Analysen demonstriert werden. So wies eine 2019 veröffentlichte Studie eine positive Korrelation zwischen der Infiltration von CD68- und CD163-positiven Makrophagen und der Proliferation von Brustkrebszellen nach [340]. Darüber hinaus existieren bereits erste Befunde, die molekulare Mechanismen für die Makrophagen-vermittelte Proliferation im GEAC und ESCC aufzeigen. Die Studie von Chen *et al.*, zeigte, dass Gallensäuren die Freisetzung von EGFR-haltigen Exosomen aus GEAC-Zellen fördern, welche wiederum eine M2-Polarisation von Makrophagen induzieren. Diese M2-Makrophagen sezernieren große Mengen des Chemokins CCL18, das über die Aktivierung des PITPNM3-Rezeptors die Proliferation von GEAC-Zellen stimuliert [341]. Eine weitere Untersuchung konnte eine Makrophagen-induzierte Proliferation in ESCC-Zellen durch die Freisetzung von CCL22 nachweisen, welche den CCR4/FAK/AKT-Signalweg aktiviert. Dabei zeigten die Autoren mittels Xenograft-Mausexperimenten, dass Makrophagen-sekretiertes CCL22 zu größeren Tumoren und einem höheren Ki67-Proliferationsindex führte [342].

Insgesamt konnte der erste Teil der vorliegenden Arbeit einen relevanten Einfluss von Makrophagen auf das GEAC nachweisen. So korrelierte die Infiltration von CD68- und CD163-positiven Makrophagen mit einem reduzierten Gesamtüberleben der GEAC-Patienten. Dabei deuten die Befunde darauf hin, dass CD68-positive Makrophagen die Progression des GEAC vor allem über die Förderung der Tumorzellproliferation vermitteln, während CD163-positive Makrophagen darüber hinaus die Fähigkeit zur Metastasierung der Tumoren modulieren könnten.

5.2 Makrophagen und das Tumorstroma als Treiber der Resistenz gegenüber HER2-gerichteten Therapien im GEAC

Die Behandlung des metastasierten GEAC stellt nach wie vor eine erhebliche klinische Herausforderung dar. Obwohl Chemotherapien, die HER2-zielgerichteten Therapien und die Immuntherapien das Überleben von GEAC-Patienten verbessern konnten, kommt es bei nahezu allen Patienten im Krankheitsverlauf zum Auftreten von Resistenzen. Darüber hinaus zeigt ein erheblicher Teil der Patienten schon bei Therapiebeginn ein fehlendes Ansprechen. Das Fortschreiten der Erkrankung trotz initialem Therapieansprechen limitiert die Wirksamkeit bestehender Strategien und hat große Auswirkungen auf den weiteren Therapieerfolg und das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten. Die vorliegende Arbeit konnte neben dem Einfluss der Makrophagen auf die Tumorprogression, das Gesamtüberleben und die Induktion wachstumsfördernder Prozesse auch demonstrieren, dass Makrophagen das Ansprechen auf eine HER2-zielgerichtete Therapie modulieren können. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnten mithilfe der GSEA-Analyse erste Hinweise gewonnen werden, dass Makrophagen das Ansprechen spezifischer Therapien beeinflussen können. Dabei zeigte sich, dass GEAC-Tumoren mit hoher Expression der Makrophagenmarker *CD68* und *CD163* überrepräsentierte funktionelle Gengruppen aufwiesen, die mit einer Therapieresistenz in Zusammenhang standen. Besonders auffällig war hierbei, dass der stärkste und statistisch signifikanteste Zusammenhang mit einer Gefitinib-Resistenz bestand. Gefitinib ist ein zielgerichtetes Medikament aus der Gruppe der TKI, welches den EGFR-Rezeptor blockiert und für die Behandlung des NSCLC zugelassen ist. Weitere Wirkstoffresistenzen, mit denen die funktionellen Gengruppen assoziiert waren, umfassten unter anderem Cisplatin, Docetaxel, Gemcitabin und 5-FU. Für das GEAC ist die HER2-spezifische Therapie mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab zugelassen. Die ToGA-Zulassungsstudie zeigte, dass die Zugabe von Trastuzumab zu Capecitabin/Cisplatin das mediane Gesamtüberleben um 2,7 Monate im Vergleich zur Chemotherapie allein verlängerte. Dabei betrug die objektive Ansprechrates 47 % und das PFS lag bei 6,7 Monaten [63]. Daraus lässt sich ableiten, dass mehr als die Hälfte der Patienten initial nicht auf die Therapie ansprach und die Mehrheit innerhalb von weniger als einem Jahr eine sekundäre Resistenz entwickelte. Um diesen Patienten nach Progress eine weitere HER2-spezifische Therapie anzubieten, untersuchte die TRIO-013/LOGiC-Studie die Wirksamkeit des oralen HER2/EGFR-spezifischen TKI Lapatinib. Im GEAC zeigte Lapatinib allerdings nur begrenzte Wirksamkeit. Und obwohl im Vergleich zur Standardtherapie die Ansprechrates von Lapatinib mit 53 % (vs. 39 %) deutlich höher waren, stellte sich kein signifikanter Überlebensvorteil dar. Auch das PFS mit 6 Monaten in der Lapatinib-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 5,4 Monaten

zeigte sich nicht wesentlich verbessert [343]. Zusammenfassend sind die Studienergebnisse enttäuschend und verdeutlichen die Notwendigkeit, die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen besser zu verstehen, um neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können. Ob Makrophagen das fehlende Ansprechen zielgerichteter Therapien mit verursachen können oder ob diese bei der Entwicklung sekundärer Resistenzen eine Rolle spielen, bleibt für das GEAC unklar. Da die initialen GSEA-Analysen die Infiltration von Makrophagen mit dem Auftreten einer Gefitinib-Resistenz in Zusammenhang bringen konnten, fokussierte die vorliegende Arbeit den Einfluss von Makrophagen auf das Ansprechen des HER2-spezifischen TKI Lapatinib. Hierfür wurde das bereits oben beschriebene indirekte *in vitro*-Kokultursystem eingesetzt. Als Makrophagenmodell dienten differenzierte THP-1-Makrophagen und MDM. Zunächst wurde mittels Western-Blot- und IFF-Analysen die Expression des HER2-Rezeptors in verschiedenen GEAC-Zelllinien untersucht. Dabei zeigten PT1590, LN1590, NCI-N87 und OE33 eine deutliche HER2-Überexpression. Da die THP-1-Makrophagen in den ersten Kokulturversuchen den stärksten proliferationsfördernden Effekt auf PT1590-Zellen ausübten, wurde diese Zelllinie für weiterführende Analysen ausgewählt. Ergänzend wurden NCI-N87-Zellen herangezogen, da diese Zelllinie eine besonders ausgeprägte HER2-Expression aufweist. Zu Beginn zeigten die MTT-Analysen, dass die Anwesenheit von THP-1-Makrophagen zu einem deutlich höheren Anteil vitaler PT1590-Zellen im Vergleich zur Monokultur-Kontrolle führte. Dieser Effekt ließ sich für NCI-N87-Zellen nicht nachweisen. Hier zeigte sich vielmehr ein leicht verringerter Anteil vitaler Zellen in Anwesenheit von THP-1-Makrophagen. Die erhobenen Befunde der PT1590-Zellen konnten durch Ki67-Proliferationsanalysen weiter bestätigt werden. Die NCI-N87-Zellen zeigen hingegen ein gegenläufiges Ergebnis. Während die MTT-Analysen eine Reduktion des Anteils an vitalen Zellen in Anwesenheit der THP-1-Makrophagen nachwiesen, zeigte die Ki67-Proliferationsanalyse, dass die THP-1-kultivierten NCI-N87-Zellen eine gesteigerte Proliferation aufwiesen. Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten durch die unterschiedlichen Messmethoden zu erklären sein. Während der MTT-Assay auf der mitochondrialen Stoffwechselaktivität basiert und somit eher ein Maß für die metabolische Vitalität der Gesamtzellpopulation darstellt, erfasst Ki67 ausschließlich die proliferativ aktiven Zellen und ist unabhängig von der metabolischen Aktivität. Somit könnten die THP-1-Makrophagen Faktoren freisetzen, die die Proliferation der NCI-N87-Zellen steigern, aber auch gleichzeitig oxidativen Stress und Apoptose induzieren. Dies könnte zu einer Situation führen, in der insgesamt weniger metabolisch vitale Zellen vorhanden sind, die verbleibenden Zellen aber eine höhere proliferative Aktivität aufweisen. Um diese Frage genauer zu beantworten, wäre die Durchführung eines Apoptose-Assays notwendig.

Nach Zugabe von Lapatinib zeigte sich jedoch für beide Zelllinien ein vergleichbares Muster. Während Lapatinib den Anteil vitaler, monokultivierter PT1590-Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant reduzierte, wurde dieser wachstumshemmende Effekt durch die Anwesenheit der THP-1-Makrophagen vollständig aufgehoben. Auch

NCI-N87-Zellen zeigten in Kokultur eine abgeschwächte Sensitivität gegenüber Lapatinib, wenngleich das Medikament hier weiterhin eine deutlich messbare wachstumshemmende Wirkung entfaltete. Darüber hinaus konnten vergleichende Ergebnisse nach der Kokultivierung von PT1590- und NCI-N87-Zellen mit MDM beobachtet werden. Die im Vergleich zu PT1590-Zellen geringere Aufhebung des Lapatinib-Effekts in den NCI-N87-Zellen durch THP-1-Makrophagen könnte durch die unterschiedlich starke HER2-Rezeptor-Expression zu erklären sein. Die Menge des HER2-Rezeptors ist in den NCI-N87-Zellen deutlich höher als in den PT1590-Zellen, was die NCI-N87-Zellen möglicherweise stärker von HER2-Signalen abhängig macht. Darüber hinaus zeichnen sich die NCI-N87-Zellen durch eine insgesamt höhere Sensitivität gegenüber einer HER2-Inhibition aus, was eine vollständige Kompensation durch makrophagenvermittelte Signale erschweren dürfte. Darüber hinaus ist denkbar, dass NCI-N87-Zellen weniger stark auf durch Makrophagen sezernierte Zytokine oder Wachstumsfaktoren reagieren, sodass deren schützender Einfluss im Vergleich zu PT1590-Zellen geringer ausfällt. Eine weitere Erklärung wird in Kapitel 5.4 diskutiert. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl THP-1-Makrophagen als auch MDM lösliche Faktoren in den Zellkulturüberstand sezernieren, die das Ansprechen auf die Lapatinib-Therapie reduzieren. Bereits zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das nicht-neoplastische Tumorstroma einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit verschiedener Therapien ausüben kann. Für das GEAC, insbesondere in Bezug auf die Auswirkungen des Tumorstromas auf zielgerichtete Therapien, liegen bislang jedoch sehr begrenzte Daten vor. Allerdings konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, dass Makrophagen eine Trastuzumab-Resistenz in HER2-positivem Magenkarzinom vermitteln können. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass in Tumorzellen über die Aktivierung eines Cell-Division-Cycle-42-(CDC42)-/NF- κ B-Signalwegs die Freisetzung von Glutaminase-1-(GLS1)-haltigen Mikrovesikeln induziert wird. Diese Vesikel steigern in Makrophagen den Glutaminstoffwechsel, fördern die Polarisierung eines M2-Phänotyps und stimulieren die Sekretion proangiogener Faktoren wie VEGF. Die hierdurch verstärkte Angiogenese führte letztlich zur Ausbildung einer Trastuzumab-Resistenz in den Magenkarzinomzellen [344]. Weitere mögliche Erklärungen ergeben sich aus Erkenntnissen der Mammakarzinomforschung. Auch hier ist der HER2-spezifische Antikörper Trastuzumab zur Behandlung HER2-positiver Mammakarzinome zugelassen. Eine Publikation aus dem Jahr 2021 zeigte, dass TAMs aus Mammakarzinom-Gewebe erhöhte Mengen des Chemokins IL-8 sezernieren. *In vitro*-Daten belegten, dass die Stimulation der SKBR3-Mammakarzinomzelllinie mit IL-8 eine Src/STAT3/ERK-abhängige Proliferation sowie eine Lapatinib-Resistenz induziert [210]. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine Kokultur-Experimente mit Makrophagen durchgeführt, sondern die Zellen wurden ausschließlich mit IL-8 stimuliert. Zudem fehlten verifizierende Inhibitionsanalysen, um die zugrunde liegenden Mechanismen eindeutig zu bestätigen. Aber auch andere zelluläre Komponenten des Tumorstromas können Einfluss auf das Ansprechen gegenüber Lapatinib haben. So zeigte eine Publikation, dass TAFs über die Freisetzung von FGF5 mit konsekutiver FGFR2/Src-abhängiger Transakti-

vierung des HER2-Rezeptors zu einer Resistenz gegenüber Lapatinib führen [345]. Diese Beobachtung konnte durch eine weitere Arbeit bestätigt werden. Hier konnten die Autoren demonstrieren, dass das konditionierte Medium von primären TAFs eine Resistenz gegenüber Trastuzumab und Pertuzumab vermittelt. Dabei konnten Sekretom-Analysen eine Vielzahl von differenziell regulierten Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren identifizieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Ausbildung der Trastuzumab- und Pertuzumab-Resistenz beteiligt sind. Allerdings fehlten in dieser Studie die weiteren mechanistischen Untersuchungen zur Identifizierung der Faktoren, die das Ansprechen der HER2-spezifischen Therapie reduzieren. Weitere indirekte Hinweise, dass Makrophagen das Ansprechen auf eine HER2-Therapie beeinflussen, liefert eine interessante Arbeit aus dem Jahr 2017. Hier konnten die Autoren zeigen, dass TNF- α die Expression von Mucin 4 (MUC4) in HER2-positiven Mammakarzinomzellen induziert. MUC4 ist ein Glykoprotein aus der Familie der membranständigen Mucine, deren transmembranäre Untereinheit MUC4 β zwei EGF-ähnliche Domänen besitzt und dadurch das Trastuzumab-Epitop von HER2 maskiert, die Bindung vermindert und letztendlich die Effektivität reduziert. Auch wenn die Autoren die Quelle des TNF- α nicht eindeutig identifizieren konnten, ist allgemein bekannt, dass insbesondere proinflammatorische Makrophagen die Hauptquelle von TNF- α darstellen. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass der beschriebene Resistenzmechanismus maßgeblich durch Makrophagen mitverursacht wird [346]. Bis jetzt gibt es sowohl für das GEAC als auch für das Mammakarzinom keine Daten zu einer makrophagenvermittelten Lapatinib-Resistenz. Allerdings zeigten mehrere Studien, dass die Lapatinib-Resistenz häufig durch eine kompensatorische Aktivierung anderer Signalwege vermittelt wird. So zeigte die Arbeit von Sato *et al.*, dass der Wachstumsfaktor Heregulin 1 (HRG1) über die Aktivierung des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 3 (HER3) mit konsekutiver Aktivierung des AKT-Signalwegs eine Lapatinib-Resistenz in GEAC-Zellen vermittelt. Vor diesem Hintergrund untersuchte die vorliegende Arbeit, ob Makrophagen onkogene Signalwege aktivieren, die zur Vermittlung einer Lapatinib-Resistenz beitragen. So konnten Western-Blot-Analysen zeigen, dass die Anwesenheit von THP-1- und MDM-Makrophagen zur Aktivierung der Signalwege STAT3, AKT und ERK führte und diese Aktivität auch unter Lapatinib-Therapie bestehen blieb [347]. Zusammenfassend demonstrierte der zweite Teil der vorliegenden Arbeit, dass Makrophagen *in vitro* die Tumorzellproliferation erhöht sowie das Ansprechen auf den dualen EGFR/HER2-spezifischen TKI Lapatinib reduziert. Über welchen Mechanismus die Makrophagen diese Effekte induzieren wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.3 STAT3 als primärer Signalweg der Makrophagen vermittelten HER2-Therapieresistenz im GEAC

Tumorzellen reagieren über die Aktivierung spezifischer Signalwege auf Faktoren aus ihrer Mikroumgebung. Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren oder auch exosomale Signale von Stromazellen können das biologische Verhalten der Tumorzellen entscheidend beeinflussen. Externe Signale werden dabei über intrazelluläre Signalwege an den Zellkern weitergeleitet und führen zu einer veränderten Genexpression, die den Phänotyp moduliert und so Prozesse wie Metastasierung, Proliferation oder auch das Ansprechen auf Therapien beeinflusst. Die detaillierte Analyse der beteiligten Signalwege im Rahmen der Tumorstroma-Interaktion liefert nicht nur ein tieferes Verständnis der Kommunikation zwischen Stromazellen und Tumorzellen, sondern ermöglicht auch die Identifikation therapeutisch relevanter Angriffspunkte.

Das vorliegende Projekt identifizierte Makrophagen als potenzielle Treiber der GEAC-Krankheitsprogression. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in GEAC-Zellen sowohl eine gesteigerte Proliferation induzieren als auch das Ansprechen auf den TKI Lapatinib reduzieren. Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Makrophagen eine Aktivierung onkogener Signalwege auslöst und ob diese an der Ausbildung des proliferativen Phänotyps sowie an der Lapatinib-Resistenz beteiligt sind, wurde im zweiten Teil des Projekts die Phosphorylierung der Signaltransduktionswege STAT3, AKT und ERK analysiert. Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Anwesenheit von THP-1- und MDM-Makrophagen eine Aktivierung dieser Signalwege induzierte und dass diese Aktivität auch unter Lapatinib-Therapie erhalten blieb. Hier zeigte sich insbesondere für STAT3 eine besonders starke Aktivierung, welche sowohl in den PT1590- als auch in den NCI-N87-Zellen nachgewiesen werden konnte. Ferner konnte die makrophageninduzierte STAT3-Aktivierung in einem GEAC-TMA mit 195 Patientenproben immunhistologisch durch Färbungen von STAT3 und p-STAT3 validiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Infiltration von CD68- und CD163-positiven Makrophagen signifikant mit der Anzahl p-STAT3-positiver GEAC-Zellen korrelierte. Für CD68 konnte zudem eine enge Assoziation mit dem nukleären Nachweis von STAT3 nachgewiesen werden. Der JAK/STAT3-Signalweg reguliert eine Vielzahl von zellulären Prozessen, die insbesondere von Tumorzellen genutzt werden. Dabei kann STAT3 als Transkriptionsfaktor die Tumorprogression, Metastasierung, Therapieresistenz und Immunsuppression von Tumoren beeinflussen. Die Aktivierung von STAT3 erfolgt in der Regel über Zytokine und Wachstumsfaktoren, die an spezifische Zelloberflächenrezeptoren (z. B. IL-6-Rezeptor) binden. Dadurch werden die assoziierten JAKs aktiviert, welche STAT3 phosphorylieren. Das aktivierte STAT3 bildet Dimere, transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Expression zahlreicher Zielgene [84, 348]. Damit können sowohl die STAT3-Phosphorylierung als auch die STAT3-Translokation als Marker für die Aktivierung des Signalwegs herangezogen werden. Die Gesamtheit der Befunde un-

terstützt die Annahme, dass Makrophagen über die Freisetzung spezifischer Faktoren den STAT3-Signalweg in GEAC-Zellen aktivieren können. Diese Beobachtungen werden durch diverse Forschungsarbeiten gestützt. Allerdings sind diese Befunde in Tumormodellen des ESCC, des Magenkarzinoms und auch vieler anderer Tumorentitäten erhoben worden, nicht aber für das GEAC. So zeigte eine umfassende bioinformatische Analyse der TIMER-Datenbank (Tumor Immune Estimation Resource), dass STAT3 mit der Infiltration von CD68- und CD163-positiven Makrophagen korreliert [349]. Allerdings wurde in dieser Studie nicht untersucht, ob diese Korrelation auch mit einer gesteigerten Aktivität von STAT3 zusammenhängt. Ergänzend konnte eine Arbeit von Sui *et al.*, mittels vergleichender Genexpressionsanalysen und Einzelzellsequenzierungen demonstrieren, dass Makrophagen durch die Freisetzung des Chemokins CCL18 eine STAT3-Aktivierung in ESCC-Zellen induzieren. Zudem wurde ein hoher CCL18-Spiegel mit einer ungünstigen Prognose bei ESCC-Patienten in Verbindung gebracht [350]. Eine weitere Studie zeigte, dass THP-1-Makrophagen durch Stimulation mit konditioniertem Medium von Magenkarzinomzellen proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-8 freisetzen. Diese Zytokine führten wiederum zu einer STAT3-Aktivierung in den Magenkarzinomzellen und induzierten eine erhöhte Proliferation der Tumorzellen [351]. Eine ergänzende Untersuchung demonstrierte, dass IL-10, das von Makrophagen sezerniert wird, die Proliferation und Invasion von Magenkarzinomzellen über den c-Met/STAT3-Signalweg reguliert [352]. Weitere Befunde, in denen eine makrophageninduzierte STAT3-Aktivierung nachgewiesen wurde, stammen aus Studien zum Cholangiokarzinom, Lungenkarzinom, kolorektalen Karzinom, Melanom und Pankreaskarzinom [353–357]. Jedoch fehlen in den meisten dieser Arbeiten mechanistische Untersuchungen, die zeigen, dass STAT3 eine Proliferation in Tumorzellen induzieren kann. Um dies zu prüfen und um die Rolle der STAT3-Aktivierung auf die Makrophagen vermittelte Lapatinib-Resistenz zu untersuchen, wurde im vorliegenden Projekt ein siRNA-vermittelter Knockdown von STAT3 durchgeführt. Ergänzend wurde die STAT3-Aktivität in den GEAC-Zellen PT1590 durch den STAT3-Inhibitor Napabucasin gehemmt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl der STAT3-Knockdown als auch die Behandlung mit dem STAT3-Inhibitor Napabucasin den durch die THP-1-Kokultur erhöhten Anteil vitaler Zellen reduzierten und die PT1590-Zellen gegenüber Lapatinib wieder resensibilisierten. Die durch Makrophagen induzierte Proliferation konnte hingegen nicht durch den STAT3-Knockdown, aber durch die Behandlung mit Napabucacin beeinflusst werden. Napabucasin hemmt vor allem die Transkriptionsaktivität von STAT3 durch die Bildung von ROS mit Beeinträchtigung der DNA-Bindung von STAT3 [358]. Somit hat Napabucasin eine umfangreichere Wirkung und kann dadurch die stärkere Wirkung erklären. Auffällig war jedoch, dass die Makrophagen-vermittelte Proliferation unter Lapatinib-Behandlung durch den STAT3-Knockdown aufgehoben werden konnte. Insgesamt deuten die Befunde darauf hin, dass STAT3 offenbar an der makrophageninduzierten Lapatinib-Resistenz beteiligt ist, während der proliferationsfördernde Effekt der Makrophagen auf die GEAC-Zellen weitgehend unabhängig von STAT3 ist.

So könnte man davon ausgehen, dass die Makrophagen eine Lapatinib-Resistenz über STAT3 vermitteln und die Proliferationsförderung über einen STAT3-unabhängigen Mechanismus. Diese Annahme wird bereits durch die allgemein bekannten Funktionen von STAT3 unterstützt. STAT3 vermittelt als Transkriptionsfaktor in Tumorzellen vor allem Anti-Apoptose-Signale, indem Proteine wie Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 oder Survivin hochreguliert werden. Auch wenn STAT3 durch die Induktion von Cyclin D1 oder c-Myc indirekt zur Proliferation beiträgt, gilt er nicht als primärer Proliferationstreiber, da dieses Signal in vielen Tumoren hauptsächlich durch MAPK/ERK- oder PI3K/AKT-Wege dominiert wird [84, 348, 359, 360]. Im vorliegenden Projekt zeigte sich zudem, dass diese Signalwege unter dem Einfluss von Makrophagen aktiviert werden. So könnte angenommen werden, dass der mitogene Effekt der Makrophagen vor allem auf die Aktivierung des AKT- oder ERK-Signalwegs zurückzuführen ist. Für das GEAC konnten bisher keine Daten erhoben werden, die eine Rolle von STAT3 bei der Lapatinib-Resistenz nachweisen. Jedoch zeigten die Autoren Huang *et al.*, eine mögliche Beteiligung des STAT3-Signalwegs bei der Lapatinib-Resistenz in Mammakarzinomzellen. Diese Studie zeigte, dass eine langfristige Behandlung von HER2-positiven Brustkrebszellen mit Lapatinib eine verstärkte Expression von IL-6 induziert, welches über den JAK/STAT3-Signalweg die Resistenzentwicklung gegenüber Lapatinib fördert. Dabei führte der aktivierte STAT3-Signalweg zur Aufrechterhaltung von Tumorstammzell-Eigenschaften und einer erhöhten Invasionsfähigkeit der Tumorzellen. Erstmals konnten die Autoren zudem durch STAT3-Knockdown-Experimente einen direkten mechanistischen Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivierung und der Lapatinib-Resistenz nachweisen [361]. Eine weitere Studie unterstreicht die Bedeutung der STAT3-Aktivierung als zentralen Mechanismus der erworbenen Lapatinib-Resistenz. Die Autoren konnten zeigen, dass die Lapatinib-resistente Mammakarzinomzelllinie SKBR3-L eine erhöhte STAT3-Aktivität aufwies und dass diese Resistenz sowohl durch siRNA-vermittelten Knockdown als auch durch pharmakologische Inhibition von STAT3 überwunden werden konnte. Darüber hinaus wirkte die Kombination mit dem HSP90-Inhibitor Ganetespib synergistisch, indem es nukleäres STAT3 depletierte und dadurch die STAT3-vermittelte Hochregulation anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2 und Bcl-xL sowie proliferationsfördernder Faktoren wie Cyclin D1 und c-Myc reduzierte [362]. Weitere Hinweise, dass STAT3 Einfluss auf die Effektivität von Lapatinib hat, ergeben sich aus Studien, die zeigen, dass STAT3 auch an der Ausbildung von Resistenzen gegenüber anderen TKIs beteiligt ist. So demonstrierten zwei Studien, dass Gefitinib-resistente Bronchialkarzinom-Zelllinien eine verstärkte STAT3-Phosphorylierung aufwiesen und ein siRNA-vermittelter Knockdown von STAT3 die Sensitivität gegenüber Gefitinib wiederherstellen konnte [363, 364]. Interessanterweise zeigte eine Veröffentlichung, dass STAT3 das therapeutische Ansprechen auf TKI verbessern kann. Hier zeigte die Arbeit von Hu *et al.*, dass die Methyltransferase NSUN2 in kolorektalen Karzinomen die Progression fördert und die Sensitivität gegenüber Lapatinib steigert. Mechanistisch wurde dies auf die Aktivierung des CUL4B/ErbB-STAT3-Signalwegs mit konsekutiv er-

höherer Bildung des HER2-Rezeptors und einer daraus resultierenden Abhängigkeit von HER2-Signalen zurückgeführt. Dies weist darauf hin, dass STAT3 nicht ausschließlich Resistenzmechanismen vermittelt, sondern unter bestimmten Bedingungen auch die Wirksamkeit von TKIs wie Lapatinib steigern kann [189]. In der Gesamtheit konnten wir jedoch nachweisen, dass der STAT3-Signalweg die Makrophagen-induzierte Lapatinib-Resistenz vermittelt und die Makrophagen-induzierte Proliferation möglicherweise über die Aktivierung der Signalwege AKT und ERK erfolgt. Um dies genauer zu prüfen, wären weitere mechanistische Experimente notwendig gewesen, die nicht mehr Teil dieses Projektes waren.

Im ersten Teil der Arbeit stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Infiltration von Makrophagen und der Tumorprogression und dem Gesamtüberleben von GEAC-Patienten dar. Dabei konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Aktivierung des STAT3-Signalwegs auch mit der Menge der CD68- und CD163-positiven Makrophagen korreliert. Ob die STAT3-Aktivierung auch mit der Tumorprogression und dem Gesamtüberleben der GEAC-Patienten korreliert, wurde anschließend mit Hilfe des GEAC-TMA untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des STAT3-Signalwegs keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der GEAC-Patienten hat. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die Stärke der STAT3-Phosphorylierung als auch die Höhe der prozentualen STAT3-Translokation mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen zusammenhängt. Folglich könnte man annehmen, dass Makrophagen die Tumorprogression von GEAC-Patienten nur zu einem gewissen Grad über STAT3-unabhängige Mechanismen vermitteln. Andererseits zeigte sich, obwohl statistisch nicht signifikant, dass das mediane Gesamtüberleben deutlich kürzer ist, sobald eine starke STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Das spiegelte sich auch in der geringeren 5-ÜLR wieder. So könnte die fehlende statistische Signifikanz auch durch die geringe Kohortengröße bzw. statistische Power zu erklären sein. Es ist denkbar, dass in größeren GEAC-Kohorten ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivierung und dem Gesamtüberleben nachweisbar wäre. Eine Studie aus dem Jahr 2022 zeigte allerdings einen relevanten Zusammenhang zwischen der STAT3-Aktivierung und klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Gesamtüberleben bei lediglich 91 GEAC-Patienten, sodass auch methodische und systematische Unterschiede eine Rolle für die abweichenden Beobachtungen spielen könnten [365]. Zusätzlich könnte auch die Heterogenität der Patientenkohorte die Zusammenhänge abschwächen. Darüber hinaus wird die Komplexität der STAT3-Funktion durch die divergenten Befunde einer weiteren Studie deutlich. Hier zeigten die Autoren, dass eine starke STAT3-Phosphorylierung, insbesondere in Tumorzellen, die am Rand des Tumors lokalisiert waren, mit einem signifikant längeren Gesamtüberleben von GEAC-Patienten assoziiert war [366]. Zusammenfassend zeigte jedoch die Mehrheit der Studien inklusive umfangreicher Metaanalysen über viele Tumorentitäten hinweg, dass STAT3 mit einer ungünstigen Prognose der Patienten zusammenhängt [367–373]. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Interaktion der Tumorzellen mit Makrophagen ein sehr

komplexes Netzwerk darstellt und es somit wahrscheinlicher ist, dass Makrophagen ihren Einfluss auf GEAC-Zellen nicht nur über den STAT3-Signalweg vermitteln, sondern vielmehr in Kombination mit anderen Signalwegen (AKT, ERK, NF- κ B) [374–376].

Um die Rolle der STAT3-Phosphorylierung als Signalweg der makrophagenvermittelten Lapatinibresistenz weiter zu bestätigen, sind noch ergänzende Untersuchungen nötig. Dabei sollten weitere mechanistische Experimente durchgeführt werden, wie z. B. die Generierung einer STAT3-überexprimierenden Zelllinie, um zu testen, ob die Lapatinib-Resistenz darunter wiederhergestellt werden kann. Darüber hinaus sollten *in vivo*-Experimente durchgeführt werden. Um die klinische Relevanz zu analysieren, sollte die Stärke der STAT3-Phosphorylierung in Tumorgeweben von GEAC-Patienten untersucht werden, die unter zielgerichteter HER2-Therapie einen Progress aufzeigten. Sofern diese Experimente die Rolle von STAT3 in der Lapatinib-Resistenz weiter bestätigen, sollte STAT3 als therapeutisches Ziel in HER2-resistenten GEAC-Patienten systematisch untersucht werden. Der bisher am umfassendsten untersuchte STAT3-Inhibitor ist Napabucasin. Dieser konnte trotz initial präklinisch positiver Befunde in der multizentrischen placebo-kontrollierten Phase-III-Studie (BRIGHTER) keinen Überlebensvorteil in GEAC-Patienten nachweisen. Dabei untersuchte man bei bereits vorbehandelten GEAC-Patienten, ob die zusätzliche Gabe von Napabucasin zu Paclitaxel das Gesamtüberleben und das PFS verbessern könnte. Obwohl die Kombinationstherapie gut vertragen wurde, betrug das mediane Gesamtüberleben in der Napabucasin-Gruppe 6,9 Monate gegenüber 7,3 Monaten in der Placebo-Gruppe. Auch das PFS lag bei 3,5 Monaten in der Napabucasin-Gruppe und bei 3,6 Monaten in der Placebo-Gruppe. Eine Subgruppen-Analyse wurde jedoch in dieser Studie nicht durchgeführt [377]. Auch in weiteren großen klinischen Studien konnte die zusätzliche Gabe von Napabucasin das Gesamtüberleben der Patienten nicht verbessern [378–380]. Diese Beobachtung unterstützt die Befunde der vorliegenden Arbeit, denn ein proliferationsfördernder Effekt konnte nicht mit einer STAT3-Aktivierung in Verbindung gebracht werden. Obwohl Napabucasin *in vitro* einen wachstumshemmenden Effekt zeigte, war dieser unter STAT3-Knockdown nicht zu beobachten, sodass eine STAT3-Inhibition zwar einen guten Ansatz darstellen könnte, eine Lapatinib-Resistenz zu überwinden, aber wahrscheinlich nicht ausreichen wird, um das Makrophagen-vermittelte Tumorwachstum oder das Tumorwachstum im Allgemeinen zu stoppen. Effektive Therapieansätze könnten Kombinationen aus STAT3-Inhibitoren und der Blockade weiterer Signalwege darstellen (z. B. MEK/ERK oder PI3K/AKT). Eine weitere Möglichkeit stellt die Neutralisierung des makrophagensekretierenden Faktors dar, welcher die Signalwege STAT3, AKT und ERK stimuliert. Um diesen zu identifizieren, wurden im Rahmen des vorliegenden Projektes umfangreiche Sekretom-Analysen der Zellkultur-Überstände durchgeführt. Diese Analyse identifizierte eine Reihe differenziell sekretierter löslicher Faktoren, deren Einfluss in Kapitel 4.4 genauer untersucht wurde.

5.4 PDGF-AA/PDGFR α als zentraler Mechanismus der Makrophagen-induzierten GEAC-Progression und HER2-Therapieresistenz

Das Tumor-Stroma stellt eine hochdynamische und sich ständig ändernde Mikroumgebung dar, die durch komplexe Interaktionen das biologische Verhalten von Tumoren maßgeblich beeinflusst. Dabei können Tumorzellen sowohl miteinander als auch mit verschiedenen Stromazellen und der ECM interagieren. Auch Stromazellen interagieren untereinander, wodurch sie wiederum Auswirkungen auf die Tumorzellen haben können. [381]. Es ist jedoch allgemein bekannt, dass die Tumor-Stroma-Interaktion die Proliferation, die Metastasierung und das Ansprechen auf Therapien eines Tumors beeinflussen kann. Dabei erfolgt die Interaktion über verschiedene direkte und indirekte Mechanismen. Während direkte Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte die unmittelbare Nähe der Tumorzellen mit dem Stroma erfordern, können die indirekten Interaktionen über lösliche Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren auch über größere Distanzen erfolgen. Dadurch sind Tumorzellen (z. B. des Primärtumors) potenziell dazu in der Lage, mit Stromakomponenten der Fernmetastasen zu interagieren und so die Bildung einer metastatischen Nische zu fördern [382, 383]. Sowohl die direkte als auch die indirekte Tumor-Stroma-Interaktion führen in der Regel zur Aktivierung onkogener Signalwege wie JAK/STAT3, PI3K/AKT und MAPK/ERK und somit zur Änderung des Phänotyps der Tumorzelle. Ein tieferes Verständnis der Tumor-Stroma-Interaktionen liefert wertvolle Erkenntnisse über die Mechanismen der Tumorprogression und kann zur Identifizierung neuer therapeutischer Angriffspunkte beitragen.

Aus diesem Grund untersuchte das vorliegende Projekt, welche löslichen Faktoren von den Makrophagen freigesetzt werden und wie diese an der Makrophagen-induzierten Proliferation und Lapatinib-Resistenz beteiligt sind. Initial wurden Sekretom-Analysen der Zellkulturüberstände der PT1590-Zellen, der THP-1-Makrophagen und der PT1590 + THP-1-Kokultur sowie der Lapatinib-behandelten PT1590 + THP-1-Kokultur untersucht. Hier konnten 15 differenziell sekretierte Faktoren identifiziert werden, deren wachstumsfördernde Wirkung sowie ihr potenzieller Beitrag zur Induktion einer Lapatinib-Resistenz anschließend näher untersucht worden sind. Gleichzeitig wurde mithilfe von GSEA-Analysen geprüft, ob funktionelle Gensets überrepräsentiert exprimiert waren und in Zusammenhang mit den differenziell sekretierten Faktoren standen. Durch diese Analyse konnte der Wachstumsfaktor PDGF-AA als potenzieller Kandidat der Makrophagen-induzierten Proliferation und Lapatinib-Resistenz in den GEAC-Zellen identifiziert werden. PDGF-AA gehört zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, die physiologisch in der Embryonalentwicklung, Wundheilung, Angiogenese sowie Differenzierung von Mesenchymzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle spielen. Die PDGF-Familie um-

fasst vier verschiedene Isoformen (A, B, C, D), die jeweils als Homo- oder Heterodimere vorliegen können (z. B. PDGF-AA, -BB, -CC, -DD sowie PDGF-AB). Je nachdem, welches Dimer vorliegt, wird ein bestimmter Rezeptor bevorzugt. So bindet PDGF-AA ausschließlich an die PDGFR α Homodimere, während PDGF-AB sowohl PDGFR- $\alpha\alpha$ als auch PDGFR- $\alpha\beta$ aktivieren kann. Grundsätzlich führt die Bindung des PDGF-Liganden am korrespondierenden Rezeptor zur Rezeptordimerisierung mit Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne sowie der konsekutiven Aktivierung verschiedener Signalwege wie PI3K/AKT, MEK/ERK, JAK/STAT3 und PLC γ /PKC. Eine vermehrte Aktivierung des PDGF/PDGFR-Signalwegs wurde bereits mit Tumorproliferation, Migration und Angiogenese in Verbindung gebracht [384].

Weitere Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die auf ihre Fähigkeit hin untersucht worden sind, das Ansprechen auf Lapatinib zu beeinflussen, waren CCL3, CCL20, IL-8, Osteopontin und RANTES. Keiner dieser Faktoren konnte das Tumorstadium fördern oder eine Lapatinib-Resistenz vermitteln. Während für die Faktoren CCL3, CCL20, Osteopontin und RANTES bisher keine Daten hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der Ausbildung einer Lapatinib-Resistenz vorliegen, stehen die vorliegenden Befunde für das Chemokin IL-8 jedoch im Widerspruch zu bereits publizierten Daten. So konnten Ahmed *et al.*, demonstrieren, dass die Stimulation der SKBR3-Mammakarzinomzelllinie mit IL-8 über die Aktivierung eines Src/EGFR/Erk1/2- und STAT3-Signalwegs eine Lapatinib-Resistenz fördert [210]. Diese unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich möglicherweise durch folgende Aspekte erklären. Zunächst könnte die im vorliegenden Projekt verwendete GEAC-Zelllinie PT1590 den korrespondierenden Rezeptor für IL-8 (CXCR1/CXCR2) nicht exprimieren und somit gar nicht auf IL-8 reagieren können. Darüber hinaus nutzten die Autoren eine deutlich höhere Konzentration von IL-8 (100 ng/ml), was die unterschiedlich erhobenen Befunde auch erklären könnte. Zusätzlich könnten noch weitaus kompliziertere Ursachen eine Rolle spielen, wie z. B. genetische Unterschiede, unterschiedliche Aktivierungszustände der untersuchten Signalwege oder die Expression von antagonistischen Rezeptoren [385–387].

Nachdem PDGF-AA als potenzieller Mediator der Makrophagen vermittelten Proliferation und Lapatinib-Resistenz identifiziert wurde, wurde in einem nächsten Schritt verifiziert, ob Makrophagen tatsächlich die Quelle des PDGF-AA sind. Da der Nachweis von PDGF-AA im Zellkulturüberstand der THP-1 + PT1590-Kokultur keine Informationen über die zelluläre Quelle liefert, wurden zunächst qPCR-Analysen durchgeführt. Hier bestätigte sich, dass die THP-1-Makrophagen die Quelle des PDGF-AA sind. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass durch die Anwesenheit der PT1590-Zellen die Expression des *PDGFA* in den THP-1-Makrophagen verstärkt wurde. Allerdings zeigten sich keine höheren Mengen des PDGF-AA in der Kokultur im Vergleich zur THP-1-Monokultur. Somit deuten die Befunde darauf hin, dass die THP-1-Makrophagen bereits eine hohe basale Menge des PDGF-AA aufweisen und diese für die Effekte in den PT1590-Zellen ausreicht. Dass keine höheren Mengen des PDGF-AA im Kokulturüberstand nachzuweisen

waren, könnte durch einen Verbrauch des PDGF-AA zu erklären sein. Denn durch die Bindung des PDGF-AA an den korrespondierenden Rezeptor ist dieses nicht mehr als freies, lösliches PDGF-AA mittels ELISA-Verfahren nachzuweisen. Dass THP-1-Makrophagen PDGF-AA bilden können, wurde bereits durch einige Studien demonstriert. So zeigte eine Forschungsarbeit, dass THP-1-Makrophagen durch die Stimulation mit konditioniertem Medium einer Zervixkarzinomzelllinie erhöhte Mengen PDGF-AA sezernieren [388]. Eine weitere Studie zeigte, dass THP-1-Makrophagen durch die Stimulation mit einer oxidierten Form des „Low-Density-Lipoproteins“ PDGF-AA freisetzen [389]. Da THP-1-Makrophagen lediglich ein Modell von Makrophagen darstellen, können die Ergebnisse nicht auf die *in vivo*-Situation übertragen werden. Deshalb wurde die klinische Relevanz mit Hilfe des GEAC cDNA Microarrays und immunhistologischer Analysen von Tumorgewebe von GEAC-Patienten noch weiter untersucht. Hier zeigte sich initial, dass sowohl die Expression von *CD68* als auch die von *CD163* signifikant mit der Expression von *PDGFA* korreliert. Darüber hinaus konnte mit Hilfe einer RNAScope-Analyse von GEAC-Tumorgewebe nachgewiesen werden, dass *CD68*-positive Makrophagen *PDGFA* exprimieren. Gleichzeitig ergab die Analyse, dass es weitere Quellen für *PDGFA* gibt und dass sich bei einigen Patienten auch eine sehr starke Expression von *PDGFA* in den Tumorzellen selbst nachweisen ließ. Durch den Nachweis von PDGF-AA im Tumorgewebe und im umliegenden Stroma lässt sich eine zentrale Rolle von PDGF-AA in der Tumorbilogie des GEAC ableiten. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass Makrophagen nicht die einzige Quelle einer PDGF-AA-abhängigen Tumorprogression darstellen, sondern weitere stromale und möglicherweise auch die Tumorzellen selbst über autokrine Mechanismen hierzu beitragen. Dass PDGF-AA an der Makrophagen-induzierten Tumorprogression beteiligt sein könnte, wurde bereits in einigen Untersuchungen nachgewiesen. So zeigte eine Studie in einem orthotopen Xenograft-Mausmodell für Ovarialkarzinome, dass täglicher Immobilisationsstress zu einem gesteigerten Tumorwachstum und zu einer verstärkten Infiltration von *CD68*-positiven Makrophagen führte. Diese Makrophagen bildeten daraufhin vermehrt PDGF-AA, welches durch die Depletion der intratumoralen Makrophagen mittels Zoledronsäure nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass eine erhöhte *PDGFA*-Expression mit einem reduzierten Gesamtüberleben von Ovarialkarzinom-Patienten korreliert. In dieser Studie fehlten jedoch die mechanistischen Analysen, dass PDGF-AA der Mediator des stressinduzierten Tumorwachstums ist [390]. Die RNAScope-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass neben Makrophagen auch andere Zellen des Stromas und die Tumorzellen selbst PDGF-AA bilden. Diese Beobachtung konnte in einer 2006 veröffentlichten Studie bestätigt werden und verdeutlicht darüber hinaus die komplexe Rolle von PDGF-AA im Tumor-Stroma. Denn die Autoren konnten nachweisen, dass PDGF-AA, welches von Bronchialkarzinomzellen freigesetzt wurde, Fibroblasten rekrutiert und diese über den PDGFR α aktiviert. Diese Aktivierung führte wiederum zur Stimulation des Tumorwachstums [391].

In einem nächsten Schritt wurden im Rahmen des vorliegenden Projekts mechanisti-

sche Experimente durchgeführt, um die Rolle von PDGF-AA in der durch die Makrophagen vermittelte Proliferation und Lapatinib-Resistenz zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst untersucht, ob PDGF-AA die Proliferation von GEAC-Zellen stimulieren kann und ob PDGF-AA in der GEAC-Zelllinie PT1590 eine Aktivierung der Signalwege STAT3, AKT und ERK induzieren kann. Hier zeigte sich zunächst, dass die Stimulation der PT1590-Zellen mit PDGF-AA zu einem erhöhten Ki-67-Proliferationsindex führte und dass unter PDGF-AA-Stimulation eine zeitabhängige Aktivierung der Signalwege STAT3, AKT und ERK zu beobachten war. Hier stellte sich die AKT-Phosphorylierung deutlich stärker dar als die ERK- und STAT3-Phosphorylierung. Darüber hinaus zeigte sich ein erneuter Anstieg der STAT3-Phosphorylierung nach 24 Stunden. Dass PDGF-AA als Wachstumsfaktor die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen kann, wurde bereits in verschiedenen Studien zum Mammakarzinom [392], Glioblastom [393–396], gastrointestinalen Stromatumor [397, 398], Osteosarkomen [399, 400] und Lymphomen [401] gezeigt. Bislang ist eine durch PDGF-AA vermittelte STAT3-Aktivierung lediglich in einem Glioblastom-Modell beschrieben. Dabei induzierte die PDGF-AA-Stimulation von Glioblastom-Krebsstammzellen eine STAT3-Phosphorylierung mit einem biphasischen Verlauf, der analog zu unseren Daten, nach 24 Stunden erneut einen Anstieg zeigte. Hier diskutierten die Autoren, dass durch PDGF-AA ein positiver Rückkopplungsmechanismus induziert wird. So könnte z. B. die PDGF-AA-Stimulation über die Aktivierung von STAT3 die Genexpression von Zytokinen wie IL-6 bewirken und diese wiederum über andere Rezeptoren eine verzögerte STAT3-Phosphorylierung induzieren [395]. Die Western-Blot-Analysen zeigten zudem, dass PDGF-AA vor allem die Phosphorylierung von AKT in den PT1590-Zellen bewirkt. Ein vergleichbarer Befund konnte in den Mammakarzinomzelllinien BT474 und MDA-MB-231 erhoben werden. Hier zeigten die Autoren, dass der Transkriptionsfaktor FoxM1 die Expression von *PDGFRA* induziert und dieses wiederum über die Aktivierung von AKT die Proliferation der Zelllinien fördert [402]. Das vorliegende Projekt konnte zudem erstmals zeigen, dass die Behandlung der PT1590-Zellen mit PDGF-AA die Wirksamkeit von Lapatinib deutlich reduzierte. Da das Homodimer PDGF-AA ausschließlich an den PDGFR α bindet, wurde zunächst untersucht, welche der in diesem Projekt verwendeten GEAC-Zelllinien diesen Rezeptor exprimieren. Es zeigte sich, dass die Zelllinien PT1590 und PT6216 den PDGFR α exprimieren, während die Zelllinien LN1590, NCI-N87, SKGT4 und OE33 keine Expression aufwiesen. Dieser Befund erklärt, warum unter den GEAC-Zellen die PT1590-Zelllinie am stärksten durch die Anwesenheit der THP-1-Makrophagen beeinflusst wird. Darüber hinaus ist das Fehlen des PDGFR α in den NCI-N87-Zellen eine weitere Erklärung, warum diese Zellen unter dem Einfluss der Makrophagen zwar eine verminderte Sensitivität gegenüber Lapatinib zeigen, jedoch weiterhin eine wachstumshemmende Wirkung nachweisbar ist. Hier muss von einem alternativen Mechanismus der Makrophagen vermittelten Lapatinib-Resistenz ausgegangen werden. Da die NCI-N87-Zellen nach der Kokultur ebenfalls eine starke STAT3-Aktivierung aufwiesen, könnten vermutlich die Zytokine IL-6, IL-8 oder TNF α

an der Ausbildung der Lapatinib-Resistenz beteiligt sein. Interessanterweise ließ sich der PDGFR α in den PT6216-Zellen nachweisen, obwohl diese unter dem Einfluss der THP-1-Makrophagen einen reduzierten Anteil vitaler Zellen aufwiesen. Im Rahmen des Projektes wurden diese Zellen jedoch nicht mit PDGF-AA stimuliert, sodass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob durch die Stimulation mit PDGF-AA proliferationsfördernde Signalwege wie AKT aktiviert werden können. Deshalb könnte die Reduktion der PT6216-Zellen unter THP-1-Kokultur durch verschiedene PDGFR α -unabhängige Mechanismen zu erklären sein. So könnten die THP-1-Makrophagen Faktoren wie TRAIL, Fas-Ligand oder ROS freisetzen, die Zellstress und Apoptose in den PT6216-Zellen induzieren. Im Rahmen des Projekts wurde allerdings nicht näher untersucht, ob die Zellen im Rahmen der THP-1-Kokultur eine Apoptose zeigen.

Zusätzlich konnte in den PT1590-Zellen durch Knockdown-Experimente und pharmakologische Hemmversuche des PDGFR α mit Crenolanib sowie antikörpervermittelte Neutralisation von PDGF-AA das Ansprechen auf Lapatinib in der Makrophagen-Kokultur wiederhergestellt werden. Darüber hinaus konnte durch den Funktionsverlust des PDGFR α die Makrophagen vermittelte Proliferation sowie die AKT- und ERK-Aktivierung der PT1590-Zellen aufgehoben werden. Interessanterweise blieb die Makrophagen-induzierte STAT3-Aktivierung auch unter PDGFR α -Knockdown erhalten. Dies erscheint widersprüchlich, da auch der Knockdown von STAT3 die Resistenz aufhebt. In der Zusammenschau lässt sich aus diesen Befunden ableiten, dass die Makrophagen durch Freisetzung von PDGF-AA einen PDGFR α /AKT-Signalweg aktivieren, welcher die Proliferation fördert und die Lapatinib-Resistenz vermittelt. Die fortbestehende STAT3-Phosphorylierung trotz Funktionsverlust von PDGFR α unterstützt die Annahme, dass die STAT3-Aktivierung nicht der primäre, aber dennoch ein beteiligter Signalweg für die Lapatinib-Resistenz ist. So könnte es sein, dass die PT1590-Zellen über beide Signalwege die Resistenz vermitteln, wobei AKT offenbar der wichtigere Signalweg ist. Zudem ist davon auszugehen, dass der STAT3-Signalweg durch andere Zytokine aktiviert wird. In weiterführenden Experimenten, die nicht Teil des vorliegenden Projekts waren, konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Zytokine und Chemokine CCL19/20, CCL3, IL-6, IL-8, Osteopontin, GDF-15 und RANTES keine STAT3-Aktivierung induzieren. Es könnte jedoch auch möglich sein, dass durch PDGF-AA die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert wird und diese anschließend über einen autokrinen und PDGFR α -unabhängigen Signalweg STAT3 aktivieren. Damit ließe sich auch die weiterhin erhaltene STAT3-Aktivierung nach PDGFR α -Knockdown erklären. Obwohl bisher keine vergleichbaren Daten erhoben worden sind, konnten erste Hinweise für eine entscheidende Rolle des PDGFR α in der Entwicklung von Therapieresistenzen im HER2-positiven Mammakarzinom gewonnen werden. Hier zeigten die Autoren, dass Trastuzumab-resistente Mammakarzinomzelllinien erhöhte Mengen des PDGFR α aufwiesen. Parallel bildeten die Trastuzumab-resistenten Zellen vermehrt IL-6, welches zu einer Aktivierung des STAT3-Signalwegs führte. Durch die pharmakologische Inhibition des PDGFR α mit Ponatinib konnten die IL-6-Sekretion und die STAT3-Phosphorylierung

reduziert sowie das Ansprechen auf Trastuzumab wiederhergestellt werden. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass eine hohe *PDGFRA*-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Mammakarzinom-Patienten assoziiert ist [403]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass Plattenepithelkarzinomzellen in der Kokultur mit mesenchymalen Stammzellen vermehrt PDGF-AA sezernieren, welches über einen autokrinen Mechanismus den PDGFR α aktiviert und dadurch über den AKT-Signalweg das Ansprechen auf das Zytostatikum Cisplatin vermindert [404]. Daten aus der Melanomforschung liefern zusätzliche indirekte Evidenz für die Bedeutung des PDGF-AA/PDGFR α -Signalwegs in der Entstehung von Therapieresistenzen. Sabbatino *et al.*, konnten zeigen, dass BRAF-resistente Melanomzellen durch die Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Homolog-Signalwegs eine Hochregulation des PDGFR α aufwiesen mit konsekutiver Aktivierung des AKT- und ERK-Signalwegs. Parallel konnte durch Knockdown und pharmakologische Inhibition des PDGFR α die Sensitivität gegenüber dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib wiederhergestellt werden. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass Biopsien von Vemurafenib-resistenten Melanompatienten eine erhöhte PDGFR α -Expression aufwiesen [405]. Eine weitere Studie konnte demonstrieren, dass PDGF-D in Zellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) eine EMT induziert und diese Zellen dadurch nicht mehr auf Gemcitabine ansprechen [406]. Darüber hinaus konnten bereits mehrere Arbeiten demonstrieren, dass der PDGF-AA/PDGFR α -Signalweg mit erhöhter Proliferation und Tumorprogression assoziiert ist [394, 396, 407–412]. Zur weiteren Verifizierung der erhobenen Befunde wurde mithilfe des GEAC-TMA die Aktivierung des PDGFR α im Patientengewebe untersucht. Dazu erfolgte eine immunhistochemische Färbung der phosphorylierten Form des PDGFR α (p-PDGFR α) in Gewebeproben von 239 GEAC-Patienten. Durch diese Befunde konnten wir die Hypothese, dass Makrophagen über die Freisetzung von PDGF-AA den PDGFR α aktivieren können, weiter unterstützen. Denn immunhistochemische Untersuchungen von CD163 und p-PDGFR α zeigten, dass die Aktivierung von p-PDGFR α insbesondere dort zu detektieren war, wo eine hohe Dichte an CD163-positiven Makrophagen nachzuweisen war. Ferner erfolgte eine weitere Analyse, ob die Aktivierung des PDGFR α Einfluss auf die klinische Progression und das Gesamtüberleben von GEAC-Patienten hat. Dabei zeigten 92 % der GEAC-Patienten eine positive Färbung für p-PDGFR α . Unter diesen Patienten zeigten 44,7 % eine starke Färbung für p-PDGFR α . Diese Beobachtung weist auf eine sehr ausgedehnte Aktivierung des PDGFR α -Signalwegs hin. Da in der immunhistochemischen Analyse jedoch ausschließlich die phosphorylierte Form des PDGFR α untersucht wurde, sollte dieser Befund kritisch bewertet werden. Eine ergänzende Analyse der Gesamtmenge an PDGFR α wäre notwendig, um Aktivierung und Expression voneinander abzugrenzen. Dennoch stimmen unsere Befunde mit bereits publizierten Daten überein. So zeigten Goscinski *et al.*, in einer immunhistochemischen Analyse von 28 GEAC-Patienten, dass 100 % der Proben PDGFR α -positiv waren [413]. Eine weitere Studie demonstrierte einen vergleichbaren Befund, bei dem 91 % der GEAC-Patienten eine positive PDGFR α -Expression aufwiesen [414]. In einem nächsten Schritt wurde untersucht,

ob die Aktivierung des PDGFR α einen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Hierfür wurde die Gesamtheit der PDGFR α -Phosphorylierung in negativ, schwach und stark kategorisiert. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben. Allerdings zeigten die Patienten mit fehlender PDGFR α -Phosphorylierung eine tendenziell schlechtere Überlebensrate. Eine mögliche Erklärung könnte ein geringerer Differenzierungsgrad der GEAC-Tumoren sein. Diese Annahme wird u. a. durch Daten zum triple-negativen Mammakarzinom (TNBC) gestützt. Dieser Subtyp ist durch das Fehlen therapeutisch relevanter Transmembranrezeptoren sowie durch eine ungünstige Prognose und einen häufig niedrigen Differenzierungsgrad gekennzeichnet. Obwohl die Mehrheit der publizierten Studien eine Aktivierung des PDGFR α mit einem ungünstigeren Gesamtüberleben in Verbindung bringt, demonstrieren einzelne Arbeiten entgegengesetzte Befunde. So zeigte eine Studie, dass eine hohe Expression von PDGFRA in Pankreaskarzinomen mit einem verlängerten medianen Gesamtüberleben assoziiert war [415]. Eine weitere Untersuchung konnte nachweisen, dass eine starke PDGFRA-Expression in Stromazellen mit einem verlängerten Gesamtüberleben von Bronchialkarzinompatienten korreliert [416]. Weitere Daten zum klarzelligen Nierenzellkarzinom zeigten zudem, dass eine hohe Expression von PDGFB das Tumorwachstum signifikant hemmt und die Sterblichkeit deutlich verringert [417]. Als mögliche Erklärung wird der Einfluss von PDGF-Liganden auf Perizyten herangeführt. Dabei vermuten die Autoren, dass die Aktivierung des PDGF/PDGFR-Signalwegs zur Rekrutierung von Perizyten führt, welche das Endothel der intratumoralen Gefäße stabilisieren und dessen Permeabilität verringern. Dadurch wird die Intravasation der Tumorzellen in das Gefäßsystem vermindert, was mit einer reduzierten Metastasierungsrate und einem verbesserten Gesamtüberleben einhergeht [418].

Da die Lokalisation des PDGFR α einen unterschiedlichen Einfluss auf die Tumorprogression haben kann, wurde in einem weiteren Schritt zwischen der Aktivierung des Rezeptors in Tumorzellen (tum. p-PDGFR α) und im Stroma (strom. p-PDGFR α) unterschieden. Da PDGFR α seine Funktion primär an der Zellmembran vermittelt, wurde ergänzend die spezifisch membranöse Färbung (membr. p-PDGFR α) ausgewertet, um eine bessere Abgrenzung der aktiven Rezeptorpopulation zu ermöglichen. GEAC-Tumoren ohne p-PDGFR α -Nachweis wurden von der Analyse ausgeschlossen, die verbleibenden Proben wurden entsprechend der Färbungsintensität in schwach und stark positive Gruppen eingeteilt. Signifikante Ergebnisse konnten hier vor allem für die membr. p-PDGFR α -Subgruppe erhoben werden. Hier zeigte sich, dass eine starke membr. p-PDGFR α -Färbung mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem deutlich schlechteren Gesamtüberleben korrelierte. Interessanterweise zeigte sich zudem, dass eine hohe p-PDGFR α -Färbung im Tumorstroma eher mit einem niedrigeren Tumorstadium assoziiert war. Einfluss auf das Gesamtüberleben konnte allerdings hier nicht beobachtet werden. Bislang liegen keine veröffentlichten Studien vor, die eine differenzierte Analyse der PDGFR α -Aktivierung durchgeführt haben. Mehrere Arbeiten zeigen jedoch, dass eine hohe PDGFRA-Expression mit Tumorprogression und einem ungünstigeren Gesamtüberleben assoziiert ist. So zeigte eine

Studie aus dem HCC, dass eine erhöhte *PDGFRA*-Expression mit einer erhöhten makroskopischen Gefäßinvasion, einem kürzeren Gesamtüberleben sowie einer höheren Rezidivrate korrelierte [419]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass PDGFR- α -positive Mammakarzinome häufiger Lymphknotenmetastasen und eine HER2-Expression aufwiesen und zudem mit einer ungünstigeren Prognose verbunden waren [420]. In unserer GEAC-Kohorte fand sich ebenfalls ein hoher Anteil von GEAC-Patienten, die sowohl HER2 als auch PDGFR- α exprimierten. Aufgrund der geringen Zahl HER2-positiver Fälle ($n = 11$) waren jedoch keine verlässlichen Subgruppenanalysen möglich. Gleichwohl legen die Befunde nahe, dass eine Koexpression von PDGFR- α und HER2 zur Therapieresistenz beitragen könnte.

Der letzte Teil des vorliegenden Projektes untersuchte, ob PDGF-AA als diagnostischer Biomarker genutzt werden kann. Hierzu wurden Serumproben von GEAC-Patienten auf die Konzentration von PDGF-AA analysiert. Es zeigte sich zunächst, dass keine erhöhten Mengen von PDGF-AA im Serum von GEAC-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten. Das könnte daraufhin deuten, dass PDGF-AA primär lokal im Tumormikromilieu wirkt und diese Menge nicht mit der Menge im Serum korreliert. Darüber hinaus sind adipöse Kontrollpersonen durch eine chronisch erhöhte Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen charakterisiert und stellen daher nur eine bedingt geeignete Vergleichsgruppe dar. Interessanterweise zeigte sich dennoch, dass höhere PDGF-AA-Serumspiegel bei GEAC-Patienten mit einem fortgeschritteneren Tumorstadium und einer geringeren Differenzierung assoziiert waren. Zusätzlich zeigten sich signifikant niedrige PDGF-AA-Spiegel, sobald die GEAC-Patienten eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten. Unter der Annahme, dass die Tumormasse therapiebedingt reduziert wurde, lässt sich aus den Befunden ableiten, dass die Konzentration von PDGF-AA im Serum mit der Tumorgroße korreliert. Einige Studien konnten bereits demonstrieren, dass PDGF-AA im Serum als potenzieller Biomarker zur Abschätzung der Prognose herangezogen werden kann. Dabei zeigte eine Studie, dass erhöhte PDGF-AA-Spiegel im Serum und im Blut der intraoperativen venösen Drainage bei Patienten mit kolorektalem Karzinom mit einem höheren Risiko für die Entwicklung von Fernmetastasen korrelierten [421]. Eine weitere Arbeit zeigte, dass bei Patienten mit einem oralen Plattenepithelkarzinom erhöhte Mengen PDGF-AA im Serum nachgewiesen werden konnten. Diese korrelierte signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und mit einem schlechteren Gesamtüberleben [422].

In der Zusammenschau der Befunde liefert die vorliegende Arbeit deutliche Hinweise darauf, dass Makrophagen durch die Freisetzung von PDGF-AA und die konsekutive Aktivierung des PDGFR- α /AKT-Signalwegs die Proliferation von Tumorzellen erhöhen, das Ansprechen auf Lapatinib vermindern und somit insgesamt die Krankheitsprogression fördern. Auf Grundlage dieser Ergebnisse stellt die Behandlung von PDGFR- α -positiven Patienten mit einem spezifischen PDGFR- α -Inhibitor (z. B. Crenolanib) eine potenzielle Therapiemöglichkeit dar. Besonders bei HER2-positiven, therapierefraktären GEAC-

Patienten sollte eine mögliche Koexpression von PDGFR- α in Betracht gezogen werden. In diesem Kontext könnte eine Kombinationstherapie aus Crenolanib und HER2-gerichteten Substanzen einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Prognose dieser Patientengruppe darstellen.

Literaturverzeichnis

- [1] Jesper Lagergren, Elizabeth Smyth, David Cunningham, and Pernilla Lagergren. Oesophageal cancer. *The Lancet*, 390(10110):2383–2396, 2017. ISSN 01406736. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31462-9.
- [2] Dustin J. Uhlenhopp, Eric Omar Then, Tagore Sunkara, and Vinaya Gaduputi. Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 13(6):1010–1021, 2020. ISSN 1865-7265. doi: 10.1007/s12328-020-01237-x. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s12328-020-01237-x>.
- [3] Friederike Erdmann, Claudia Spix, Alexander Katalinic, Monika Christ, Juliane Folkerts, Jutta Hansmann, Kristine Kranzhöfer, Beatrice Kunz, Katrin Manegold, Andrea Penzkofer, Kornelia Tremml, Grit Vollmer, Susanne Weg-Remers, Benjamin Barnes, Nina Buttmann-Schweiger, Stefan Dahm, Julia Fiebig, Manuela Franke, Ina Gurung-Schönfeld, Jörg Haberland, Maren Imhoff, Klaus Kraywinkel, Anne Starker, Petra von Berenberg-Gossler, and Antje Wienecke. Krebs in deutschland für 2017/2018.
- [4] K. Visrodia, S. Singh, R. Krishnamoorthi, D. A. Ahlquist, K. K. Wang, P. G. Iyer, and D. A. Katzka. Systematic review with meta-analysis: prevalent vs. incident oesophageal adenocarcinoma and high-grade dysplasia in barrett's oesophagus. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 44(8):775–784, 2016. doi: 10.1111/apt.13783.
- [5] Helen G. Coleman, Shao-Hua Xie, and Jesper Lagergren. The epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 154(2):390–405, 2018. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.046.
- [6] Klaus Kraywinkel and Nina Buttmann-Schweiger. Epidemiologie bösartiger tumoren der speiseröhre in deutschland unter berücksichtigung der histologischen typen. *Der Onkologe*, 26(4):311–316, 2020. ISSN 1433-0415. doi: 10.1007/s00761-020-00735-4. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s00761-020-00735-4>.
- [7] Chin Hur, Melecia Miller, Chung Yin Kong, Emily C. Dowling, Kevin J. Nattinger, Michelle Dunn, and Eric J. Feuer. Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer*, 119(6):1149–1158, 2013. doi: 10.1002/cncr.27834.
- [8] Joel H. Rubenstein and Nicholas J. Shaheen. Epidemiology, diagnosis, and management of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 149(2):302–17.e1, 2015. doi: 10.1053/j.gastro.2015.04.053.
- [9] Jens Hoeppner, Torben Glatz, Rainer Claus, Andreas Fischer, Klaus Kraywinkel, and Thomas Brunner. Das adenokarzinom des ösophagus – bestandsaufnahme einer drastisch zunehmenden erkrankung. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 142(19):1453–1460, 2017. doi: 10.1055/s-0043-115777.

- [10] Klaus Kraywinkel and Nina Buttmann-Schweiger. Epidemiologie bösartiger tumoren der speiseröhre in deutschland unter berücksichtigung der histologischen typen. *Der Onkologe*, 26(4):311–316, 2020. ISSN 1433-0415. doi: 10.1007/s00761-020-00735-4. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s00761-020-00735-4>.
- [11] María José Domper Arnal, Ángel Ferrández Arenas, and Ángel Lanás Arbeloa. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in western and eastern countries. *World journal of gastroenterology*, 21(26):7933–7943, 2015. doi: 10.3748/wjg.v21.i26.7933.
- [12] Deborah Saraggi, Matteo Fassan, Jan Bornschein, Fabio Farinati, Stefano Realdon, Nicola Valeri, and Massimo Rugge. From barrett metaplasia to esophageal adenocarcinoma: the molecular background. *Histology and histopathology*, 31(1):25–32, 2016. ISSN 1699-5848. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26334343/>.
- [13] Jason B. Wheeler and Carolyn E. Reed. Epidemiology of esophageal cancer. *The Surgical clinics of North America*, 92(5):1077–1087, 2012. doi: 10.1016/j.suc.2012.07.008.
- [14] J. Lagergren, R. Bergström, A. Lindgren, and O. Nyrén. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*, 340(11):825–831, 1999. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM199903183401101.
- [15] Cathrine Hoyo, Michael B. Cook, Farin Kamangar, Neal D. Freedman, David C. Whiteman, Leslie Bernstein, Linda M. Brown, Harvey A. Risch, Weimin Ye, Linda Sharp, Anna H. Wu, Mary H. Ward, Alan G. Casson, Liam J. Murray, Douglas A. Corley, Olof Nyrén, Nirmala Pandeya, Thomas L. Vaughan, Wong-Ho Chow, and Marilie D. Gammon. Body mass index in relation to oesophageal and oesophagogastric junction adenocarcinomas: a pooled analysis from the international beacon consortium. *International journal of epidemiology*, 41(6):1706–1718, 2012. doi: 10.1093/ije/dys176.
- [16] Annika Steffen, José-Maria Huerta, Elisabete Weiderpass, H. B. As Bueno-de Mesquita, Anne M. May, Peter D. Siersema, Rudolf Kaaks, Jasmine Neamat-Allah, Valeria Pala, Salvatore Panico, Calogero Saieva, Rosario Tumino, Alessio Naccarati, Miren Dorronsoro, Emilio Sánchez-Cantalejo, Eva Ardanaz, J. Ramón Quirós, Bodil Ohlsson, Mattias Johansson, Bengt Wallner, Kim Overvad, Jytte Halkjaer, Anne Tjønneland, Guy Fagherazzi, Antoine Racine, Françoise Clavel-Chapelon, Tim J. Key, Kay-Tee Khaw, Nick Wareham, Pagona Lagiou, Christina Bamia, Antonia Trichopoulou, Pietro Ferrari, Heinz Freisling, Yunxia Lu, Elio Riboli, Amanda J. Cross, Carlos A. Gonzalez, and Heiner Boeing. General and abdominal obesity and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma in the european prospective investigation into cancer and nutrition. *International journal of cancer*, 137(3):646–657, 2015. doi: 10.1002/ijc.29432.
- [17] Shi-Hao Zhang, Yan Wang, Hejie Wang, Menglan Zhong, Xiaona Qi, and Shao-Hua Xie. Metabolic syndrome and risk of esophageal cancer by histological type: Systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Cancer Epidemiology*, 97:102849, 2025. ISSN 1877-7821. doi: 10.1016/j.canep.2025.102849. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877782125001092>.
- [18] Jennifer Drahos, Lin Li, Susan S. Jick, and Michael B. Cook. Metabolic syndrome in relation to barrett’s esophagus and esophageal adenocarcinoma: Results from a large population-based case-control study in the clinical practice research datalink. *Cancer Epidemiology*, 42:9–14, 2016. ISSN 1877-7821. doi: 10.1016/j.canep.2016.02.008.

- [19] Jennifer Drahos, Winnie Ricker, Ruth Parsons, Ruth M. Pfeiffer, Joan L. Warren, and Michael B. Cook. Metabolic syndrome increases risk of barrett esophagus in the absence of gastroesophageal reflux: an analysis of seer-medicare data. *Journal of clinical gastroenterology*, 49(4):282–288, 2015. doi: 10.1097/MCG.000000000000119.
- [20] Mie Thu Ko, Tom Thomas, Emily Holden, Ian L. P. Beales, and Leo Alexandre. The association between obesity and malignant progression of barrett’s esophagus: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 23(5):726–738.e28, 2025. ISSN 1542-7714. doi: 10.1016/j.cgh.2024.07.041. URL [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(24\)00796-1/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(24)00796-1/fulltext).
- [21] Kais Antonios, Daniel Aintabi, Patricia McNally, Elliot Berinstein, Priyata Dutta, Nicholas Sampson, Sichao Wang, Claudia Villarreal Carrillo, Brahm Singh, Marjan Haider, and Richard A. Shellenberger. Risk factors for the development of barrett’s esophagus and esophageal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer reports (Hoboken, N.J.)*, 8(3):e70168, 2025. doi: 10.1002/cnr2.70168.
- [22] Pauline A. Zellenrath, Laurelle van Tilburg, Roos E. Pouw, Rena Yadlapati, Yonne Peters, Michael B. Ujiki, Prashanthi N. Thota, Norihisa Ishimura, Stephen J. Meltzer, Noam Peleg, Won-Tak Choi, John V. Reynolds, Alexandros D. Polydorides, Arjun D. Koch, Judith Honing, and Manon C. W. Spaander. Neoplastic progression risk in females with barrett’s esophagus: A systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 23(2):225–235.e8, 2025. ISSN 1542-7714. doi: 10.1016/j.cgh.2024.06.053. URL [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(24\)00865-6/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(24)00865-6/fulltext).
- [23] T. L. Vaughan, S. Davis, A. Kristal, and D. B. Thomas. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 4(2):85–92, 1995. ISSN 1055-9965. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7742727/>.
- [24] Chenglou Zhu, Wenhan Liu, Dongping Hu, and Lingzhi Peng. Risk of esophageal adenocarcinoma after bariatric surgery: A meta-analysis of retrospective studies. *Obesity surgery*, 34(5):1726–1736, 2024. doi: 10.1007/s11695-024-07190-9.
- [25] Jing Lv, Lei Guo, Ji-Jun Liu, He-Ping Zhao, Jun Zhang, and Ji-Han Wang. Alteration of the esophageal microbiota in barrett’s esophagus and esophageal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology*, 25(18):2149–2161, 2019. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v25.i18.2149.
- [26] Huiqin Gao, Lunan Li, Chenjing Zhang, Jiangfeng Tu, Xiaoge Geng, Jingya Wang, Xiaolu Zhou, Jiyong Jing, and Wensheng Pan. Systematic review with meta-analysis: Association of helicobacter pylori infection with esophageal cancer. *Gastroenterology research and practice*, 2019:1953497, 2019. ISSN 1687-6121. doi: 10.1155/2019/1953497.
- [27] Farhad Islami and Farin Kamangar. Helicobacter pylori and esophageal cancer risk: a meta-analysis. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 1(5):329–338, 2008. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0109.
- [28] Rick Maity, Arkadeep Dhali, and Jyotirmoy Biswas. Is helicobacter pylori infection protective against esophageal cancer? *World journal of gastroenterology*, 30(38):4168–4174, 2024. doi: 10.3748/wjg.v30.i38.4168.

- [29] S. Nie, T. Chen, X. Yang, P. Huai, and M. Lu. Association of helicobacter pylori infection with esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*, 27(7): 645–653, 2014. doi: 10.1111/dote.12194.
- [30] Theodoros Rokkas, Dimitrios Pistiolas, Panos Sechopoulos, Ioannis Robotis, and Georgios Margantinis. Relationship between helicobacter pylori infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(12):1413–7, 1417.e1–2, 2007. ISSN 1542-7714. doi: 10.1016/j.cgh.2007.08.010.
- [31] Fa-Jun Xie. Helicobacter pylori infection and esophageal cancer risk: An updated meta-analysis. *World journal of gastroenterology*, 19(36):6098, 2013. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v19.i36.6098.
- [32] Xianlu Zhuo, Yao Zhang, Yan Wang, Wenlei Zhuo, Yi Zhu, and Xueyuan Zhang. Helicobacter pylori infection and oesophageal cancer risk: association studies via evidence-based meta-analyses. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 20(10):757–762, 2008. ISSN 0936-6555. doi: 10.1016/j.clon.2008.07.005.
- [33] Anna M. J. van Nistelrooij, Winand N. M. Dinjens, Anja Wagner, Manon C. W. Spaander, J. Jan B. van Lanschot, and Bas P. L. Wijnhoven. Hereditary factors in esophageal adenocarcinoma. *Gastrointestinal tumors*, 1(2):93–98, 2014. ISSN 2296-3774. doi: 10.1159/000362575.
- [34] *Prometheus - Innere Organe: LernAtlas der Anatomie ; 121 Tabellen*. Thieme, Stuttgart, 3., überarb. und erw. aufl. edition, 2012. ISBN 9783131395337.
- [35] Chun-Quan Liu, Yun-Lei Ma, Qi Qin, Pei-Hao Wang, Yi Luo, Peng-Fei Xu, and Yong Cui. Epidemiology of esophageal cancer in 2020 and projections to 2030 and 2040. *Thoracic cancer*, 14(1): 3–11, 2023. ISSN 1759-7706. doi: 10.1111/1759-7714.14745.
- [36] Siddharth Singh, Palaniappan Manickam, Anita V. Amin, Niharika Samala, Leo J. Schouten, Prasad G. Iyer, and Tusar K. Desai. Incidence of esophageal adenocarcinoma in barrett's esophagus with low-grade dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointestinal endoscopy*, 79(6):897–909.e4; quiz 983.e1, 983.e3, 2014. doi: 10.1016/j.gie.2014.01.009.
- [37] Amit Rastogi, Srinivas Puli, Hashem B. El-Serag, Ajay Bansal, Sachin Wani, and Prateek Sharma. Incidence of esophageal adenocarcinoma in patients with barrett's esophagus and high-grade dysplasia: a meta-analysis. *Gastrointestinal endoscopy*, 67(3):394–398, 2008. doi: 10.1016/j.gie.2007.07.019.
- [38] Benjamin J. Colley, J. Mark Farrant, Jonathan M. W. Slack, and David Tosh. The role of cdx2 in barrett's metaplasia. *Biochemical Society transactions*, 38(2):364–369, 2010. doi: 10.1042/BST0380364.
- [39] H. Kazumori. Bile acids directly augment caudal related homeobox gene cdx2 expression in oesophageal keratinocytes in barrett's epithelium. *Gut*, 55(1):16–25, 2006. ISSN 0017-5749. doi: 10.1136/gut.2005.066209.
- [40] David J. Morrow, Nelly E. Avissar, Liana Toia, Eileen M. Redmond, Thomas J. Watson, Carolyn Jones, Dan P. Raymond, Virginia Litle, and Jeffrey H. Peters. Pathogenesis of barrett's esophagus: bile acids inhibit the notch signaling pathway with induction of cdx2 gene expression in human esophageal cells. *Surgery*, 146(4):714–21; discussion 721–2, 2009. doi: 10.1016/j.surg.2009.06.050.

- [41] Yuji Tamagawa, Norihisa Ishimura, Goichi Uno, Masahito Aimi, Naoki Oshima, Takafumi Yuki, Shuichi Sato, Shunji Ishihara, and Yoshikazu Kinoshita. Bile acids induce delta-like 1 expression via *cdx2*-dependent pathway in the development of barrett's esophagus. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 96(3):325–337, 2016. doi: 10.1038/labinvest.2015.137.
- [42] Yuji Tamagawa, Norihisa Ishimura, Goichi Uno, Takafumi Yuki, Hideaki Kazumori, Shunji Ishihara, Yuji Amano, and Yoshikazu Kinoshita. Notch signaling pathway and *cdx2* expression in the development of barrett's esophagus. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 92(6):896–909, 2012. doi: 10.1038/labinvest.2012.56.
- [43] Sumera I. Ilyas, Cathrine J. Demars, Andrea Comba, Vladimir G. Gainullin, Zaheer Rizvi, Luciana L. Almada, Kenneth Wang, Gwen Lomberg, Martin E. Fernández-Zapico, and Navtej S. Buttar. Combinatorial chemoprevention reveals a novel smoothened-independent role of *gli1* in esophageal carcinogenesis. *Cancer research*, 70(17):6787–6796, 2010. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0197.
- [44] David H. Wang, Nicholas J. Clemons, Tomoharu Miyashita, Adam J. Dupuy, Wei Zhang, Anette Szczepny, Ian M. Corcoran-Schwartz, Daniel L. Wilburn, Elizabeth A. Montgomery, Jean S. Wang, Nancy A. Jenkins, Neal A. Copeland, John W. Harmon, Wayne A. Phillips, and D. Neil Watkins. Aberrant epithelial-mesenchymal hedgehog signaling characterizes barrett's metaplasia. *Gastroenterology*, 138(5):1810–1822, 2010. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.048.
- [45] David M. Berman, Sunil S. Karhadkar, Anirban Maitra, Rocio Montes De Oca, Meg R. Gerstenblith, Kimberly Briggs, Antony R. Parker, Yutaka Shimada, James R. Eshleman, D. Neil Watkins, and Philip A. Beachy. Widespread requirement for hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425(6960):846–851, 2003. doi: 10.1038/nature01972.
- [46] Katerina Dvorak, Claire M. Payne, Melissa Chavarria, Lois Ramsey, Barbora Dvorakova, Harris Bernstein, Hana Holubec, Richard E. Sampliner, Naihsuan Guy, Amanda Condon, Carol Bernstein, Sylvan B. Green, Anil Prasad, and Harinder S. Garewal. Bile acids in combination with low ph induce oxidative stress and oxidative dna damage: relevance to the pathogenesis of barrett's oesophagus. *Gut*, 56(6):763–771, 2007. ISSN 0017-5749. doi: 10.1136/gut.2006.103697.
- [47] Thomas G. Paulson, Carlo C. Maley, Xiaohong Li, Hongzhe Li, Carissa A. Sanchez, Dennis L. Chao, Robert D. Odze, Thomas L. Vaughan, Patricia L. Blount, and Brian J. Reid. Chromosomal instability and copy number alterations in barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(10):3305–3314, 2009. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2494.
- [48] Ajaz A. Bhat, Heng Lu, Mohammed Soutto, Anthony Capobianco, Priyamvada Rai, Alexander Zaika, and Wael El-Rifai. Exposure of barrett's and esophageal adenocarcinoma cells to bile acids activates *egfr*-*stat3* signaling axis via induction of *ape1*. *Oncogene*, 37(46):6011–6024, 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0388-8.
- [49] Katerina Dvorak and Bohuslav Dvorak. Role of interleukin-6 in barrett's esophagus pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 19(15):2307–2312, 2013. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v19.i15.2307.
- [50] Ksenia Maslenkina, Liudmila Mikhaleva, Maxim Naumenko, Rositsa Vandysheva, Michail Gushchin, Dmitri Atiakshin, Igor Buchwalow, and Markus Tiemann. Signaling pathways in the pathogenesis of barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 24(11), 2023. doi: 10.3390/ijms24119304.

- [51] Yan-Song Bian, Maria-Chiara Osterheld, Charlotte Fontollet, Fred T. Bosman, and Jean Benhattar. p16 inactivation by methylation of the *cdkn2a* promoter occurs early during neoplastic progression in barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 122(4):1113–1121, 2002. doi: 10.1053/gast.2002.32370.
- [52] Jing Sun, Jorge L. Sepulveda, Elena V. Komissarova, Caitlin Hills, Tyler D. Seckar, Narine M. LeFevre, Hayk Simonyan, Colin Young, Gloria Su, Armando Del Portillo, Timothy C. Wang, and Antonia R. Sepulveda. Cdkn2a-p16 deletion and activated *krasg12d* drive barrett's-like gland hyperplasia-metaplasia and synergize in the development of dysplasia precancer lesions. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 17(5):769–784, 2024. doi: 10.1016/j.jcmgh.2024.01.014.
- [53] Piyali Ganguli, Celia C. Basanta, Amelia Acha-Sagredo, Hrvoje Misetec, Maria Armero, Akram Mendez, Aeman Zahra, Ginny Devonshire, Gavin Kelly, Adam Freeman, Mary Green, Emma Nye, Anita Bichisecchi, Paola Bonfanti, Manuel Rodriguez-Justo, Jo Spencer, Rebecca C. Fitzgerald, and Francesca D. Ciccarelli. Context-dependent effects of *cdkn2a* and other 9p21 gene losses during the evolution of esophageal cancer. *Nature cancer*, 6(1):158–174, 2025. doi: 10.1038/s43018-024-00876-0.
- [54] J. H. Moore, E. J. Lesser, D. H. Erdody, R. B. Natale, M. B. Orringer, and D. G. Beer. Intestinal differentiation and p53 gene alterations in barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *International journal of cancer*, 56(4):487–493, 1994. doi: 10.1002/ijc.2910560406.
- [55] Quanpeng Qiu, Gang Guo, Xiaolong Guo, Xiake Hu, Tianyu Yu, Gaixia Liu, Haowei Zhang, Yinnan Chen, and Junjun She. P53 deficiency accelerate esophageal epithelium intestinal metaplasia malignancy. *Biomedicines*, 11(3), 2023. ISSN 2227-9059. doi: 10.3390/biomedicines11030882.
- [56] Chunyang Bao, Richard W. Tournet, Gregory J. Brunette, Chip Stewart, Lili Sun, Hideo Baba, Masayuki Watanabe, Agoston T. Agoston, Kunal Jajoo, Jon M. Davison, Katie S. Nason, Gad Getz, Kenneth K. Wang, Yu Imamura, Robert Odze, Adam J. Bass, Matthew D. Stachler, and Cheng-Zhong Zhang. Genomic signatures of past and present chromosomal instability in barrett's esophagus and early esophageal adenocarcinoma. *Nature communications*, 14(1):6203, 2023. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-023-41805-6.
- [57] Ravindran Caspa Gokulan, Monica T. Garcia-Buitrago, and Alexander I. Zaika. From genetics to signaling pathways: molecular pathogenesis of esophageal adenocarcinoma. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1872(1):37–48, 2019. ISSN 0304-419X. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.05.003.
- [58] Jonathan Mendelson, Shumei Song, Ying Li, Dipen M. Maru, Bibhuti Mishra, Marta Davila, Wayne L. Hofstetter, and Lopa Mishra. Dysfunctional transforming growth factor- β signaling with constitutively active notch signaling in barrett's esophageal adenocarcinoma. *Cancer*, 117(16):3691–3702, 2011. doi: 10.1002/cncr.25861.
- [59] Jovana R. Gotovac, Tanjina Kader, Julia V. Milne, Kenji M. Fujihara, Luis E. Lara-Gonzalez, Kylie L. Gorringer, Sangeetha N. Kalimuthu, Madawa W. Jayawardana, Cuong P. Duong, Wayne A. Phillips, and Nicholas J. Clemons. Loss of *smad4* is sufficient to promote tumorigenesis in a model of dysplastic barrett's esophagus. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 12(2):689–713, 2021. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.03.008.

- [60] Alberto Barchi, Giuseppe Dell'Anna, Luca Massimino, Francesco Vito Mandarino, Edoardo Vespa, Edi Viale, Sandro Passaretti, Vito Annese, Alberto Malesci, Silvio Danese, and Federica Ungaro. Unraveling the pathogenesis of barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: the "omics" era. *Frontiers in oncology*, 14:1458138, 2024. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2024.1458138.
- [61] Aafke Creemers, Eva A. Ebbing, Gerrit K. J. Hooijer, Lisanne Stap, Rajni A. Jibodh-Mulder, Susanne S. Gisbertz, Mark I. van Berge Henegouwen, Maurits L. van Montfoort, Maarten C. C. M. Hulshof, Kausilia K. Krishnadath, Martijn G. H. van Oijen, Maarten F. Bijlsma, Sybren L. Meijer, and Hanneke W. M. van Laarhoven. The dynamics of her2 status in esophageal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 9(42):26787–26799, 2018. doi: 10.18632/oncotarget.25507.
- [62] Duminda Subasinghe, Nathan Acott, and M. Priyanthi Kumarasinghe. Predictive marker: Her2 in esophageal adenocarcinoma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1756:119–134, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7734-5\textunderscore{}11.
- [63] Yung-Jue Bang, Eric van Cutsem, Andrea Feyereislova, Hyun C. Chung, Lin Shen, Akira Sawaki, Florian Lordick, Atsushi Ohtsu, Yasushi Omuro, Taroh Satoh, Giuseppe Aprile, Evgeny Kulikov, Julie Hill, Michaela Lehle, Josef Rüschoff, and Yoon-Koo Kang. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of her2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (toga): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 376(9742):687–697, 2010. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
- [64] Giovanni Zarrilli, Francesca Galuppini, Valentina Angerilli, Giada Munari, Marianna Sabbadin, Van-ni Lazzarin, Lorenzo Nicolè, Rachele Biancotti, and Matteo Fassan. mirnas involved in esophageal carcinogenesis and mirna-related therapeutic perspectives in esophageal carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 2021. doi: 10.3390/ijms22073640.
- [65] Pelin Ergun, Sezgi Kipcak, and Serhat Bor. Epigenetic alterations from barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 2023. doi: 10.3390/ijms24097817.
- [66] Rainer Porschen, Wolfgang Fischbach, Ines Gockel, Stephan Hollerbach, Arnulf Hölscher, Petra Lynen Jansen, Stephan Miehle, Oliver Pech, Michael Stahl, Udo Vanhoefer, and Matthias P. A. Ebert. S3-leitlinie diagnostik und therapie der plattenepithelkarzinome und adenokarzinome des ösophagus. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 61(6):701–745, 2023. doi: 10.1055/a-1771-7087.
- [67] Salah-Eddin Al-Batran, Nils Homann, Claudia Pauligk, Thorsten O. Goetze, Johannes Meiler, Stefan Kasper, Hans-Georg Kopp, Frank Mayer, Georg Martin Haag, Kim Luley, Udo Lindig, Wolff Schmiegell, Michael Pohl, Jan Stoeckmacher, Gunnar Folprecht, Stephan Probst, Nicole Prasnikar, Wolfgang Fischbach, Rolf Mahlberg, Jörg Trojan, Michael Koenigsmann, Uwe M. Martens, Peter Thuss-Patience, Matthias Egger, Andreas Block, Volker Heinemann, Gerald Illerhaus, Markus Moehler, Michael Schenk, Frank Kullmann, Dirk M. Behringer, Michael Heike, Daniel Pink, Christian Teschendorf, Carmen Löhr, Helga Bernhard, Gunter Schuch, Volker Rethwisch, Ludwig Fischer von Weikersthal, Jörg T. Hartmann, Michael Kneba, Severin Daum, Karsten Schulmann, Jörg Weniger, Sebastian Belle, Timo Gaiser, Fuat S. Oduncu, Martina Güntner, Wael Hozaeel, Alexander Reichart, Elke Jäger, Thomas Kraus, Stefan Mönig, Wolf O. Bechstein, Martin Schuler, Harald Schmalenberg, and Ralf D. Hofheinz. Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (flot4): a randomised, phase 2/3 trial. *Lancet (London, England)*, 393(10184):1948–1957, 2019. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32557-1.

- [68] Jens Hoeppe, Florian Lordick, Thomas Brunner, Torben Glatz, Peter Bronsert, Nadine Röthling, Claudia Schmoor, Dietmar Lorenz, Christian Ell, Ulrich T. Hopt, and J. Rüdiger Siewert. Esopec: prospective randomized controlled multicenter phase iii trial comparing perioperative chemotherapy (flot protocol) to neoadjuvant chemoradiation (cross protocol) in patients with adenocarcinoma of the esophagus (nct02509286). *BMC cancer*, 16:503, 2016. ISSN 1471-2407. doi: 10.1186/s12885-016-2564-y.
- [69] Kohei Shitara, Sun Young Rha, Lucjan S. Wyrwicz, Takashi Oshima, Nina Karaseva, Mikhail Osipov, Hisateru Yasui, Hiroshi Yabusaki, Sergey Afanasyev, Young-Kyu Park, Salah-Eddin Al-Batran, Takaki Yoshikawa, Patricio Yanez, Maria Dib Bartolomeo, Sara Lonardi, Josep Tabernero, Eric van Cutsem, Yelena Y. Janjigian, Do-Youn Oh, Jianming Xu, Xiao Fang, Chie-Schin Shih, Pooja Bhagia, and Yung-Jue Bang. Neoadjuvant and adjuvant pembrolizumab plus chemotherapy in locally advanced gastric or gastro-oesophageal cancer (keynote-585): an interim analysis of the multicentre, double-blind, randomised phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, 25(2):212–224, 2024. doi: 10.1016/S1470-2045(23)00541-7.
- [70] Yelena Y. Janjigian, Eric van Cutsem, Kei Muro, Zev Wainberg, Salah-Eddin Al-Batran, Woo Jin Hyung, Daniela Molena, Michelle Marcovitz, Dario Ruscica, Scott H. Robbins, Alejandra Negro, and Josep Tabernero. Matterhorn: phase iii study of durvalumab plus flot chemotherapy in resectable gastric/gastroesophageal junction cancer. *Future oncology (London, England)*, 18(20):2465–2473, 2022. doi: 10.2217/fon-2022-0093.
- [71] David Cunningham, Naureen Starling, Sheela Rao, Timothy Iveson, Marianne Nicolson, Fareeda Coxon, Gary Middleton, Francis Daniel, Jacqueline Oates, and Andrew Richard Norman. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *The New England journal of medicine*, 358(1):36–46, 2008. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMoa073149.
- [72] E. van Meerten, F. A. L. M. Eskens, E. C. van Gameren, L. Doorn, and A. van der Gaast. First-line treatment with oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced or metastatic oesophageal cancer: a phase ii study. *British journal of cancer*, 96(9):1348–1352, 2007. ISSN 0007-0920. doi: 10.1038/sj.bjc.6603750.
- [73] Jong-Mu Sun, Lin Shen, Manish A. Shah, Peter Enzinger, Antoine Adenis, Toshihiko Doi, Takashi Kojima, Jean-Philippe Metges, Zhigang Li, Sung-Bae Kim, Byoung Chul Cho, Wasat Mansoor, Shau-Hsuan Li, Patrapim Sunpaweravong, Maria Alsina Maqueda, Eray Goekkurt, Hiroki Hara, Luis Antunes, Christos Fountzilas, Akihito Tsuji, Victor Castro Oviden, Qi Liu, Sukrut Shah, Pooja Bhagia, and Ken Kato. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (keynote-590): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet (London, England)*, 398(10302):759–771, 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01234-4.
- [74] Xinlin Liu, Yunlong Song, Panpan Cheng, Bing Liang, and Dongming Xing. Targeting her2 in solid tumors: Unveiling the structure and novel epitopes. *Cancer treatment reviews*, 130:102826, 2024. ISSN 0305-7372. doi: 10.1016/j.ctrv.2024.102826.
- [75] Xiaoqing Cheng. A comprehensive review of her2 in cancer biology and therapeutics. *Genes*, 15(7), 2024. doi: 10.3390/genes15070903.
- [76] Kanwal P. S. Raghav and Mark M. Moasser. Molecular pathways and mechanisms of her2 in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 29(13):2351–2361, 2023. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-0283.

- [77] Amancio Carnero, Carmen Blanco-Aparicio, Oliver Renner, Wolfgang Link, and Juan F. M. Leal. The pten/pi3k/akt signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current cancer drug targets*, 8(3):187–198, 2008. doi: 10.2174/156800908784293659.
- [78] Juan Angel Fresno Vara, Enrique Casado, Javier de Castro, Paloma Cejas, Cristóbal Belda-Iniesta, and Manuel González-Barón. Pi3k/akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*, 30(2):193–204, 2004. ISSN 0305-7372. doi: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007.
- [79] Antonino Glaviano, Aaron S. C. Foo, Hiu Y. Lam, Kenneth C. H. Yap, William Jacot, Robert H. Jones, Huiyan Eng, Madhumathy G. Nair, Pooyan Makvandi, Birgit Geoerger, Matthew H. Kulke, Richard D. Baird, Jyothi S. Prabhu, Daniela Carbone, Camilla Pecoraro, Daniel B. L. Teh, Gautam Sethi, Vincenzo Cavalieri, Kevin H. Lin, Nathalie R. Javidi-Sharifi, Eneda Toska, Matthew S. Davids, Jennifer R. Brown, Patrizia Diana, Justin Stebbing, David A. Fruman, and Alan P. Kumar. Pi3k/akt/mtor signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular cancer*, 22(1):138, 2023. doi: 10.1186/s12943-023-01827-6.
- [80] B. Margolis and E. Y. Skolnik. Activation of ras by receptor tyrosine kinases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 5(6):1288–1299, 1994. ISSN 1046-6673. doi: 10.1681/ASN.V561288.
- [81] Dingyi Wang, Guoxia Liu, Yuxin Meng, Hongjie Chen, Ye, and Ji Jing. The configuration of grb2 in protein interaction and signal transduction. *Biomolecules*, 14(3), 2024. ISSN 2218-273X. doi: 10.3390/biom14030259.
- [82] Libero Santarpia, Scott M. Lippman, and Adel K. El-Naggar. Targeting the mapk-ras-raf signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16(1):103–119, 2012. doi: 10.1517/14728222.2011.645805.
- [83] Haris Vikis and Kun-Liang Guan. Regulation of the ras-mapk pathway at the level of ras and raf. *Genetic engineering*, 24:49–66, 2002. ISSN 0196-3716. doi: 10.1007/978-1-4615-0721-5{\textunderscore}3.
- [84] Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, and Jennifer R. Grandis. Targeting the il-6/jak/stat3 signalling axis in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(4):234–248, 2018. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.8.
- [85] Jennifer Huynh, Nima Etemadi, Frédéric Hollande, Matthias Ernst, and Michael Buchert. The jak/stat3 axis: A comprehensive drug target for solid malignancies. *Seminars in cancer biology*, 45:13–22, 2017. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.06.001.
- [86] Hua Yu, Heehyoung Lee, Andreas Herrmann, Ralf Buettner, and Richard Jove. Revisiting stat3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature reviews. Cancer*, 14(11):736–746, 2014. doi: 10.1038/nrc3818.
- [87] A. L. Schechter, D. F. Stern, L. Vaidyanathan, S. J. Decker, J. A. Drebin, M. I. Greene, and R. A. Weinberg. The neu oncogene: an erb-b-related gene encoding a 185,000-mr tumour antigen. *Nature*, 312(5994):513–516, 1984. doi: 10.1038/312513a0. URL <https://www.nature.com/articles/312513a0>.
- [88] D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, and W. L. McGuire. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4785):177–182, 1987. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.3798106.

- [89] Matthew C. Franklin, Kendall D. Carey, Felix F. Vajdos, Daniel J. Leahy, Abraham M. de Vos, and Mark X. Sliwkowski. Insights into erbb signaling from the structure of the erbb2-pertuzumab complex. *Cancer cell*, 5(4):317–328, 2004. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/s1535-6108(04)00083-2.
- [90] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses her2. *The New England journal of medicine*, 344(11):783–792, 2001. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
- [91] Hamid Maadi, Mohammad Hasan Soheilifar, Won-Shik Choi, Abdolvahab Moshtaghian, and Zhixiang Wang. Trastuzumab mechanism of action; 20 years of research to unravel a dilemma. *Cancers*, 13(14), 2021. ISSN 2072-6694. doi: 10.3390/cancers13143540.
- [92] Charles E. Geyer, John Forster, Deborah Lindquist, Stephen Chan, C. Gilles Romieu, Tadeusz Pienkowski, Agnieszka Jagiello-Gruszfeld, John Crown, Arlene Chan, Bella Kaufman, Dimosthenis Skarlos, Mario Campone, Neville Davidson, Mark Berger, Cristina Oliva, Stephen D. Rubin, Steven Stein, and David Cameron. Lapatinib plus capecitabine for her2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*, 355(26):2733–2743, 2006. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMoA064320.
- [93] Dennis Slamon, Wolfgang Eiermann, Nicholas Robert, Tadeusz Pienkowski, Miguel Martin, Michael Press, John Mackey, John Glaspy, Arlene Chan, Marek Pawlicki, Tamas Pinter, Vicente Valero, Mei-Ching Liu, Guido Sauter, Gunter von Minckwitz, Frances Visco, Valerie Bee, Marc Buyse, Belguendouz Bendahmane, Isabelle Tabah-Fisch, Mary-Ann Lindsay, Alessandro Riva, and John Crown. Adjuvant trastuzumab in her2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*, 365(14):1273–1283, 2011. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMoA0910383.
- [94] Melissa Ruth Gannon, David Dodwell, Katie Miller, Jibby Medina, Karen Clements, Kieran Horgan, Min Hae Park, and David Alan Cromwell. Survival following adjuvant trastuzumab-based treatment among older patients with her2-positive early invasive breast cancer: A national population-based cohort study using routine data. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 211:114309, 2024. doi: 10.1016/j.ejca.2024.114309.
- [95] Heike Grabsch, Shivan Sivakumar, Sally Gray, Helmut E. Gabbert, and Wolfram Müller. Her2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cellular Oncology : the Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 32(1-2):57–65, 2010. doi: 10.3233/CLO-2009-0497. URL <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4619246/>.
- [96] Magali Rebucci and Carine Michiels. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochemical pharmacology*, 85(9):1219–1226, 2013. doi: 10.1016/j.bcp.2013.02.017.
- [97] J. Bergh, T. Norberg, S. Sjögren, A. Lindgren, and L. Holmberg. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature medicine*, 1(10):1029–1034, 1995. doi: 10.1038/nm1095-1029.
- [98] T. Aas, A. L. Børresen, S. Geisler, B. Smith-Sørensen, H. Johnsen, J. E. Varhaug, L. A. Akslen, and P. E. Lønning. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature medicine*, 2(7):811–814, 1996. doi: 10.1038/nm0796-811.

- [99] K. V. Chin, K. Ueda, I. Pastan, and M. M. Gottesman. Modulation of activity of the promoter of the human *mdr1* gene by *ras* and *p53*. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5043):459–462, 1992. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1346476.
- [100] R. L. Zastawny, R. Salvino, J. Chen, S. Benchimol, and V. Ling. The core promoter region of the *p*-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant *p53*. *Oncogene*, 8(6):1529–1535, 1993.
- [101] Karol Bukowski, Mateusz Kciuk, and Renata Kontek. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 2020. doi: 10.3390/ijms21093233.
- [102] Jing-Quan Wang, Zhuo-Xun Wu, Yuqi Yang, Qiu-Xu Teng, Yi-Dong Li, Zi-Ning Lei, Khushboo A. Jani, Neeraj Kaushal, and Zhe-Sheng Chen. Atp-binding cassette (abc) transporters in cancer: A review of recent updates. *Journal of evidence-based medicine*, 14(3):232–256, 2021. doi: 10.1111/jebm.12434.
- [103] Alexei Vazquez, Elisabeth E. Bond, Arnold J. Levine, and Gareth L. Bond. The genetics of the *p53* pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12):979–987, 2008. ISSN 1474-1784. doi: 10.1038/nrd2656.
- [104] Douglas R. Green and Guido Kroemer. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor *p53*. *Nature*, 458(7242):1127–1130, 2009. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature07986.
- [105] Xiang Zhou, Qian Hao, and Hua Lu. Mutant *p53* in cancer therapy-the barrier or the path. *Journal of molecular cell biology*, 11(4):293–305, 2019. doi: 10.1093/jmcb/mjy072.
- [106] Muhammad Tufail. *Pten*-mediated resistance in cancer: From foundation to future therapies. *Toxicology reports*, 14:101987, 2025. ISSN 2214-7500. doi: 10.1016/j.toxrep.2025.101987.
- [107] Yu-Ru Lee, Ming Chen, and Pier Paolo Pandolfi. The functions and regulation of the *pten* tumour suppressor: new modes and prospects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(9):547–562, 2018. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/s41580-018-0015-0. URL <https://www.nature.com/articles/s41580-018-0015-0>.
- [108] HuiJuan Wu, Yang Cao, Danhui Weng, Hui Xing, Xiaohong Song, Jianfeng Zhou, Gang Xu, Yunping Lu, Shixuan Wang, and Ding Ma. Effect of tumor suppressor gene *pten* on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer letters*, 271(2): 260–271, 2008. doi: 10.1016/j.canlet.2008.06.012.
- [109] Haiyang Zhang, Song Wang, Nicholas Cacalano, He Zhu, Qiuju Liu, Michael Xie, Mitchell Kamrava, Gottfried Konecny, and Shunzi Jin. Oncogenic *y68* frame shift mutation of *pten* represents a mechanism of docetaxel resistance in endometrial cancer cell lines. *Scientific reports*, 9(1):2111, 2019. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-019-38585-9. URL <https://www.nature.com/articles/s41598-019-38585-9>.
- [110] Fanyin Meng, Roger Henson, Hania Wehbe-Janek, Kalpana Ghoshal, Samson T. Jacob, and Tushar Patel. MicroRNA-21 regulates expression of the *pten* tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2):647–658, 2007. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.022.

- [111] Lekun Fang, Haoran Li, Lei Wang, Jun Hu, Tianru Jin, Jianping Wang, and Burton B. Yang. MicroRNA-17-5p promotes chemotherapeutic drug resistance and tumour metastasis of colorectal cancer by repressing pten expression. *Oncotarget*, 5(10):2974–2987, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.1614.
- [112] X. WAN, J. LI, X. XIE, and W. LU. Pten augments doxorubicin-induced apoptosis in pten-null ishikawa cells. *International Journal of Gynecological Cancer*, 17(4): 808–812, 2007. ISSN 1525-1438. doi: 10.1136/ijgc-00009577-200707000-00009. URL [https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X\(24\)02981-5/fulltext](https://www.international-journal-of-gynecological-cancer.com/article/S1048-891X(24)02981-5/fulltext).
- [113] Ananda Mukherjee, Saheli Samanta, and Parimal Karmakar. Inactivation of pten is responsible for the survival of hep g2 cells in response to etoposide-induced damage. *Mutation research*, 715 (1-2):42–51, 2011. ISSN 0027-5107. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.07.003.
- [114] Rashid Elhag, Elizabeth A. Mazzio, and Karam F. A. Soliman. The effect of silibinin in enhancing toxicity of temozolomide and etoposide in p53 and pten-mutated resistant glioma cell lines. *Anticancer research*, 35(3):1263–1269, 2015.
- [115] Jonathan Nissenbaum, Emanuel Segal, Hagit Philip, Rivki Cashman, Tamar Golan-Lev, Benjamin E. Reubinoff, Adi Turjeman, Ofra Yanuka, Elyad Lezmi, Oded Kopper, and Nissim Benvenisty. Predicting tumour resistance to paclitaxel and carboplatin utilising genome-wide screening in haploid human embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, 58(3):e13771, 2025. doi: 10.1111/cpr.13771. URL <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11882768/>.
- [116] Nicola Fusco, Elham Sajjadi, Konstantinos Venetis, Gabriella Gaudioso, Gianluca Lopez, Chiara Corti, Elena Guerini Rocco, Carmen Criscitiello, Umberto Malapelle, and Marco Invernizzi. Pten alterations and their role in cancer management: Are we making headway on precision medicine? *Genes*, 11(7), 2020. doi: 10.3390/genes11070719.
- [117] Duo Wang, Jun Zhou, Weimin Fang, Cuiqing Huang, Zerong Chen, Meng Fan, Ming-Rong Zhang, Zeyu Xiao, Kuan Hu, and Liangping Luo. A multifunctional nanotheranostic agent potentiates erlotinib to egfr wild-type non-small cell lung cancer. *Bioactive materials*, 13:312–323, 2022. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.046.
- [118] Przemysław Biegański, Martina Godel, Chiara Riganti, Daniel Fábio Kawano, Joanna Kopecka, and Konrad Kowalski. Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cancer cells in vitro. *Bioorganic chemistry*, 119:105514, 2022. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105514.
- [119] Bingjie Fu, Xiaojing Dou, Miao Zou, Hao Lu, Kaixuan Wang, Qingxia Liu, Yao Liu, Wei Wang, Meihua Jin, and Dexin Kong. Anticancer effects of amlodipine alone or in combination with gefitinib in non-small cell lung cancer. *Frontiers in pharmacology*, 13:902305, 2022. ISSN 1663-9812. doi: 10.3389/fphar.2022.902305.
- [120] Masaki Takahashi, Yoshifumi Hashimoto, and Yoshikazu Nakamura. Anti-tgf- β 1 aptamer enhances therapeutic effect of tyrosine kinase inhibitor, gefitinib, on non-small cell lung cancer in xenograft model. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 29:969–978, 2022. ISSN 2162-2531. doi: 10.1016/j.omtn.2022.06.001.

- [121] Leonard J. Ash, Ottavia Busia-Bourdain, Daniel Okpattah, Avrosina Kamel, Ariel Liberchuk, and Andrew L. Wolfe. Kras: Biology, inhibition, and mechanisms of inhibitor resistance. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 31(4):2024–2046, 2024. ISSN 1198-0052. doi: 10.3390/curroncol31040150.
- [122] Lamei Huang, Zhixing Guo, Fang Wang, and Liwu Fu. Kras mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1):386, 2021. doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.
- [123] Ruth Nussinov, Chung-Jung Tsai, and Hyunbum Jang. Anticancer drug resistance: An update and perspective. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 59:100796, 2021. ISSN 1368-7646. doi: 10.1016/j.drug.2021.100796.
- [124] Sandra Misale, Rona Yaeger, Sebastijan Hobor, Elisa Scala, Manickam Janakiraman, David Lis-ka, Emanuele Valtorta, Roberta Schiavo, Michela Buscarino, Giulia Siravegna, Katia Bencardino, Andrea Cercek, Chin-Tung Chen, Silvio Veronese, Carlo Zanon, Andrea Sartore-Bianchi, Marcello Gambacorta, Margherita Gallicchio, Efsevia Vakiani, Valentina Boscaro, Enzo Medico, Martin Weiser, Salvatore Siena, Federica Di Nicolantonio, David Solit, and Alberto Bardelli. Emergence of kras mutations and acquired resistance to anti-egfr therapy in colorectal cancer. *Nature*, 486(7404):532–536, 2012. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature11156. URL <https://www.nature.com/articles/nature11156>.
- [125] Afsane Bahrami, AmirReza Hesari, Majid Khazaei, Seyed Mahdi Hassanian, Gordon A. Ferns, and Amir Avan. The therapeutic potential of targeting the braf mutation in patients with colorectal cancer. *Journal of cellular physiology*, 233(3):2162–2169, 2018. doi: 10.1002/jcp.25952.
- [126] Dandan Cui, Dan Cao, Yu Yang, Meng Qiu, Ying Huang, and Cheng Yi. Effect of braf v600e mutation on tumor response of anti-egfr monoclonal antibodies for first-line metastatic colorectal cancer treatment: a meta-analysis of randomized studies. *Molecular biology reports*, 41(3):1291–1298, 2014. doi: 10.1007/s11033-013-2974-8.
- [127] Tiffany Seto, Danny Sam, and Minggui Pan. Mechanisms of primary and secondary resistance to immune checkpoint inhibitors in cancer. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 7(2), 2019. doi: 10.3390/medsci7020014.
- [128] Daniel S. Lefler, Steven A. Manobianco, and Babar Bashir. Immunotherapy resistance in solid tumors: mechanisms and potential solutions. *Cancer biology & therapy*, 25(1):2315655, 2024. doi: 10.1080/15384047.2024.2315655.
- [129] Moshe Sade-Feldman, Yunxin J. Jiao, Jonathan H. Chen, Michael S. Rooney, Michal Barzily-Rokni, Jean-Pierre Eliane, Stacey L. Bjorgaard, Marc R. Hammond, Hans Vitzthum, Shauna M. Blackmon, Dennie T. Frederick, Mehlika Hazar-Rethinam, Brandon A. Nades, Emily E. van Seventer, Sachet A. Shukla, Keren Yizhak, John P. Ray, Daniel Rosebrock, Dimitri Livitz, Viktor Adalsteins-son, Gad Getz, Lyn M. Duncan, Bo Li, Ryan B. Corcoran, Donald P. Lawrence, Anat Stemmer-Rachamimov, Genevieve M. Boland, Dan A. Landau, Keith T. Flaherty, Ryan J. Sullivan, and Nir Hacohen. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nature communications*, 8(1):1136, 2017. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-017-01062-w.
- [130] Daniel Sanghoon Shin, Jesse M. Zaretsky, Helena Escuin-Ordinas, Angel Garcia-Diaz, Siwen Hu-Lieskovan, Anusha Kalbasi, Catherine S. Grasso, Willy Hugo, Saleem Sandoval, Davis Y. Torrejon, Nicolaos Palaskas, Gabriel Abril Rodriguez, Giulia Parisi, Ariel Azhdam, Bartosz Chmielowski, Grace Cherry, Elizabeth Seja, Beata Berent-Maoz, I. Peter Shintaku, Dung T. Le, Drew M. Pardoll,

- Luis A. Diaz, Paul C. Tumeh, Thomas G. Graeber, Roger S. Lo, Begoña Comin-Anduix, and Antoni Ribas. Primary resistance to pd-1 blockade mediated by jak1/2 mutations. *Cancer discovery*, 7(2):188–201, 2017. ISSN 2159-8274. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1223.
- [131] Marvin Sylvestre, Karin Tarte, and David Roulois. Epigenetic mechanisms driving tumor supportive microenvironment differentiation and function: a role in cancer therapy? *Epigenomics*, 12(2):157–169, 2020. doi: 10.2217/epi-2019-0165.
- [132] Zdenko Herceg and Thomas Vaissière. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics*, 6(7):804–819, 2011. doi: 10.4161/epi.6.7.16262.
- [133] Sang Y. Lee. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & diseases*, 3(3):198–210, 2016. doi: 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
- [134] Hengzeng Li, Yahui Wu, Yue Chen, Jinqun Lv, Chengkang Qu, Tingjie Mei, Yunfan Zheng, Cheng Ye, Feifei Li, Shuo Ge, Anhui Yao, and Liyun Jia. Overcoming temozolomide resistance in glioma: recent advances and mechanistic insights. *Acta neuropathologica communications*, 13(1):126, 2025. doi: 10.1186/s40478-025-02046-4.
- [135] Monika E. Hegi, Annie-Claire Diserens, Thierry Gorlia, Marie-France Hamou, Nicolas de Tribolet, Michael Weller, Johan M. Kros, Johannes A. Hainfellner, Warren Mason, Luigi Mariani, Jacqueline E. C. Bromberg, Peter Hau, René O. Mirimanoff, J. Gregory Cairncross, Robert C. Janzer, and Roger Stupp. Mgmt gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10):997–1003, 2005. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMoa043331.
- [136] Christian N. Arnold, Ajay Goel, and C. Richard Boland. Role of hmlh1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *International journal of cancer*, 106(1):66–73, 2003. doi: 10.1002/ijc.11176.
- [137] G. Strathdee, M. J. MacKean, M. Illand, and R. Brown. A role for methylation of the hmlh1 promoter in loss of hmlh1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 18(14):2335–2341, 1999. doi: 10.1038/sj.onc.1202540.
- [138] Andre Fedier and Daniel Fink. Mutations in dna mismatch repair genes: implications for dna damage signaling and drug sensitivity (review). *International journal of oncology*, 24(4):1039–1047, 2004. ISSN 1019-6439.
- [139] Mingchuan Zhao, Yishi Zhang, Jiayu Li, Xuefei Li, Ningning Cheng, Qi Wang, Weijing Cai, Chao Zhao, Yayi He, Jianhua Chang, and Caicun Zhou. Histone deacetylation, as opposed to promoter methylation, results in epigenetic bim silencing and resistance to egfr tki in nsclc. *Oncology letters*, 15(1):1089–1096, 2018. ISSN 1792-1074. doi: 10.3892/ol.2017.7411.
- [140] King Pan Ng, Axel M. Hillmer, Charles T. H. Chuah, Wen Chun Juan, Tun Kiat Ko, Audrey S. M. Teo, Pramila N. Ariyaratne, Naoto Takahashi, Kenichi Sawada, Yao Fei, Sheila Soh, Wah Heng Lee, John W. J. Huang, John C. Allen, Xing Yi Woo, Niranjan Nagarajan, Vikrant Kumar, Anbupalam Thalamuthu, Wan Ting Poh, Ai Leen Ang, Hae Tha Mya, Gee Fung How, Li Yi Yang, Liang Piu Koh, Balram Chowbay, Chia-Tien Chang, Veera S. Nadarajan, Wee Joo Chng, Hein Than, Lay Cheng Lim, Yeow Tee Goh, Shenli Zhang, Dianne Poh, Patrick Tan, Ju-Ee Seet, Mei-Kim Ang, Noan-Minh Chau, Quan-Sing Ng, Daniel S. W. Tan, Manabu Soda, Kazutoshi Isobe, Markus M. Nöthen, Tien Y. Wong, Atif Shahab, Xiaoran Ruan, Valère Cacheux-Rataboul, Wing-Kin Sung, Eng Huat Tan, Yasushi Yatabe, Hiroyuki Mano, Ross A. Soo, Tan Min Chin, Wan-Teck Lim, Yijun

- Ruan, and S. Tiong Ong. A common bim deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nature Medicine*, 18(4):521–528, 2012. ISSN 1546-170X. doi: 10.1038/nm.2713. URL <https://www.nature.com/articles/nm.2713>.
- [141] Mingchuan Zhao, Yishi Zhang, Weijing Cai, Jiayu Li, Fei Zhou, Ningning Cheng, Ruixin Ren, Chao Zhao, Xuefei Li, Shengxiang Ren, Caicun Zhou, and Fred R. Hirsch. The bim deletion polymorphism clinical profile and its relation with tyrosine kinase inhibitor resistance in chinese patients with non-small cell lung cancer. *Cancer*, 120(15):2299–2307, 2014. doi: 10.1002/cncr.28725.
- [142] Michela Garofalo, Giulia Romano, Gianpiero Di Leva, Gerard Nuovo, Young-Jun Jeon, Apollinaire Ngankeu, Jin Sun, Francesca Lovat, Hansjuerg Alder, Gerolama Condorelli, Jeffrey A. Engelman, Mayumi Ono, Jin Kyung Rho, Luciano Cascione, Stefano Volinia, Kenneth P. Nephew, and Carlo M. Croce. Egfr and met receptor tyrosine kinase-altered microrna expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nature Medicine*, 18(1):74–82, 2011. ISSN 1546-170X. doi: 10.1038/nm.2577.
- [143] Peter Magee, Lei Shi, and Michela Garofalo. Role of micrnas in chemoresistance. *Annals of Translational Medicine*, 3(21):332, 2015. ISSN 2305-5839. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.11.32. URL https://atm.amegroups.org/article/view/8584/html?utm_source=chatgpt.com.
- [144] Zeinab Amini-Farsani, Mohammad Hossein Sangtarash, Mehdi Shamsara, and Hossein Teimori. Mir-221/222 promote chemoresistance to cisplatin in ovarian cancer cells by targeting pten/pi3k/akt signaling pathway. *Cytotechnology*, 70(1):203–213, 2018. ISSN 0920-9069. doi: 10.1007/s10616-017-0134-z.
- [145] Haneen Amawi, Hong-May Sim, Amit K. Tiwari, Suresh V. Ambudkar, and Suneet Shukla. Abc transporter-mediated multidrug-resistant cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1141:549–580, 2019. ISSN 0065-2598. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4\textunderscore12.
- [146] Robert W. Robey, Kristen M. Pluchino, Matthew D. Hall, Antonio T. Fojo, Susan E. Bates, and Michael M. Gottesman. Revisiting the role of abc transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature reviews. Cancer*, 18(7):452–464, 2018. doi: 10.1038/s41568-018-0005-8.
- [147] Suneet Shukla, Zhe-Sheng Chen, and Suresh V. Ambudkar. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of abc transporter-mediated drug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 15(1-2):70–80, 2012. ISSN 1368-7646. doi: 10.1016/j.drug.2012.01.005.
- [148] Xiaocong He, Yuanyuan Yang, Yulong Han, Chunyu Cao, Zhongbin Zhang, Lingxiao Li, Cailan Xiao, Hui Guo, Lin Wang, Lichun Han, Zhiguo Qu, Na Liu, Shuang Han, and Feng Xu. Extracellular matrix physical properties govern the diffusion of nanoparticles in tumor microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(1): e2209260120, 2023. doi: 10.1073/pnas.2209260120.
- [149] Erik Henke, Rajender Nandigama, and Süleyman Ergün. Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy. *Frontiers in molecular biosciences*, 6:160, 2019. ISSN 2296-889X. doi: 10.3389/fmolb.2019.00160.
- [150] Hideyuki Masuda. Cancer-associated fibroblasts in cancer drug resistance and cancer progression: a review. *Cell Death Discovery*, 11(1):341, 2025. ISSN 2058-7716. doi: 10.1038/s41420-025-02566-x. URL <https://www.nature.com/articles/s41420-025-02566-x>.

- [151] Claire Beckers, Martin Pruschy, and Irene Vetrugno. Tumor hypoxia and radiotherapy: A major driver of resistance even for novel radiotherapy modalities. *Seminars in cancer biology*, 98:19–30, 2024. doi: 10.1016/j.semcancer.2023.11.006.
- [152] Andria Rakotomalala, Alexandre Escande, Alessandro Furlan, Samuel Meignan, and Eric Lartigau. Hypoxia in solid tumors: How low oxygenation impacts the "six rs" of radiotherapy. *Frontiers in endocrinology*, 12:742215, 2021. ISSN 1664-2392. doi: 10.3389/fendo.2021.742215.
- [153] Feng Wang, Xuewen Liu, Boris A. Bartholdy, Haiying Cheng, and Balazs Halmos. Blockade of axl activation overcomes acquired resistance to egfr tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer. *Translational cancer research*, 8(6):2425–2438, 2019. ISSN 2218-676X. doi: 10.21037/tcr.2019.09.61.
- [154] Florence Colliez, Bernard Gallez, and Bénédicte F. Jordan. Assessing tumor oxygenation for predicting outcome in radiation oncology: A review of studies correlating tumor hypoxic status and outcome in the preclinical and clinical settings. *Frontiers in oncology*, 7:10, 2017. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2017.00010.
- [155] Jili Li, Yingying Zhu, Jianyue Peng, Lan Yang, Li Zhang, and Lei Li. Stat3/p-stat3 expression is correlated with clinicopathological characteristics and prognosis in non-small cell lung cancer. *Histology and histopathology*, 40(6):901–909, 2025. ISSN 1699-5848. doi: 10.14670/HH-18-827.
- [156] Nolan M. Stubbs, Tyler J. Roady, Maximilian P. Schwermann, Elias O. Eteshola, William J. MacDonald, Connor Purcell, Dinara Ryspayeva, Nataliia Verovkina, Vida Tajiknia, Maryam Ghandali, Viva Voong, Alexis J. Lannigan, Alexander G. Raufi, Sean Lawler, Sheldon L. Holder, Benedito A. Carneiro, Liang Cheng, Howard P. Safran, Stephanie L. Graff, Don S. Dizon, Sendurai A. Mani, Attila A. Seyhan, Robert W. Sobol, Eric T. Wong, Clark C. Chen, Ziya Gokaslan, Martin S. Taylor, Brian M. Rivers, and Wafik S. El-Deiry. Acquired resistance to molecularly targeted therapies for cancer. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 8:27, 2025. ISSN 2578-532X. doi: 10.20517/cdr.2024.189.
- [157] Alice Soragni, Erik S. Knudsen, Thomas N. O'Connor, Cristina E. Tognon, Jeffrey W. Tyner, Beatrice Gini, Donghwa Kim, Trevor G. Bivona, Xingxing Zang, Agnieszka K. Witkiewicz, David W. Goodrich, Dadi Jiang, Seth T. Gammon, Christopher D. Willey, Paul C. Boutros, Vlad C. Sandulache, Abdullah A. Osman, Jeffrey N. Myers, Kamiya Mehla, Pankaj K. Singh, Keith S. Chan, Hongbo Gao, and Himangi Marathe. Acquired resistance in cancer: towards targeted therapeutic strategies. *Nature reviews. Cancer*, 25(8):613–633, 2025. doi: 10.1038/s41568-025-00824-9.
- [158] Nicholas McGranahan and Charles Swanton. Clonal heterogeneity and tumor evolution: Past, present, and the future. *Cell*, 168(4):613–628, 2017. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
- [159] Andriy Marusyk, Michalina Janiszewska, and Kornelia Polyak. Intratumor heterogeneity: The rosetta stone of therapy resistance. *Cancer cell*, 37(4):471–484, 2020. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.007.
- [160] Melissa R. Junttila and Frederic J. de Sauvage. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467):346–354, 2013. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature12626.
- [161] Ibiayi Dagogo-Jack and Alice T. Shaw. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2):81–94, 2018. ISSN 1759-4782. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166. URL <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.166>.

- [162] Thomas J. Lynch, Daphne W. Bell, Raffaella Sordella, Sarada Gurubhagavatula, Ross A. Okimoto, Brian W. Brannigan, Patricia L. Harris, Sara M. Haserlat, Jeffrey G. Supko, Frank G. Haluska, David N. Louis, David C. Christiani, Jeff Settleman, and Daniel A. Haber. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*, 350(21):2129–2139, 2004. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMoa040938.
- [163] J. Guillermo Paez, Pasi A. Jänne, Jeffrey C. Lee, Sean Tracy, Heidi Greulich, Stacey Gabriel, Paula Herman, Frederic J. Kaye, Neal Lindeman, Titus J. Boggon, Katsuhiko Naoki, Hidefumi Sasaki, Yoshitaka Fujii, Michael J. Eck, William R. Sellers, Bruce E. Johnson, and Matthew Meyerson. Egfr mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5676):1497–1500, 2004. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1099314.
- [164] Geoffrey R. Oxnard, Maria E. Arcila, Camelia S. Sima, Gregory J. Riely, Juliann Chmielecki, Mark G. Kris, William Pao, Marc Ladanyi, and Vincent A. Miller. Acquired resistance to egfr tyrosine kinase inhibitors in egfr-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the t790m mutation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(6):1616–1622, 2011. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2692.
- [165] Helena A. Yu, Maria E. Arcila, Natasha Rekhtman, Camelia S. Sima, Maureen F. Zakowski, William Pao, Mark G. Kris, Vincent A. Miller, Marc Ladanyi, and Gregory J. Riely. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to egfr-tki therapy in 155 patients with egfr-mutant lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(8):2240–2247, 2013. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
- [166] Kentaro Tanaka, Kaname Nosaki, Kohei Otsubo, Koichi Azuma, Shinya Sakata, Hiroshi Ouchi, Ryotaro Morinaga, Hiroshi Wataya, Akiko Fujii, Noriaki Nakagaki, Nobuko Tsuruta, Masafumi Takeshita, Eiji Iwama, Taishi Harada, Yoichi Nakanishi, and Isamu Okamoto. Acquisition of the t790m resistance mutation during afatinib treatment in egfr tyrosine kinase inhibitor-naïve patients with non-small cell lung cancer harboring egfr mutations. *Oncotarget*, 8(40):68123–68130, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.19243.
- [167] Cai-Hong Yun, Kristen E. Mengwasser, Angela V. Toms, Michele S. Woo, Heidi Greulich, Kwok-Kin Wong, Matthew Meyerson, and Michael J. Eck. The t790m mutation in egfr kinase causes drug resistance by increasing the affinity for atp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6):2070–2075, 2008. doi: 10.1073/pnas.0709662105.
- [168] William Pao, Vincent A. Miller, Katerina A. Politi, Gregory J. Riely, Romel Somwar, Maureen F. Zakowski, Mark G. Kris, and Harold Varmus. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the egfr kinase domain. *PLoS medicine*, 2(3):e73, 2005. doi: 10.1371/journal.pmed.0020073.
- [169] Saeid Ghorbian. Cancer cell plasticity and therapeutic resistance: mechanisms, crosstalk, and translational perspectives. *Hereditas*, 162(1):188, 2025. doi: 10.1186/s41065-025-00564-8.
- [170] Mian Xie, Li Zhang, Chao-sheng He, Fei Xu, Jun-ling Liu, Zhi-huang Hu, Li-ping Zhao, and Ying Tian. Activation of notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 113(5):1501–1513, 2012. doi: 10.1002/jcb.24019.

- [171] Mian Xie, Chao-sheng He, Shen-Hai Wei, and Li Zhang. Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(16):3559–3572, 2013. doi: 10.1016/j.ejca.2013.07.007.
- [172] Raghu Kalluri and Robert A. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6):1420–1428, 2009. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI39104.
- [173] Maud Debaugnies, Sara Rodríguez-Acebes, Jeremy Blondeau, Marie-Astrid Parent, Manuel Zocco, Yura Song, Viviane de Maertelaer, Virginie Moers, Mathilde Latil, Christine Dubois, Katia Coulonval, Francis Impens, Delphi van Haver, Sara Dufour, Akiyoshi Uemura, Panagiota A. Sotiropoulou, Juan Méndez, and Cédric Blanpain. Rhoj controls emt-associated resistance to chemotherapy. *Nature*, 616(7955):168–175, 2023. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/s41586-023-05838-7.
- [174] Christina Scheel and Robert A. Weinberg. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in cancer biology*, 22(5-6):396–403, 2012. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.04.001.
- [175] Yuan Li, Zhenning Wang, Jaffer A. Ajani, and Shumei Song. Drug resistance and cancer stem cells. *Cell communication and signaling : CCS*, 19(1):19, 2021. doi: 10.1186/s12964-020-00627-5.
- [176] Loredana G. Marcu, Mikaela Dell'Oro, and Eva Bezak. Opportunities in cancer therapies: Deciphering the role of cancer stem cells in tumour repopulation. *International journal of molecular sciences*, 24(24), 2023. doi: 10.3390/ijms242417258.
- [177] Haksoo Lee, Byeongsoo Kim, Junhyeong Park, Sujin Park, Gaeun Yoo, Soomin Yum, Wooseok Kang, Jae-Myung Lee, HyeSook Youn, and BuHyun Youn. Cancer stem cells: landscape, challenges and emerging therapeutic innovations. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1):248, 2025. ISSN 2059-3635. doi: 10.1038/s41392-025-02360-2. URL https://www.nature.com/articles/s41392-025-02360-2?utm_source=chatgpt.com.
- [178] Pavan Kumar Dhanyamraju, Todd D. Schell, Shantu Amin, and Gavin P. Robertson. Drug-tolerant persister cells in cancer therapy resistance. *Cancer research*, 82(14):2503–2514, 2022. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-3844.
- [179] Matthew J. Niederst and Jeffrey A. Engelman. Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. *Science signaling*, 6(294):re6, 2013. ISSN 1945-0877. doi: 10.1126/scisignal.2004652.
- [180] Koh Furugaki, Takaaki Fujimura, Hayato Mizuta, Takuya Yoshimoto, Takashi Asakawa, Yasushi Yoshimura, and Shigeki Yoshiura. Fgfr blockade inhibits targeted therapy-tolerant persister in basal fgfr1- and fgfr2-high cancers with driver oncogenes. *npj Precision Oncology*, 7(1):107, 2023. ISSN 2397-768X. doi: 10.1038/s41698-023-00462-0. URL https://www.nature.com/articles/s41698-023-00462-0?utm_source=chatgpt.com.
- [181] Hui Wang, Heng Jiang, Melissa van de Gucht, and Mark de Ridder. Hypoxic radioresistance: Can ros be the key to overcome it? *Cancers*, 11(1), 2019. ISSN 2072-6694. doi: 10.3390/cancers11010112.
- [182] Jeffrey A. Engelman, Kreshnik Zejnullahu, Tetsuya Mitsudomi, Youngchul Song, Courtney Hyland, Joon Oh Park, Neal Lindeman, Christopher-Michael Gale, Xiaojun Zhao, James Christensen, Takayuki Kosaka, Alison J. Holmes, Andrew M. Rogers, Federico Cappuzzo, Tony Mok, Charles

- Lee, Bruce E. Johnson, Lewis C. Cantley, and Pasi A. Jänne. Met amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating erbb3 signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5827): 1039–1043, 2007. ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.1141478.
- [183] Seiji Yano, Wei Wang, Qi Li, Kunio Matsumoto, Haruko Sakurama, Takahiro Nakamura, Hirokazu Ogino, Soji Kakiuchi, Masaki Hanibuchi, Yasuhiko Nishioka, Hisanori Uehara, Tetsuya Mitsudomi, Yasushi Yatabe, Toshikazu Nakamura, and Saburo Sone. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer research*, 68(22):9479–9487, 2008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1643.
- [184] Jesse M. Zaretsky, Angel Garcia-Diaz, Daniel S. Shin, Helena Escuin-Ordinas, Willy Hugo, Siwen Hu-Lieskovan, Davis Y. Torrejon, Gabriel Abril-Rodriguez, Saleem Sandoval, Lucas Barthly, Justin Saco, Blanca Homet Moreno, Riccardo Mezzadra, Bartosz Chmielowski, Kathleen Ruchalski, I. Peter Shintaku, Phillip J. Sanchez, Cristina Puig-Saus, Grace Cherry, Elizabeth Seja, Xiangju Kong, Jia Pang, Beata Berent-Maoz, Begoña Comin-Anduix, Thomas G. Graeber, Paul C. Tumeh, Ton N. M. Schumacher, Roger S. Lo, and Antoni Ribas. Mutations associated with acquired resistance to pd-1 blockade in melanoma. *The New England journal of medicine*, 375(9):819–829, 2016. ISSN 0028-4793. doi: 10.1056/NEJMoa1604958.
- [185] Giampaolo Tortora. Mechanisms of resistance to her2 target therapy. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2011(43):95–98, 2011. doi: 10.1093/jncimonographs/lgr026.
- [186] Miguel A. Molina, Rosana Sáez, Elizabeth E. Ramsey, María-José Garcia-Barchino, Federico Rojo, Adam J. Evans, Joan Albanell, Edward J. Keenan, Ana Lluch, Javier García-Conde, José Baselga, and Gail M. Clinton. Nh(2)-terminal truncated her-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(2):347–353, 2002. ISSN 1078-0432.
- [187] Maurizio Scaltriti, Federico Rojo, Alberto Ocaña, Judit Anido, Marta Guzman, Javier Cortes, Serena Di Cosimo, Xavier Matias-Guiu, Santiago Ramon y Cajal, Joaquin Arribas, and José Baselga. Expression of p95her2, a truncated form of the her2 receptor, and response to anti-her2 therapies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(8):628–638, 2007. doi: 10.1093/jnci/djk134.
- [188] S. M. Pupa, S. Ménard, D. Morelli, B. Pozzi, G. de Palo, and M. I. Colnaghi. The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene*, 8(11):2917–2923, 1993.
- [189] Yuanbo Hu, Chenbin Chen, Kezhi Lin, Xinya Tong, Tingting Huang, Tianle Qiu, Xietao Chen, Jun Xu, Wangkai Xie, Xiangwei Sun, Shiyu Feng, Mingdong Lu, Zhiguang Zhao, Xiaodong Chen, Xiangyang Xue, and Xian Shen. Nsun2 promotes colorectal cancer progression and increases lapatinib sensitivity by enhancing cul4b/erbb-stat3 signalling in a non-m5c manner. *Clinical and translational medicine*, 15(4):e70282, 2025. doi: 10.1002/ctm2.70282.
- [190] Ariella B. Hanker, Monica Red Brewer, Jonathan H. Sheehan, James P. Koch, Gregory R. Sliwoski, Rebecca Nagy, Richard Lanman, Michael F. Berger, David M. Hyman, David B. Solit, Jie He, Vincent Miller, Richard E. Cutler, Alshad S. Lalani, Darren Cross, Christine M. Lovly, Jens Meiler, and Carlos L. Arteaga. An acquired her2t798i gatekeeper mutation induces resistance to neratinib in a patient with her2 mutant-driven breast cancer. *Cancer discovery*, 7(6):575–585, 2017. ISSN 2159-8274. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1431.

- [191] Zsuzsanna Pályi-Krekk, Márk Barok, Jorma Isola, Markku Tammi, János Szöllosi, and Peter Nagy. Hyaluronan-induced masking of erbb2 and cd44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 43(16): 2423–2433, 2007. doi: 10.1016/j.ejca.2007.08.018.
- [192] Tomomi Kashiwada, Hiroshi Saeki, Yoshikazu Uenosono, Akitaka Makiyama, Masaaki Iwatsuki, Yukiya Narita, Hironaga Satake, Yoshiko Matsuda, Hideto Sonoda, Eiji Oki, and Yoshihiko Mae-hara. Multicenter observational study on re-evaluation of her2 status in patients with her2-positive advanced or recurrent gastric cancer refractory to trastuzumab. *Journal of Clinical Oncology*, 36(15_suppl):4038, 2018. ISSN 0732-183X. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15\textunderscore{suppl}.4038.
- [193] Dionne Blangé, Charlotte I. Stroes, Sarah Derks, Maarten F. Bijlsma, and Hanneke W. M. van Laarhoven. Resistance mechanisms to her2-targeted therapy in gastroesophageal adenocarcinoma: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 108:102418, 2022. ISSN 1532-1967. doi: 10.1016/j.ctrv.2022.102418. URL [https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(22\)00082-2/fulltext](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(22)00082-2/fulltext).
- [194] Chin-Tung Chen, Hyaehwan Kim, David Liska, Sizhi Gao, James G. Christensen, and Martin R. Weiser. Met activation mediates resistance to lapatinib inhibition of her2-amplified gastric cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 11(3):660–669, 2012. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0754.
- [195] Md Sazzad Hassan, Fiona Williams, Lucia Petrova, Niranjan Awasthi, Margaret Schwarz, Roderich Schwarz, and Urs von Holzen. Abstract 289: Met activation mediates lapatinib resistance in experimental esophageal adenocarcinoma. *Cancer research*, 79(13_Supplement):289, 2019. doi: 10.1158/1538-7445.AM2019-289.
- [196] Yong Yook Lee, Hwang-Phill Kim, Min Jueng Kang, Byoung-Kyu Cho, Sae-Won Han, Tae-You Kim, and Eugene C. Yi. Phosphoproteomic analysis identifies activated met-axis pi3k/akt and mapk/erk in lapatinib-resistant cancer cell line. *Experimental & molecular medicine*, 45(11):e64, 2013. doi: 10.1038/emm.2013.115.
- [197] Francisco Sanchez-Vega, Jaclyn F. Hechtman, Pau Castel, Geoffrey Y. Ku, Yaelle Tuvy, Helen Won, Christopher J. Fong, Nancy Bouvier, Gouri J. Nanjangud, Joanne Soong, Efsevia Vakiani, Mark Schattner, David P. Kelsen, Robert A. Lefkowitz, Karen Brown, Mario E. Lacouture, Marinela Capanu, Marissa Mattar, Besnik Qeriqi, Fabiola Cecchi, Yuan Tian, Todd Hembrough, Rebecca J. Nagy, Richard B. Lanman, Steven M. Larson, Neeta Pandit-Taskar, Heiko Schöder, Christine A. Iacobuzio-Donahue, David H. Ilson, Wolfgang A. Weber, Michael F. Berger, Elisa de Stanchina, Barry S. Taylor, Jason S. Lewis, David B. Solit, Jorge A. Carrasquillo, Maurizio Scaltriti, Nikolaus Schultz, and Yelena Y. Janjigian. Egfr and met amplifications determine response to her2 inhibition in erbb2-amplified esophagogastric cancer. *Cancer discovery*, 9(2):199–209, 2019. ISSN 2159-8274. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0598.
- [198] Laura M. Bender and Rita Nahta. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13:3906–3912, 2008. ISSN 1093-9946. doi: 10.2741/2978.
- [199] Rita Nahta, Linda X. H. Yuan, Bing Zhang, Ryuji Kobayashi, and Francisco J. Esteva. Insulin-like growth factor-i receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes

- to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer research*, 65(23):11118–11128, 2005. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3841.
- [200] Anna Adam-Artigues, Enrique J. Arenas, Alex Martínez-Sabadell, Fara Brasó-Maristany, Raimundo Cervera, Eduardo Tormo, Cristina Hernando, María Teresa Martínez, Juan Carbonell-Asins, Soraya Simón, Jesús Poveda, Santiago Moragón, Sandra Zazo, Débora Martínez, Ana Rovira, Octavio Burgués, Federico Rojo, Joan Albanell, Begoña Bermejo, Ana Lluch, Aleix Prat, Joaquín Arribas, Pilar Eroles, and Juan Miguel Cejalvo. Targeting her2-axl heterodimerization to overcome resistance to her2 blockade in breast cancer. *Science advances*, 8(20):eabk2746, 2022. doi: 10.1126/sciadv.abk2746.
- [201] Yoichi Nagata, Keng-Hsueh Lan, Xiaoyan Zhou, Ming Tan, Francisco J. Esteva, Aysegul A. Sahin, Kristine S. Klos, Ping Li, Brett P. Monia, Nina T. Nguyen, Gabriel N. Hortobagyi, Mien-Chie Hung, and Dihua Yu. Pten activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of pten predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell*, 6(2):117–127, 2004. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.022.
- [202] Chan Kim, Choong-Kun Lee, Hong Jae Chon, Joo Hoon Kim, Hyung Soon Park, Su Jin Heo, Hyun Jeong Kim, Tae Soo Kim, Woo Sun Kwon, Hyun Cheol Chung, and Sun Young Rha. Pten loss and level of her2 amplification is associated with trastuzumab resistance and prognosis in her2-positive gastric cancer. *Oncotarget*, 8(69):113494–113501, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.23054.
- [203] Daiju Yokoyama, Shigeo Hisamori, Yasunori Deguchi, Tatsuto Nishigori, Hiroshi Okabe, Seiichiro Kanaya, Dai Manaka, Yoshio Kadokawa, Hiroaki Hata, Sachiko Minamiguchi, Shigeru Tsunoda, Kazutaka Obama, and Yoshiharu Sakai. Pten is a predictive biomarker of trastuzumab resistance and prognostic factor in her2-overexpressing gastroesophageal adenocarcinoma. *Scientific reports*, 11(1):9013, 2021. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-021-88331-3.
- [204] Mothaffar F. Rimawi, Carmine de Angelis, Alejandro Contreras, Fresia Pareja, Felipe C. Geyer, Kathleen A. Burke, Sabrina Herrera, Tao Wang, Ingrid A. Mayer, Andres Forero, Rita Nanda, Matthew P. Goetz, Jenny C. Chang, Ian E. Krop, Antonio C. Wolff, Anne C. Pavlick, Suzanne A. W. Fuqua, Carolina Gutierrez, Susan G. Hilsenbeck, Marilyn M. Li, Britta Weigelt, Jorge S. Reis-Filho, C. Kent Osborne, and Rachel Schiff. Low pten levels and pik3ca mutations predict resistance to neoadjuvant lapatinib and trastuzumab without chemotherapy in patients with her2 over-expressing breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 167(3):731–740, 2018. doi: 10.1007/s10549-017-4533-9.
- [205] H-P Kim, S-W Han, S-H Song, E-G Jeong, M-Y Lee, D. Hwang, S-A Im, Y-J Bang, and T-Y Kim. Testican-1-mediated epithelial-mesenchymal transition signaling confers acquired resistance to lapatinib in her2-positive gastric cancer. *Oncogene*, 33(25):3334–3341, 2014. doi: 10.1038/onc.2013.285.
- [206] Hasan Korkaya, Gwang-Il Kim, April Davis, Fayaz Malik, N. Lynn Henry, Suthinee Ithimakin, Ahmed A. Quraishi, Nader Tawakkol, Rosemarie D’Angelo, Amanda K. Paulson, Susan Chung, Tahra Luther, Hayley J. Paholak, Suling Liu, Khaled A. Hassan, Qin Zen, Shawn G. Clouthier, and Max S. Wicha. Activation of an il6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in her2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Molecular cell*, 47(4):570–584, 2012. ISSN 1097-2765. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.014.

- [207] Zhengyan Yang, Liang Guo, Dan Liu, Limin Sun, Hongyu Chen, Que Deng, Yanjun Liu, Ming Yu, Yuanfang Ma, Ning Guo, and Ming Shi. Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of il-6/stat3/jagged-1/notch positive feedback loop. *Oncotarget*, 6(7):5072–5087, 2015. doi: 10.18632/oncotarget.3241.
- [208] Mei Hua Jin, Ah-Rong Nam, Ji Eun Park, Ju-Hee Bang, Yung-Jue Bang, and Do-Youn Oh. Resistance mechanism against trastuzumab in her2-positive cancer cells and its negation by src inhibition. *Molecular cancer therapeutics*, 16(6):1145–1154, 2017. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0669.
- [209] Yong Sang Hong, Jihun Kim, Eirini Pectasides, Cameron Fox, Seung-Woo Hong, Qiuping Ma, Gabrielle S. Wong, Shouyong Peng, Matthew D. Stachler, Aaron R. Thorner, Paul van Hummelen, and Adam J. Bass. Src mutation induces acquired lapatinib resistance in erbb2-amplified human gastroesophageal adenocarcinoma models. *PLoS one*, 9(10):e109440, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0109440.
- [210] Shaza Ahmed, Hossam Taha Mohamed, Noura El-Husseiny, Manal M. El Mahdy, Gehan Safwat, Ayman A. Diab, Ahmed A. El-Sherif, Mohamed El-Shinawi, and Mona Mostafa Mohamed. Il-8 secreted by tumor associated macrophages contribute to lapatinib resistance in her2-positive locally advanced breast cancer via activation of src/stat3/erk1/2-mediated egfr signaling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(6):118995, 2021. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.118995.
- [211] Cristina Oliveras-Ferraro, Bruna Corominas-Faja, Sílvia Cufí, Alejandro Vazquez-Martin, Begoña Martin-Castillo, Juan Manuel Iglesias, Eugeni López-Bonet, Ángel G. Martin, and Javier A. Menendez. Epithelial-to-mesenchymal transition (emt) confers primary resistance to trastuzumab (herceptin). *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(21):4020–4032, 2012. doi: 10.4161/cc.22225.
- [212] Jihun Kim, Cameron Fox, Shouyong Peng, Mark Pusung, Eirini Pectasides, Eric Matthee, Yong Sang Hong, In-Gu Do, Jiryeon Jang, Aaron R. Thorner, Paul van Hummelen, Anil K. Rustgi, Kwok-Kin Wong, Zhongren Zhou, Ping Tang, Kyoung-Mee Kim, Jeeyun Lee, and Adam J. Bass. Preexisting oncogenic events impact trastuzumab sensitivity in erbb2-amplified gastroesophageal adenocarcinoma. *The Journal of clinical investigation*, 124(12):5145–5158, 2014. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI75200.
- [213] Serenella M. Pupa, Francesca Ligorio, Valeria Cancila, Alma Franceschini, Claudio Tripodo, Claudio Vernieri, and Lorenzo Castagnoli. Her2 signaling and breast cancer stem cells: The bridge behind her2-positive breast cancer aggressiveness and therapy refractoriness. *Cancers*, 13(19), 2021. ISSN 2072-6694. doi: 10.3390/cancers13194778.
- [214] Yanghong Ni, Xiaoting Zhou, Jia Yang, Houhui Shi, Hongyi Li, Xia Zhao, and Xuelei Ma. The role of tumor-stroma interactions in drug resistance within tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9:637675, 2021. ISSN 2296-634X. doi: 10.3389/fcell.2021.637675.
- [215] Ravid Straussman, Teppei Morikawa, Kevin Shee, Michal Barzily-Rokni, Zhi Rong Qian, Jinyan Du, Ashli Davis, Margaret M. Mongare, Joshua Gould, Dennie T. Frederick, Zachary A. Cooper, Paul B. Chapman, David B. Solit, Antoni Ribas, Roger S. Lo, Keith T. Flaherty, Shuji Ogino, Jennifer A. Wargo, and Todd R. Golub. Tumour micro-environment elicits innate resistance to raf inhibitors through hgf secretion. *Nature*, 487(7408):500–504, 2012. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature11183.

- [216] Yasushi Shintani, Ayako Fujiwara, Toru Kimura, Tomohiro Kawamura, Soichiro Funaki, Masato Minami, and Meinoshin Okumura. Il-6 secreted from cancer-associated fibroblasts mediates chemoresistance in nsclc by increasing epithelial-mesenchymal transition signaling. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(9):1482–1492, 2016. doi: 10.1016/j.jtho.2016.05.025.
- [217] Jing Zhai, Jiajia Shen, Guiping Xie, Jiaqi Wu, Mingfang He, Lili Gao, Yifen Zhang, Xuequan Yao, and Lizong Shen. Cancer-associated fibroblasts-derived il-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer. *Cancer letters*, 454:37–43, 2019. doi: 10.1016/j.canlet.2019.04.002.
- [218] Gemma Migneco, Diana Whitaker-Menezes, Barbara Chiavarina, Remedios Castello-Cros, Stephanos Pavlides, Richard G. Pestell, Alessandro Fatatis, Neal Flomenberg, Aristotelis Tsirigos, Anthony Howell, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(12):2412–2422, 2010. doi: 10.4161/cc.9.12.11989.
- [219] Francesca Montenegro and Stefano Indraccolo. Metabolism in the tumor microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, 1263:1–11, 2020. ISSN 0065-2598. doi: 10.1007/978-3-030-44518-8{\textunderscore}1.
- [220] P. Mathot, M. Grandin, G. Devailly, F. Souaze, V. Cahais, S. Moran, M. Campone, Z. Herceg, M. Esteller, P. Juin, P. Mehlen, and R. Dante. Dna methylation signal has a major role in the response of human breast cancer cells to the microenvironment. *Oncogenesis*, 6(10):e390, 2017. ISSN 2157-9024. doi: 10.1038/oncsis.2017.88.
- [221] Jing Ren, Liang Ding, Dongya Zhang, Guoping Shi, Qianyun Xu, Sunan Shen, Yaping Wang, Tingting Wang, and Yayi Hou. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncrna h19. *Theranostics*, 8(14):3932–3948, 2018. doi: 10.7150/thno.25541.
- [222] Yu-Quan Xiong, Hui-Chuan Sun, Wei Zhang, Xiao-Dong Zhu, Peng-Yuan Zhuang, Ju-Bo Zhang, Lu Wang, Wei-Zhong Wu, Lun-Xiu Qin, and Zhao-You Tang. Human hepatocellular carcinoma tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability and drug resistance compared with normal endothelial cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(15):4838–4846, 2009. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2780.
- [223] Limin Huang, Christelle Perrault, Jennifer Coelho-Martins, Chaoquan Hu, Charlène Dulong, Mariana Varna, Jielin Liu, Jian Jin, Claudine Soria, Lionel Cazin, Anne Janin, Hong Li, Rémi Varin, and He Lu. Induction of acquired drug resistance in endothelial cells and its involvement in anticancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, 6:49, 2013. doi: 10.1186/1756-8722-6-49.
- [224] Kosuke Akiyama, Noritaka Ohga, Yasuhiro Hida, Taisuke Kawamoto, Yoshihiro Sadamoto, Shuhei Ishikawa, Nako Maishi, Tomoshige Akino, Miyako Kondoh, Aya Matsuda, Nobuo Inoue, Masanobu Shindoh, and Kyoko Hida. Tumor endothelial cells acquire drug resistance by mdr1 up-regulation via vegf signaling in tumor microenvironment. *The American journal of pathology*, 180(3):1283–1293, 2012. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.029.
- [225] Yu Long, Haipeng Tao, Aida Karachi, Adam J. Grippin, Linchun Jin, Yifan Emily Chang, Wang Zhang, Kyle A. Dyson, Alicia Y. Hou, Meng Na, Loic P. Deleyrolle, Elias J. Sayour, Maryam Rahman, Duane A. Mitchell, Zhiguo Lin, and Jianping Huang. Dysregulation of glutamate transport

- enhances treg function that promotes vegf blockade resistance in glioblastoma. *Cancer research*, 80(3):499–509, 2020. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1577.
- [226] David Gyori, Ee Lyn Lim, Francis M. Grant, Dominik Spensberger, Rahul Roychoudhuri, Stephen J. Shuttleworth, Klaus Okkenhaug, Len R. Stephens, and Phillip T. Hawkins. Compensation between csf1r+ macrophages and foxp3+ treg cells drives resistance to tumor immunotherapy. *JCI insight*, 3(11), 2018. doi: 10.1172/jci.insight.120631.
- [227] R. van Furth, J. A. Raeburn, and T. L. van Zwet. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood*, 54(2):485–500, 1979. ISSN 0006-4971.
- [228] E. Grage-Griebenow, H-D Flad, and M. Ernst. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology*, 69(1):11–20, 2001. ISSN 0741-5400. doi: 10.1189/jlb.69.1.11.
- [229] Simon Yona and Steffen Jung. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology*, 17(1):53–59, 2010. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283324f80.
- [230] Chao Shi and Eric G. Pamer. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 11(11):762–774, 2011. doi: 10.1038/nri3070.
- [231] Chia-Lin Tsou, Wendy Peters, Yue Si, Sarah Slaymaker, Ara M. Aslanian, Stuart P. Weisberg, Matthias Mack, and Israel F. Charo. Critical roles for ccr2 and mcp-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation*, 117(4):902–909, 2007. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI29919.
- [232] Luca L. G. Janssen, Nathalie van Leeuwen-Kerkhoff, Theresia M. Westers, Tanja D. de Gruijl, and Arjan A. van de Loosdrecht. The immunoregulatory role of monocytes and thrombomodulin in myelodysplastic neoplasms. *Frontiers in oncology*, 14:1414102, 2024. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2024.1414102.
- [233] Elvira Mass, Falk Nimmerjahn, Katrin Kierdorf, and Andreas Schlitzer. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nature reviews. Immunology*, 23(9):563–579, 2023. doi: 10.1038/s41577-023-00848-y.
- [234] Abbas Shapouri-Moghaddam, Saeed Mohammadian, Hossein Vazini, Mahdi Taghadosi, Seyed-Alireza Esmaeili, Fatemeh Mardani, Bitia Seifi, Asadollah Mohammadi, Jalil T. Afshari, and Amir-hossein Sahebkar. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*, 233(9):6425–6440, 2018. doi: 10.1002/jcp.26429.
- [235] J. Schnyder and M. Baggiolini. Role of phagocytosis in the activation of macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 148(6):1449–1457, 1978. ISSN 0022-1007. doi: 10.1084/jem.148.6.1449.
- [236] Orna Ernst, Sharat J. Vayttaden, and Iain D. C. Fraser. Measurement of nf-kb activation in tlr-activated macrophages. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1714:67–78, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7519-8\textunderscore5.
- [237] G. Zhang and S. Ghosh. Toll-like receptor-mediated nf-kappab activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *The Journal of clinical investigation*, 107(1):13–19, 2001. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI11837.

- [238] Natalia Roa-Vidal, Adriana S. Rodríguez-Aponte, José A. Lasalde-Dominicci, Coral M. Capó-Vélez, and Manuel Delgado-Vélez. Cholinergic polarization of human macrophages. *International journal of molecular sciences*, 24(21), 2023. doi: 10.3390/ijms242115732.
- [239] E. R. Unanue. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annual review of immunology*, 2: 395–428, 1984. ISSN 0732-0582. doi: 10.1146/annurev.iy.02.040184.002143.
- [240] Eileen Uribe-Querol and Carlos Rosales. Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. *Frontiers in Immunology*, 11:1066, 2020. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2020.01066. URL <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01066/full>.
- [241] Thomas R. Malek and Ethan M. Shevach. The role of macrophages in the processing and presentation of protein antigens to t lymphocytes. In Joseph Bellanti, editor, *Immunology*, pages 141–155. Springer, New York, NY, 1984. ISBN 978-1-4757-6784-1. doi: 10.1007/978-1-4757-6784-1_9. URL https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-6784-1_9.
- [242] H. P. Hartung and U. Hadding. Synthesis of complement by macrophages and modulation of their functions through complement activation. *Springer seminars in immunopathology*, 6(4):283–326, 1983. ISSN 0344-4325. doi: 10.1007/BF02116277.
- [243] M. Afzal Khan, A. M. Assiri, and D. C. Broering. Complement and macrophage crosstalk during process of angiogenesis in tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 22(1):58, 2015. ISSN 1423-0127. doi: 10.1186/s12929-015-0151-1. URL <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-015-0151-1>.
- [244] Siamon Gordon. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology*, 3(1):23–35, 2003. doi: 10.1038/nri978.
- [245] Marco Orecchioni, Yanal Ghosheh, Akula Bala Pramod, and Klaus Ley. Macrophage polarization: Different gene signatures in m1(lps+) vs. classically and m2(lps-) vs. alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10:1084, 2019. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084. URL <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.01084/full>.
- [246] Fernando Oneissi Martinez, Antonio Sica, Alberto Mantovani, and Massimo Locati. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13:453–461, 2008. ISSN 1093-9946. doi: 10.2741/2692.
- [247] Alberto Mantovani, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena, Annunciata Vecchi, and Massimo Locati. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25(12):677–686, 2004. ISSN 1471-4906. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.
- [248] Min Luo, Fukun Zhao, Huan Cheng, Mu Su, and Yuanmin Wang. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 15:1352946, 2024. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2024.1352946. URL <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1352946/full>.
- [249] F. Porcheray, S. Viaud, A-C Rimaniol, C. Léone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, D. Dormont, and G. Gras. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clinical and experimental immunology*, 142(3):481–489, 2005. ISSN 0009-9104. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x.

- [250] Luca Cassetta and Jeffrey W. Pollard. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(12):887–904, 2018. ISSN 1474-1784. doi: 10.1038/nrd.2018.169. URL <https://www.nature.com/articles/nrd.2018.169>.
- [251] Slava Epelman, Kory J. Lavine, and Gwendalyn J. Randolph. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41(1):21–35, 2014. ISSN 1074-7613. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013.
- [252] Craig Murdoch, Athina Giannoudis, and Claire E. Lewis. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 104(8):2224–2234, 2004. ISSN 0006-4971. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109.
- [253] Paul Takam Kamga, Marie Mayenga, Louise Sebane, Adrien Costantini, Catherine Julie, Claude Capron, Florence Parent, Andrei Seferian, Catherine Guettier, Jean-François Emile, and Etienne Giroux Leprieur. Colony stimulating factor-1 (csf-1) signalling is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 188:107447, 2024. doi: 10.1016/j.lungcan.2023.107447.
- [254] Virna Cortez-Retamozo, Martin Etzrodt, Andita Newton, Philipp J. Rauch, Aleksey Chudnovskiy, Cedric Berger, Russell J. H. Ryan, Yoshiko Iwamoto, Brett Marinelli, Rostic Gorbato, Reza Forghani, Tatiana I. Novobrantseva, Victor Koteliansky, Jose-Luiz Figueiredo, John W. Chen, Daniel G. Anderson, Matthias Nahrendorf, Filip K. Swirski, Ralph Weissleder, and Mikael J. Pittet. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7):2491–2496, 2012. doi: 10.1073/pnas.1113744109. URL <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1113744109>.
- [255] Roy Noy and Jeffrey W. Pollard. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1):49–61, 2014. ISSN 1074-7613. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
- [256] Yibing Chen, Yucen Song, Wei Du, Longlong Gong, Haocai Chang, and Zhengzhi Zou. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of biomedical science*, 26(1):78, 2019. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z.
- [257] P. ALEXANDER and R. EVANS. Endotoxin and double stranded rna render macrophages cytotoxic. *Nature: New biology*, 232(29):76–78, 1971. ISSN 0090-0028. doi: 10.1038/newbio232076a0. URL <https://www.nature.com/articles/newbio232076a0>.
- [258] I. J. Fidler and A. J. Schroit. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. *Biochimica et biophysica acta*, 948(2):151–173, 1988. ISSN 0006-3002. doi: 10.1016/0304-419x(88)90009-1.
- [259] Mariana Reis-Sobreiro, Afonso Teixeira da Mota, Carolina Jardim, and Karine Serre. Bringing macrophages to the frontline against cancer: Current immunotherapies targeting macrophages. *Cells*, 10(9), 2021. doi: 10.3390/cells10092364.
- [260] R. EVANS and P. ALEXANDER. Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature*, 228(5272):620–622, 1970. doi: 10.1038/228620a0.
- [261] Udit Basak, Tania Sarkar, Sumon Mukherjee, Sourio Chakraborty, Apratim Dutta, Saikat Dutta, Debadatta Nayak, Subhash Kaushik, Tanya Das, and Gaurisankar Sa. Tumor-associated macrophages: an effective player of the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14:1295257, 2023. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2023.1295257.

- [262] Yueyun Pan, Yinda Yu, Xiaojian Wang, and Ting Zhang. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Frontiers in Immunology*, 11:583084, 2020. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2020.583084. URL <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7751482/>.
- [263] Subhra K. Biswas, Paola Allavena, and Alberto Mantovani. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology*, 35(5): 585–600, 2013. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7.
- [264] Mikael J. Pittet, Olivier Michielin, and Denis Migliorini. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(6):402–421, 2022. ISSN 1759-4782. doi: 10.1038/s41571-022-00620-6. URL https://www.nature.com/articles/s41571-022-00620-6?utm_source=chatgpt.com.
- [265] Sijin Cheng, Ziyi Li, Ranran Gao, Baocai Xing, Yunong Gao, Yu Yang, Shishang Qin, Lei Zhang, Hanqiang Ouyang, Peng Du, Liang Jiang, Bin Zhang, Yue Yang, Xiliang Wang, Xianwen Ren, Jin-Xin Bei, Xueda Hu, Zhaode Bu, Jiafu Ji, and Zemin Zhang. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell*, 184(3):792–809.e23, 2021. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.010.
- [266] Luca Cassetta, Stamatina Fragkogianni, Andrew H. Sims, Agnieszka Swierczak, Lesley M. Forrester, Hui Zhang, Daniel Y. H. Soong, Tiziana Cotechini, Pavana Anur, Elaine Y. Lin, Antonella Fidanza, Martha Lopez-Yrigoyen, Michael R. Millar, Alexandra Urman, Zhichao Ai, Paul T. Spellman, E. Shelley Hwang, J. Michael Dixon, Lisa Wiechmann, Lisa M. Coussens, Harriet O. Smith, and Jeffrey W. Pollard. Human tumor-associated macrophage and monocyte transcriptional landscapes reveal cancer-specific reprogramming, biomarkers, and therapeutic targets. *Cancer cell*, 35(4):588–602.e10, 2019. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccell.2019.02.009.
- [267] Sunny Z. Wu, Ghamdan Al-Eryani, Daniel Lee Roden, Simon Junankar, Kate Harvey, Alma Andersson, Aatish Thennavan, Chenfei Wang, James R. Torpy, Nenad Bartonicek, Taopeng Wang, Ludvig Larsson, Dominik Kaczorowski, Neil I. Weisenfeld, Cedric R. Uytingco, Jennifer G. Chew, Zachary W. Bent, Chia-Ling Chan, Vikkitharan Gnanasambandapillai, Charles-Antoine Dutertre, Laurence Gluch, Mun N. Hui, Jane Beith, Andrew Parker, Elizabeth Robbins, Davendra Segara, Caroline Cooper, Cindy Mak, Belinda Chan, Sanjay Warriar, Florent Ginhoux, Ewan Millar, Joseph E. Powell, Stephen R. Williams, X. Shirley Liu, Sandra O’Toole, Elgene Lim, Joakim Lundberg, Charles M. Perou, and Alexander Swarbrick. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nature Genetics*, 53(9):1334–1347, 2021. ISSN 1546-1718. doi: 10.1038/s41588-021-00911-1. URL <https://www.nature.com/articles/s41588-021-00911-1>.
- [268] Zoey Zeyuan Ji, Max Kam-Kwan Chan, Alex Siu-Wing Chan, Kam-Tong Leung, Xiaohua Jiang, Ka-Fai To, Yi Wu, and Patrick Ming-Kuen Tang. Tumour-associated macrophages: versatile players in the tumour microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11:1261749, 2023. ISSN 2296-634X. doi: 10.3389/fcell.2023.1261749.
- [269] Ningning Dong, Xiangyi Shi, Suihai Wang, Yanjun Gao, Zhenzhan Kuang, Qian Xie, Yonglong Li, Huan Deng, Yingsong Wu, Ming Li, and Ji-Liang Li. M2 macrophages mediate sorafenib resistance by secreting hgf in a feed-forward manner in hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*, 121(1):22–33, 2019. ISSN 0007-0920. doi: 10.1038/s41416-019-0482-x.
- [270] Peiwen Chen, Yujie Huang, Rosabel Bong, Yanping Ding, Nan Song, Xiaofeng Wang, Xiaomin Song, and Yongzhang Luo. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clinical cancer research : an*

- official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(23):7230–7239, 2011. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1354.
- [271] Ved P. Sharma, Binwu Tang, Yarong Wang, Camille L. Duran, George S. Karagiannis, Emily A. Xue, David Entenberg, Lucia Borriello, Anouchka Coste, Robert J. Eddy, Gina Kim, Xianjun Ye, Joan G. Jones, Eli Grunblatt, Nathan Agi, Sweta Roy, Gargi Bandyopadhyaya, Esther Adler, Chinmay R. Surve, Dominic Esposito, Sumanta Goswami, Jeffrey E. Segall, Wenjun Guo, John S. Condeelis, Lalage M. Wakefield, and Maja H. Oktay. Live tumor imaging shows macrophage induction and tmem-mediated enrichment of cancer stem cells during metastatic dissemination. *Nature communications*, 12(1):7300, 2021. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-021-27308-2.
- [272] Shreya Raghavan, Pooja Mehta, Yuying Xie, Yu L. Lei, and Geeta Mehta. Ovarian cancer stem cells and macrophages reciprocally interact through the wnt pathway to promote pro-tumoral and malignant phenotypes in 3d engineered microenvironments. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1):190, 2019. doi: 10.1186/s40425-019-0666-1.
- [273] Fan Fan, Rui Wang, Delphine R. Boulbes, Huiyuan Zhang, Stephanie S. Watowich, Ling Xia, Xiangcang Ye, Rajat Bhattacharya, and Lee M. Ellis. Macrophage conditioned medium promotes colorectal cancer stem cell phenotype via the hedgehog signaling pathway. *PloS one*, 13(1):e0190070, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0190070.
- [274] Francesco Verona, Sebastiano Di Bella, Roberto Schirano, Camilla Manfredi, Francesca Angeloro, Giulia Bozzari, Matilde Todaro, Giuseppe Giannini, Giorgio Stassi, and Veronica Veschi. Cancer stem cells and tumor-associated macrophages as mates in tumor progression: mechanisms of crosstalk and advanced bioinformatic tools to dissect their phenotypes and interaction. *Frontiers in Immunology*, 16:1529847, 2025. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2025.1529847.
- [275] Yibing Chen, Yucen Song, Wei Du, Longlong Gong, Haocai Chang, and Zhengzhi Zou. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 26(1):78, 2019. ISSN 1423-0127. doi: 10.1186/s12929-019-0568-z. URL <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-019-0568-z>.
- [276] Rui Wang, Jie Zhang, Sufeng Chen, Meng Lu, Xiaoyang Luo, Shihua Yao, Shilei Liu, Ying Qin, and Haiquan Chen. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 74(2):188–196, 2011. doi: 10.1016/j.lungcan.2011.04.009.
- [277] Yuan Tian, Yantong Guo, Pei Zhu, Dongxu Zhang, Shanshan Liu, Mengyan Tang, Yuanxin Wang, Zheng Jin, Dong Li, Dongmei Yan, Guiying Li, and Xun Zhu. Trim59 loss in m2 macrophages promotes melanoma migration and invasion by upregulating mmp-9 and madcam1. *Aging*, 11(19):8623–8641, 2019. doi: 10.18632/aging.102351.
- [278] Lin Liu, Yu Ye, and Xiumei Zhu. Mmp-9 secreted by tumor associated macrophages promoted gastric cancer metastasis through a pi3k/akt/snail pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 117:109096, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109096.
- [279] Zhengyang Hu, Qihai Sui, Xing Jin, Guangyao Shan, Yiwei Huang, Yanjun Yi, Dejun Zeng, Mengnan Zhao, Cheng Zhan, Qun Wang, Zongwu Lin, Tao Lu, and Zhencong Chen. Il6-stat3-c/ebpb-il6 positive feedback loop in tumor-associated macrophages promotes the emt and metastasis of lung adenocarcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1):63, 2024. ISSN 1756-9966. doi: 10.1186/s13046-024-02989-x.

- [280] Liangying Zhu, Xiao Fu, Xiang Chen, Xiaodong Han, and Ping Dong. M2 macrophages induce emt through the *tgf-b/smad2* signaling pathway. *Cell biology international*, 41(9):960–968, 2017. doi: 10.1002/cbin.10788.
- [281] Xiaoxiao Li, Ling Chen, Xiaobo Peng, and Xianbao Zhan. Progress of tumor-associated macrophages in the epithelial-mesenchymal transition of tumor. *Frontiers in oncology*, 12:911410, 2022. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2022.911410.
- [282] Elaine Y. Lin, Jiu-Feng Li, Leoid Gnatovskiy, Yan Deng, Liyin Zhu, Dustin A. Grzesik, Hong Qian, Xiao-nan Xue, and Jeffrey W. Pollard. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer research*, 66(23):11238–11246, 2006. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278.
- [283] Elaine Y. Lin and Jeffrey W. Pollard. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer research*, 67(11):5064–5066, 2007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0912.
- [284] Xuxue Guo, Haonan Zhang, Chengcheng He, Kaiwen Qin, Qiuhua Lai, Yuxin Fang, Qianhui Chen, Weize Li, Yiqing Wang, Xinke Wang, Aimin Li, Side Liu, and Qingyuan Li. Runx1 promotes angiogenesis in colorectal cancer by regulating the crosstalk between tumor cells and tumor associated macrophages. *Biomarker research*, 12(1):29, 2024. ISSN 2050-7771. doi: 10.1186/s40364-024-00573-1.
- [285] Abdullah Farhan Saeed. Tumor-associated macrophages: Polarization, immunoregulation, and immunotherapy. *Cells*, 14(10), 2025. doi: 10.3390/cells14100741.
- [286] Yunzhou Pu and Qing Ji. Tumor-associated macrophages regulate *pd-1/pd-l1* immunosuppression. *Frontiers in Immunology*, 13:874589, 2022. ISSN 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2022.874589.
- [287] Brian Ruffell and Lisa M. Coussens. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer cell*, 27(4):462–472, 2015. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccell.2015.02.015.
- [288] Yimin Ding, Qian Cao, Wenjuan Yang, Junjie Xu, and Peng Xiao. Macrophage: Hidden criminal in therapy resistance. *Journal of innate immunity*, 16(1):188–202, 2024. doi: 10.1159/000538212.
- [289] Mojtaba Mollaei, Zuhair Mohammad Hassan, Fatemeh Khorshidi, and Ladan Langroudi. Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. are they really as smart as the tumor cells? *Translational oncology*, 14(5):101056, 2021. ISSN 1936-5233. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101056.
- [290] Caitlin M. Tilsed, Scott A. Fisher, Anna K. Nowak, Richard A. Lake, and W. Joost Lesterhuis. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Frontiers in oncology*, 12:960317, 2022. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2022.960317.
- [291] Tanaya Shree, Oakley C. Olson, Benelita T. Elie, Jemila C. Kester, Alfred L. Garfall, Kenishana Simpson, Katherine M. Bell-McGuinn, Emily C. Zabor, Edi Brogi, and Johanna A. Joyce. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes & development*, 25(23):2465–2479, 2011. doi: 10.1101/gad.180331.111.
- [292] Oakley C. Olson, Hyunjung Kim, Daniela F. Quail, Emily A. Foley, and Johanna A. Joyce. Tumor-associated macrophages suppress the cytotoxic activity of antimetabolic agents. *Cell reports*, 19(1):101–113, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.038.

- [293] Xiaolan Zhu, Huiling Shen, Xinming Yin, Meiling Yang, Hong Wei, Qi Chen, Fan Feng, Yueqin Liu, Wenlin Xu, and Yuefeng Li. Macrophages derived exosomes deliver mir-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1):81, 2019. ISSN 1756-9966. doi: 10.1186/s13046-019-1095-1. URL <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1095-1>.
- [294] Lichao Zhang, Xiaoqing Lu, Yuanzhi Xu, Xiaoqin La, Jinmiao Tian, Aiping Li, Hanqing Li, Changxin Wu, Yanfeng Xi, Guisheng Song, Zhaocai Zhou, Wenqi Bai, Liwei An, and Zhuoyu Li. Tumor-associated macrophages confer colorectal cancer 5-fluorouracil resistance by promoting mrp1 membrane translocation via an intercellular cxcl17/cxcl22-ccr4-atf6-grp78 axis. *Cell Death & Disease*, 14(9):582, 2023. ISSN 2041-4889. doi: 10.1038/s41419-023-06108-0.
- [295] Yuan Yin, Surui Yao, Yaling Hu, Yuyang Feng, Min Li, Zehua Bian, Jiwei Zhang, Yan Qin, Xiaowei Qi, Leyuan Zhou, Bojian Fei, Jian Zou, Dong Hua, and Zhaohui Huang. The immune-microenvironment confers chemoresistance of colorectal cancer through macrophage-derived il6. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(23):7375–7387, 2017. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1283.
- [296] Wan Liu, Wenjing Wang, Xinran Wang, Cong Xu, Ning Zhang, and Wen Di. Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the ccl20-ccr6 axis. *Cancer letters*, 472:59–69, 2020. doi: 10.1016/j.canlet.2019.12.024.
- [297] Jian Ma, Fuerhaiti Shayiti, Jing Ma, Meng Wei, Tingting Hua, Rong Zhang, Junyan Su, and Peng Chen. Tumor-associated macrophage-derived ccl5 promotes chemotherapy resistance and metastasis in prostatic cancer. *Cell biology international*, 45(10):2054–2062, 2021. doi: 10.1002/cbin.11630.
- [298] Leila Akkari, Robert L. Bowman, Jeremy Tessier, Florian Klemm, Shanna M. Handgraaf, Marnix de Groot, Daniela F. Quail, Lucie Tillard, Jules Gadiot, Jason T. Huse, Dieta Brandsma, Johan Westerga, Colin Watts, and Johanna A. Joyce. Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal csf-1r inhibition as a strategy to overcome resistance. *Science translational medicine*, 12(552), 2020. doi: 10.1126/scitranslmed.aaw7843.
- [299] Xiteng Yin, Shengwei Han, Chuanhui Song, Huihui Zou, Zheng Wei, Wenguang Xu, Jianchuan Ran, Chuanchao Tang, Yufeng Wang, Yu Cai, Qingang Hu, and Wei Han. Metformin enhances gefitinib efficacy by interfering with interactions between tumor-associated macrophages and head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cellular oncology (Dordrecht, Netherlands)*, 42(4):459–475, 2019. doi: 10.1007/s13402-019-00446-y.
- [300] Emily A. Irey, Chelsea M. Lassiter, Nicholas J. Brady, Pavlina Chuntova, Ying Wang, Todd P. Knutson, Christine Henzler, Thomas S. Chaffee, Rachel I. Vogel, Andrew C. Nelson, Michael A. Farrar, and Kathryn L. Schwertfeger. Jak/stat inhibition in macrophages promotes therapeutic resistance by inducing expression of protumorigenic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(25):12442–12451, 2019. doi: 10.1073/pnas.1816410116. URL <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1816410116>.
- [301] Yu Liu, Xuemei Ji, Nannan Kang, Junfei Zhou, Xue Liang, Jiaxin Li, Tianzhen Han, Chen Zhao, and Tianwu Yang. Tumor necrosis factor α inhibition overcomes immunosuppressive m2b macrophage-induced bevacizumab resistance in triple-negative breast cancer. *Cell Death & Disease*, 11(11):993, 2020. ISSN 2041-4889. doi: 10.1038/s41419-020-03161-x.

- [302] Mikhail Binnewies, Joshua L. Pollack, Joshua Rudolph, Subhadra Dash, Marwan Abushawish, Tian Lee, Nadine S. Jahchan, Pamela Canaday, Erick Lu, Manith Norng, Shilpa Mankikar, Victoria M. Liu, Xiaoyan Du, Amanda Chen, Ranna Mehta, Rachael Palmer, Vladislava Juric, Linda Liang, Kevin P. Baker, Leonard Reyno, Matthew F. Krummel, Michel Streuli, and Venkataraman Sriram. Targeting trem2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy. *Cell reports*, 37(3): 109844, 2021. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109844.
- [303] Qinchuan Wu, Wuhua Zhou, Shengyong Yin, Yuan Zhou, Tianchi Chen, Junjie Qian, Rong Su, Liangjie Hong, Haohao Lu, Feng Zhang, Haiyang Xie, Lin Zhou, and Shusen Zheng. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1-positive tumor-associated macrophages induced by hypoxia reverses immunosuppression and anti-programmed cell death ligand 1 resistance in liver cancer. *Hepatology*, 70(1):198–214, 2019. ISSN 0270-9139. doi: 10.1002/hep.30593. URL https://journals.lww.com/hep/fulltext/2019/07000/blocking_triggering_receptor_expressed_on_myeloid.17.aspx.
- [304] Elah Pick, Mary M. McCarthy, and Harriet M. Kluger. Assessing expression of apoptotic markers using large cohort tissue microarrays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 414:83–93, 2008. doi: 10.1007/978-1-59745-339-4\textunderscore}8.
- [305] Fay Wang, John Flanagan, Nan Su, Li-Chong Wang, Son Bui, Allissa Nielson, Xingyong Wu, Hong-Thuy Vo, Xiao-Jun Ma, and Yuling Luo. Rnascope: a novel in situ rna analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 14(1): 22–29, 2012. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
- [306] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76–85, 1985. ISSN 00032697. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [307] Karen J. Wiechelman, Robert D. Braun, and Jimmie D. Fitzpatrick. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1):231–237, 1988. ISSN 00032697. doi: 10.1016/0003-2697(88)90383-1.
- [308] Aravind Subramanian, Pablo Tamayo, Vamsi K. Mootha, Sayan Mukherjee, Benjamin L. Ebert, Michael A. Gillette, Amanda Paulovich, Scott L. Pomeroy, Todd R. Golub, Eric S. Lander, and Jill P. Mesirov. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43):15545–15550, 2005. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- [309] Andrew J. Gentles, Aaron M. Newman, Chih Long Liu, Scott V. Bratman, Weiguo Feng, Dongkyoon Kim, Viswam S. Nair, Yue Xu, Amanda Khuong, Chuong D. Hoang, Maximilian Diehn, Robert B. West, Sylvia K. Plevritis, and Ash A. Alizadeh. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nature medicine*, 21(8):938–945, 2015. doi: 10.1038/nm.3909.
- [310] Irina Larionova, Gulnara Tuguzbaeva, Anastasia Ponomaryova, Marina Stakheyeva, Nadezhda Cherdyntseva, Valentin Pavlov, Evgeniy Choinzonov, and Julia Kzhyshkowska. Tumor-associated macrophages in human breast, colorectal, lung, ovarian and prostate cancers. *Frontiers in oncology*, 10:566511, 2020. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2020.566511.

- [311] Michael Quante, Julia Varga, Timothy C. Wang, and Florian R. Greten. The gastrointestinal tumor microenvironment. *Gastroenterology*, 145(1):63–78, 2013. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.052.
- [312] Soo Mi Kim, Yun-Yong Park, Eun Sung Park, Jae Yong Cho, Julie G. Izzo, Di Zhang, Sang-Bae Kim, Jeffrey H. Lee, Manoop S. Bhutani, Stephen G. Swisher, Xifeng Wu, Kevin R. Coombes, Dipen Maru, Kenneth K. Wang, Navtej S. Buttar, Jaffer A. Ajani, and Ju-Seog Lee. Prognostic biomarkers for esophageal adenocarcinoma identified by analysis of tumor transcriptome. *PloS one*, 5(11):e15074, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0015074.
- [313] E. McAdam, H. N. Haboubi, G. Forrester, Z. Eltahir, S. Spencer-Harty, C. Davies, A. P. Griffiths, J. N. Baxter, and G. J. S. Jenkins. Inducible nitric oxide synthase (inos) and nitric oxide (no) are important mediators of reflux-induced cell signalling in esophageal cells. *Carcinogenesis*, 33(11):2035–2043, 2012. doi: 10.1093/carcin/bgs241.
- [314] J. S. Lee, T. Y. Oh, B. O. Ahn, H. Cho, W. B. Kim, Y. B. Kim, Y. J. Surh, H. J. Kim, and K. B. Hahm. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutation research*, 480-481:189–200, 2001. ISSN 0027-5107. doi: 10.1016/s0027-5107(01)00199-3.
- [315] K. T. Wilson, S. Fu, K. S. Ramanujam, and S. J. Meltzer. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer research*, 58(14):2929–2934, 1998.
- [316] Bo Jiang, Shengqian Zhao, Zhen Tao, Jin Wen, Yancheng Yang, Yin Zheng, Hongling Yan, Ying Sheng, and Aimin Gao. Controlled bile acid exposure to oesophageal mucosa causes up-regulation of nuclear g-h2ax possibly via inos induction. *Bioscience reports*, 36(4), 2016. doi: 10.1042/BSR20160124.
- [317] Mohamed M. M. Abdel-Latif, James O'Riordan, Henry J. Windle, Eleanor Carton, Nagunivan Ravi, Dermot Kelleher, and John V. Reynolds. Nf-kappab activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Annals of surgery*, 239(4):491–500, 2004. doi: 10.1097/01.sla.0000118751.95179.c6.
- [318] Chris Tselepis, Ian Perry, Chris Dawson, Rob Hardy, S. Jane Darnton, Chris McConkey, Rob C. Stuart, Nick Wright, Rebecca Harrison, and Janusz Antoni Z. Jankowski. Tumour necrosis factor-alpha in barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene*, 21(39):6071–6081, 2002. doi: 10.1038/sj.onc.1205731.
- [319] Michael Quante, Govind Bhagat, Julian A. Abrams, Frederic Marache, Pamela Good, Michele D. Lee, Yoomi Lee, Richard Friedman, Samuel Asfaha, Zinaida Dubeykovskaya, Umar Mahmood, Jose-Luiz Figueiredo, Jan Kitajewski, Carrie Shawber, Charles J. Lightdale, Anil K. Rustgi, and Timothy C. Wang. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of barrett-like metaplasia. *Cancer cell*, 21(1):36–51, 2012. ISSN 1535-6108. doi: 10.1016/j.ccr.2011.12.004.
- [320] M. E. Kavanagh, K. E. O'Sullivan, C. O'Hanlon, J. N. O'Sullivan, J. Lysaght, and J. V. Reynolds. The esophagitis to adenocarcinoma sequence; the role of inflammation. *Cancer letters*, 345(2):182–189, 2014. doi: 10.1016/j.canlet.2013.08.017.
- [321] Natasha Stephens Münch, Hsin-Yu Fang, Jonas Ingermann, H. Carlo Maurer, Akanksha Anand, Victoria Kellner, Vincenz Sahm, Maria Wiethaler, Theresa Baumeister, Frederik Wein, Henrik Einwächter, Florian Bolze, Martin Klingenspor, Dirk Haller, Maria Kavanagh, Joanne Lysaght, Richard

- Friedman, Andrew J. Dannenberg, Michael Pollak, Peter R. Holt, Sureshkumar Muthupalani, James G. Fox, Mark T. Whary, Yoomi Lee, Tony Y. Ren, Rachael Elliot, Rebecca Fitzgerald, Katja Steiger, Roland M. Schmid, Timothy C. Wang, and Michael Quante. High-fat diet accelerates carcinogenesis in a mouse model of barrett's esophagus via interleukin 8 and alterations to the gut microbiome. *Gastroenterology*, 157(2):492–506.e2, 2019. doi: 10.1053/j.gastro.2019.04.013.
- [322] Sama I. Sayin, Theresa Baumeister, Timothy C. Wang, and Michael Quante. Origins of metaplasia in the esophagus: Is this a ge junction stem cell disease? *Digestive diseases and sciences*, 63(8): 2013–2021, 2018. doi: 10.1007/s10620-018-5152-y.
- [323] Andromachi Kotsafti, Matteo Fassan, Francesco Cavallin, Valentina Angerilli, Luca Saadeh, Matteo Cagol, Rita Alfieri, Pierluigi Pilati, Carlo Castoro, Ignazio Castagliuolo, Melania Scarpa, and Marco Scarpa. Tumor immune microenvironment in therapy-naïve esophageal adenocarcinoma could predict the nodal status. *Cancer medicine*, 12(5):5526–5535, 2023. ISSN 2045-7634. doi: 10.1002/cam4.5386.
- [324] Wenqing Cao, Jeffrey H. Peters, Dylan Nieman, Meenal Sharma, Thomas Watson, and JiangZhou Yu. Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *British journal of cancer*, 113(5):738–746, 2015. ISSN 0007-0920. doi: 10.1038/bjc.2015.292.
- [325] Martin Jeremiasen, David Borg, Charlotta Hedner, Maria Svensson, Björn Nodin, Karin Leandersson, Jan Johansson, and Karin Jirström. Tumor-associated cd68+, cd163+, and marco+ macrophages as prognostic biomarkers in patients with treatment-naïve gastroesophageal adenocarcinoma. *Frontiers in oncology*, 10:534761, 2020. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2020.534761.
- [326] Michael Quante, Timothy C. Wang, and Adam J. Bass. Adenocarcinoma of the oesophagus: is it gastric cancer? *Gut*, 72(6):1027–1029, 2023. ISSN 0017-5749. doi: 10.1136/gutjnl-2022-327096.
- [327] Qin Huang, Jiong Shi, Anning Feng, Xiangshan Fan, Lihua Zhang, Hiroshi Mashimo, Daniel Cohen, and Gregory Lauwers. Gastric cardiac carcinomas involving the esophagus are more adequately staged as gastric cancers by the 7th edition of the american joint commission on cancer staging system. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(1):138–146, 2011. doi: 10.1038/modpathol.2010.183.
- [328] Jia Zhang, Yan Yan, Ya Yang, Li Wang, Min Li, Jizhao Wang, Xu Liu, Xiaoyi Duan, and Jiansheng Wang. High infiltration of tumor-associated macrophages influences poor prognosis in human gastric cancer patients, associates with the phenomenon of emt. *Medicine*, 95(6):e2636, 2016. doi: 10.1097/MD.0000000000002636.
- [329] Jiu-Yang Liu, Chun-Wei Peng, Gui-Fang Yang, Wen-Qing Hu, Xiao-Jun Yang, Chao-Qun Huang, Bin Xiong, and Yan Li. Distribution pattern of tumor associated macrophages predicts the prognosis of gastric cancer. *Oncotarget*, 8(54):92757–92769, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.21575.
- [330] Chong-Yu Su, Xiao-Long Fu, Wei Duan, Pei-Wu Yu, and Yong-Liang Zhao. High density of cd68+ tumor-associated macrophages predicts a poor prognosis in gastric cancer mediated by il-6 expression. *Oncology letters*, 15(5):6217–6224, 2018. ISSN 1792-1074. doi: 10.3892/ol.2018.8119.
- [331] A. V. Kurynina, M. V. Erokhina, O. A. Makarevich, V. Yu Sysoeva, L. N. Lepekha, S. A. Kuznetsov, and G. E. Onishchenko. Plasticity of human thp-1 cell phagocytic activity during macrophagic differentiation. *Biochemistry. Biokhimiia*, 83(3):200–214, 2018. doi: 10.1134/S0006297918030021.

- [332] Anthos Christofides, Laura Strauss, Alan Yeo, Carol Cao, Alain Charest, and Vassiliki A. Boussiotis. The complex role of tumor-infiltrating macrophages. *Nature immunology*, 23(8):1148–1156, 2022. ISSN 1529-2908. doi: 10.1038/s41590-022-01267-2.
- [333] Qianqian Xing, Youxin Feng, Haimei Sun, Shu Yang, Tingyi Sun, Xiaoxia Guo, Fengqing Ji, Bo Wu, and Deshan Zhou. Scavenger receptor marco contributes to macrophage phagocytosis and clearance of tumor cells. *Experimental cell research*, 408(2):112862, 2021. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112862.
- [334] D. H. Munn and N. K. Cheung. Antibody-independent phagocytosis of tumor cells by human monocyte-derived macrophages cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 41(1):46–52, 1995. ISSN 0340-7004. doi: 10.1007/BF01788959.
- [335] Lawrence J. Dooling, Jason C. Andrechak, Brandon H. Hayes, Siddhant Kadu, William Zhang, Ruby Pan, Manasvita Vashisth, Jerome Irianto, Cory M. Alvey, Leyuan Ma, and Dennis E. Discher. Cooperative phagocytosis of solid tumours by macrophages triggers durable anti-tumour responses. *Nature biomedical engineering*, 7(9):1081–1096, 2023. doi: 10.1038/s41551-023-01031-3.
- [336] Frank Jacobsen, Jacob Kohsar, Florian Gebauer, Martina Kluth, Claudia Hube-Magg, Ronald Simon, Maximilian Bockhorn, Andrea Hinsch, Eike Burandt, Andreas M. Lübke, Stefan Steurer, Michael Tachezy, Guido Sauter, Jacob R. Izbicki, Wildemar Wilczak, and Nathaniel Melling. Loss of p16 and high ki67 labeling index is associated with poor outcome in esophageal carcinoma. *Oncotarget*, 11(12):1007–1016, 2020. doi: 10.18632/oncotarget.27507.
- [337] C. Y. WU, Z. R. HUANG, R. P. CHEN, and W. P. LIN. Expression of ki-67 protein in adenocarcinoma of esophagogastric junction and its correlation with clinicopathological features and prognosis. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(s6), 2020. doi: 10.36468/pharmaceutical-sciences.spl.71.
- [338] Marjolein Sikkema, Marjon Kerkhof, Ewout W. Steyerberg, Johannes G. Kusters, Paulina M. H. van Strien, Caspar W. N. Looman, Herman van Dekken, Peter D. Siersema, and Ernst J. Kuipers. Aneuploidy and overexpression of ki67 and p53 as markers for neoplastic progression in barrett’s esophagus: a case-control study. *The American journal of gastroenterology*, 104(11):2673–2680, 2009. doi: 10.1038/ajg.2009.437.
- [339] Dan-Dan Xiong, Chu-Mei Zeng, Ling Jiang, Dian-Zhong Luo, and Gang Chen. Ki-67/mki67 as a predictive biomarker for clinical outcome in gastric cancer patients: an updated meta-analysis and systematic review involving 53 studies and 7078 patients. *Journal of Cancer*, 10(22):5339–5354, 2019. ISSN 1837-9664. doi: 10.7150/jca.30074.
- [340] Hasong Jeong, Ilseon Hwang, Sun Hee Kang, Hyeong Chan Shin, and Sun Young Kwon. Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. *Journal of breast cancer*, 22(1):38–51, 2019. ISSN 1738-6756. doi: 10.4048/jbc.2019.22.e5.
- [341] Chuangui Chen, Jinsheng Ding, Zhao Ma, Yongjie Xie, Linhua Zhang, and Dunwan Zhu. Exosome-delivered egfr induced by acidic bile salts regulates macrophage m2 polarization to promote esophageal adenocarcinoma cell proliferation. *OncoTargets and therapy*, 17:113–128, 2024. ISSN 1178-6930. doi: 10.2147/OTT.S437560.

- [342] Jie Chen, Di Zhao, Lingyuan Zhang, Jing Zhang, Yuanfan Xiao, Qingnan Wu, Yan Wang, and Qimin Zhan. Tumor-associated macrophage (tam)-derived ccl22 induces fak addiction in esophageal squamous cell carcinoma (escc). *Cellular & molecular immunology*, 19(9):1054–1066, 2022. doi: 10.1038/s41423-022-00903-z.
- [343] J. Randolph Hecht, Yung-Jue Bang, Shukui K. Qin, Hyun C. Chung, Jianming M. Xu, Joon O. Park, Krzysztof Jeziorski, Yaroslav Shparyk, Paulo M. Hoff, Alberto Sobrero, Pamela Salman, Jin Li, Svetlana A. Protsenko, Zev A. Wainberg, Marc Buyse, Karen Afenjar, Vincent Houé, Agathe Garcia, Tomomi Kaneko, Yingjie Huang, Saba Khan-Wasti, Sergio Santillana, Michael F. Press, and Dennis Slamon. Lapatinib in combination with capecitabine plus oxaliplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive advanced or metastatic gastric, esophageal, or gastroesophageal adenocarcinoma: Trio-013/logic—a randomized phase iii trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(5):443–451, 2016. doi: 10.1200/JCO.2015.62.6598.
- [344] Xingbin Hu, Zhenfeng Ma, Beibei Xu, Shulong Li, Zhiqi Yao, Bishan Liang, Jiao Wang, Wangjun Liao, Li Lin, Chunling Wang, Siting Zheng, Qijing Wu, Qiong Huang, Le Yu, Fenghua Wang, and Min Shi. Glutamine metabolic microenvironment drives m2 macrophage polarization to mediate trastuzumab resistance in her2-positive gastric cancer. *Cancer communications (London, England)*, 43(8):909–937, 2023. ISSN 2523-3548. doi: 10.1002/cac2.12459.
- [345] Patricia Fernández-Nogueira, Mario Mancino, Gemma Fuster, Anna López-Plana, Patricia Jauregui, Vanesa Almendro, Estel Enreig, Silvia Menéndez, Federico Rojo, Aleix Noguera-Castells, Anke Bill, L. Alex Gaither, Laia Serrano, Leire Recalde-Percaz, Núria Moragas, Raul Alonso, Elisabet Ametller, Ana Rovira, Ana Lluch, Joan Albanell, Pere Gascon, and Paloma Bragado. Tumor-associated fibroblasts promote her2-targeted therapy resistance through fgfr2 activation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(6):1432–1448, 2020. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0353.
- [346] María F. Mercogliano, Mara de Martino, Leandro Venturutti, Martín A. Rivas, Cecilia J. Proietti, Gloria Inurrigarro, Isabel Frahm, Daniel H. Allemand, Ernesto Gil Deza, Sandra Ares, Felipe G. Gercovich, Pablo Guzmán, Juan C. Roa, Patricia V. Elizalde, and Roxana Schillaci. Tnfa-induced mucin 4 expression elicits trastuzumab resistance in her2-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(3):636–648, 2017. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0970.
- [347] Yuji Sato, Masakazu Yashiro, and Nobuyuki Takakura. Heregulin induces resistance to lapatinib-mediated growth inhibition of her2-amplified cancer cells. *Cancer science*, 104(12):1618–1625, 2013. ISSN 1347-9032. doi: 10.1111/cas.12290.
- [348] Mohamed El-Tanani, Arwa Omar Al Khatib, Safwan Mahmoud Aladwan, Ahmed Abuelhana, Paul A. McCarron, and Murtaza M. Tambuwala. Importance of stat3 signalling in cancer, metastasis and therapeutic interventions. *Cellular signalling*, 92:110275, 2022. doi: 10.1016/j.cellsig.2022.110275.
- [349] Wei Chen, Xiaoshuo Dai, Yihuan Chen, Fang Tian, Yanyan Zhang, Qiushuang Zhang, and Jing Lu. Significance of stat3 in immune infiltration and drug response in cancer. *Biomolecules*, 10(6), 2020. ISSN 2218-273X. doi: 10.3390/biom10060834.
- [350] Xinghua Sui, Chunxia Chen, Xiuman Zhou, Xueyan Wen, Chao Shi, Guanyu Chen, Juan Liu, Zhuoying He, Yongjie Yao, Yin Li, and Yanfeng Gao. Integrative analysis of bulk and single-cell

- gene expression profiles to identify tumor-associated macrophage-derived ccl18 as a therapeutic target of esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 42(1):51, 2023. doi: 10.1186/s13046-023-02612-5.
- [351] Yujuan Zhou, Longzheng Xia, Qiang Liu, Heran Wang, Jingguan Lin, Linda Oyang, Xiaoyan Chen, Xia Luo, Shiming Tan, Yutong Tian, Min Su, Ying Wang, Pan Chen, Yang Wu, Hui Wang, and Qianjin Liao. Induction of pro-inflammatory response via activated macrophage-mediated nf-kb and stat3 pathways in gastric cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 47(4):1399–1410, 2018. doi: 10.1159/000490829.
- [352] Ling Chen, Yuntao Shi, Xiaojuan Zhu, Weiwei Guo, Mingjiong Zhang, Ying Che, Lijuan Tang, Xiaozhong Yang, Qiang You, and Zheng Liu. Il-10 secreted by cancer-associated macrophages regulates proliferation and invasion in gastric cancer cells via c-met/stat3 signaling. *Oncology reports*, 42(2):595–604, 2019. doi: 10.3892/or.2019.7206.
- [353] Toyohisa Iriki, Koji Ohnishi, Yukio Fujiwara, Hasita Horlad, Yoichi Saito, Cheng Pan, Koei Ikeda, Takeshi Mori, Makoto Suzuki, Hidenori Ichiyasu, Hirotugu Kohrogi, Motohiro Takeya, and Yoshihiro Komohara. The cell-cell interaction between tumor-associated macrophages and small cell lung cancer cells is involved in tumor progression via stat3 activation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 106:22–32, 2017. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.01.003.
- [354] Qian Zhong, Yuxin Fang, Qiuhua Lai, Shanci Wang, Chengcheng He, Aimin Li, Side Liu, and Qun Yan. Cpeb3 inhibits epithelial-mesenchymal transition by disrupting the crosstalk between colorectal cancer cells and tumor-associated macrophages via il-6r/stat3 signaling. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 39(1):132, 2020. doi: 10.1186/s13046-020-01637-4.
- [355] Ziyi Zhong, Kege Yang, Yunlong Li, Shurui Zhou, Hanming Yao, Yue Zhao, Yuzhou Huang, Jinmao Zou, Yaqing Li, Li Jiajia, Guoda Lian, Kaihong Huang, and Shaojie Chen. Tumor-associated macrophages drive glycolysis through the il-8/stat3/glut3 signaling pathway in pancreatic cancer progression. *Cancer letters*, 588:216784, 2024. doi: 10.1016/j.canlet.2024.216784.
- [356] Siyuan Chen, Manni Wang, Tianqi Lu, Yu Liu, Weiqi Hong, Xuemei He, Yuan Cheng, Jian Liu, Yuquan Wei, and Xiawei Wei. Jmjd6 in tumor-associated macrophage regulates macrophage polarization and cancer progression via stat3/il-10 axis. *Oncogene*, 42(37):2737–2750, 2023. doi: 10.1038/s41388-023-02781-9.
- [357] Zhengjun Zhou, Pengcheng Wang, Rongqi Sun, Jia Li, Zhiqiang Hu, Haoyang Xin, Chubin Luo, Jian Zhou, Jia Fan, and Shaolai Zhou. Tumor-associated neutrophils and macrophages interaction contributes to intrahepatic cholangiocarcinoma progression by activating stat3. *Journal for immunotherapy of cancer*, 9(3), 2021. doi: 10.1136/jitc-2020-001946.
- [358] Zeyang Shao, Heng Wang, Haiyan Ren, Yinxian Sun, and Xiuping Chen. The anticancer effect of napabucasin (bbi608), a natural naphthoquinone. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(15), 2023. doi: 10.3390/molecules28155678.
- [359] Yamei Hu, Zigang Dong, and Kangdong Liu. Unraveling the complexity of stat3 in cancer: molecular understanding and drug discovery. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 43(1):23, 2024. doi: 10.1186/s13046-024-02949-5.
- [360] Petra Aigner, Valentin Just, and Dagmar Stoiber. Stat3 isoforms: Alternative fates in cancer? *Cytokine*, 118:27–34, 2019. doi: 10.1016/j.cyto.2018.07.014.

- [361] Wei-Chien Huang, Chao-Ming Hung, Ching-Ting Wei, Tsung-Ming Chen, Pei-Hsuan Chien, Hsiao-Lin Pan, Yueh-Ming Lin, and Yun-Ju Chen. Interleukin-6 expression contributes to lapatinib resistance through maintenance of stemness property in her2-positive breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(38):62352–62363, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11471.
- [362] Min Ye, Wei Huang, Rui Liu, Yingli Kong, Yang Liu, Xiaole Chen, and Jianhua Xu. Synergistic activity of the hsp90 inhibitor ganetespib with lapatinib reverses acquired lapatinib resistance in her2-positive breast cancer cells. *Frontiers in pharmacology*, 12:651516, 2021. ISSN 1663-9812. doi: 10.3389/fphar.2021.651516.
- [363] Zhe Liu, Liang Ma, Yiming Sun, Wenying Yu, and Xue Wang. Targeting stat3 signaling overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, 12(6):561, 2021. ISSN 2041-4889. doi: 10.1038/s41419-021-03844-z. URL <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03844-z>.
- [364] Huan-Chih Chiu, Ding-Li Chou, Chin-Ting Huang, Wen-Hsing Lin, Tzu-Wen Lien, Kuei-Jung Yen, and John T-A Hsu. Suppression of stat3 activity sensitizes gefitinib-resistant non small cell lung cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 81(11):1263–1270, 2011. doi: 10.1016/j.bcp.2011.03.003.
- [365] Rui-Jie Ma, Qi-Ming Zheng, Nan Zhang, and Zhi-Gang Sun. Clinicopathological significance of stat3 and p-stat3 among 91 patients with adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Disease markers*, 2022:9311684, 2022. doi: 10.1155/2022/9311684.
- [366] Katie E. O' Sullivan, Adriana J. Michielsen, Esther O' Regan, Mary C. Cathcart, Gillian Moore, Eamon Breen, Ricardo Segurado, John V. Reynolds, Joanne Lysaght, and Jacintha O' Sullivan. pstat3 levels have divergent expression patterns and associations with survival in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 2018. doi: 10.3390/ijms19061720.
- [367] Shaozhong He, Guixiang Liao, Yungen Liu, Liling Huang, Mafei Kang, and Longhua Chen. Over-expression of stat3/pstat3 was associated with poor prognosis in gastric cancer: a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(11):20014–20023, 2015. ISSN 1940-5901.
- [368] Yuan-Ming Pan, Cheng-Gang Wang, Min Zhu, Rui Xing, Jian-Tao Cui, Wen-Mei Li, De-Dong Yu, Shu-Bin Wang, Wei Zhu, Ying-Jiang Ye, Yun Wu, Shan Wang, and You-Yong Lu. Stat3 signaling drives ezh2 transcriptional activation and mediates poor prognosis in gastric cancer. *Molecular cancer*, 15(1):79, 2016. doi: 10.1186/s12943-016-0561-z.
- [369] Tianyi Liu, Meng Zhang, Tatyana Farsh, Haolong Li, Audrey Kishishita, Abhilash Barpanda, Stanley G. Leung, Jun Zhu, Hyuncheol Jung, Junjie Tony Hua, Xiaolin Zhu, Alexander B. Kim, Young Ah Goo, Minsoo Son, Jaemyeon Kim, Aish Subramanian, Martin Sjöström, Katherine C. Fuh, Jocelyn S. Chapman, Julia Carnevale, Luke A. Gilbert, Aparna Lakkaraju, Peter M. Bruno, David Quigley, Arun P. Wiita, Felix Y. Feng, and Carl J. DeSelm. Exploitable mechanisms of antibody and car mediated macrophage cytotoxicity. *Nature communications*, 16(1):5616, 2025. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-025-60745-x.
- [370] Zhenjie Yin, Yan Zhang, Yu Li, Tingting Lv, Jie Liu, and Xinbo Wang. Prognostic significance of stat3 expression and its correlation with chemoresistance of non-small cell lung cancer cells. *Acta histochemica*, 114(2):151–158, 2012. doi: 10.1016/j.acthis.2011.04.002.

- [371] Y. H. Xu and S. Lu. A meta-analysis of stat3 and phospho-stat3 expression and survival of patients with non-small-cell lung cancer. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 40(3):311–317, 2014. doi: 10.1016/j.ejso.2013.11.012.
- [372] Shu Zhang, Shuling Huang, Chao Deng, Yu Cao, Jun Yang, Guangxia Chen, Bin Zhang, Chaoqin Duan, Jiong Shi, Bo Kong, Helmut Friess, Nanyi Zhao, Chen Huang, Xiaoli Huang, Lei Wang, and Xiaoping Zou. Co-ordinated overexpression of sirt1 and stat3 is associated with poor survival outcome in gastric cancer patients. *Oncotarget*, 8(12):18848–18860, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.14473.
- [373] Hussein Riyadh Abdul Kareem Al-Hetty, Sada Jasim Abdulameer, Sami Awad Alkubaisy, Sawsan Ali Zaid, Abduladheem Turki Jalil, and Ihsan Khudhair Jasim. Stat3 signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma: a candidate therapeutic target. *Pathology, research and practice*, 245:154425, 2023. doi: 10.1016/j.prp.2023.154425.
- [374] Naoki Urakawa, Soken Utsunomiya, Mari Nishio, Manabu Shigeoka, Nobuhisa Takase, Noriaki Arai, Yoshihiro Kakeji, Yu-ichiro Koma, and Hiroshi Yokozaki. Gdf15 derived from both tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression via akt and erk pathways. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 95(5):491–503, 2015. doi: 10.1038/labinvest.2015.36.
- [375] Takayuki Kodama, Yu-ichiro Koma, Noriaki Arai, Aya Kido, Naoki Urakawa, Mari Nishio, Manabu Shigeoka, and Hiroshi Yokozaki. Ccl3-ccr5 axis contributes to progression of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and invasion via akt and erk pathways. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 100(9):1140–1157, 2020. doi: 10.1038/s41374-020-0441-4.
- [376] Kwang-Kyu Kim, Jung Joon Lee, Young Yang, Kwan-Hee You, and Jeong-Hyung Lee. Macrophage inhibitory cytokine-1 activates akt and erk-1/2 via the transactivation of erbb2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(4):704–712, 2008. doi: 10.1093/carcin/bgn031.
- [377] Manish A. Shah, Kohei Shitara, Florian Lordick, Yung-Jue Bang, Niall C. Tebbutt, Jean-Philippe Metges, Kei Muro, Lin Shen, Sergei Tjulandin, John L. Hays, Rui-hua Xu, Marilyn Fontaine, Emily Brooks, Bo Xu, Wei Li, Chiang Li, Laura Borodyansky, and Eric van Cutsem. The brighter trial: A phase 3 randomized double-blind study of napabucasin (napa) plus paclitaxel (ptx) versus placebo (pbo) plus ptx in patients (pts) with pretreated advanced gastric and gastroesophageal junction (gej) adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(15_suppl):4010, 2018. ISSN 0732-183X. doi: 10.1200/JCO.2018.36.15\textunderscore}suppl.4010.
- [378] Manish A. Shah, Takayuki Yoshino, Niall C. Tebbutt, Axel Grothey, Josep Tabernero, Rui-hua Xu, Andres Cervantes, Sang Cheul Oh, Kensei Yamaguchi, Marwan Fakih, Alfredo Falcone, Christina Wu, Vi K. Chiu, Jiri Tomasek, Johanna Bendell, Marilyn Fontaine, Matthew Hitron, Bo Xu, Julien Taieb, and Eric van Cutsem. Napabucasin plus folfiri in patients with previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the open-label, randomized phase iii canstem303c study. *Clinical colorectal cancer*, 22(1):100–110, 2023. doi: 10.1016/j.clcc.2022.11.002.
- [379] Akihito Kawazoe, Yasutoshi Kuboki, Hideaki Bando, Shota Fukuoka, Takashi Kojima, Yoichi Naito, Shuichi Iino, Yasuhide Yodo, Toshihiko Doi, Kohei Shitara, and Takayuki Yoshino. Phase 1 study of napabucasin, a cancer stemness inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 85(5):855–862, 2020. doi: 10.1007/s00280-020-04059-3.

- [380] Akihito Kawazoe, Yasutoshi Kuboki, Eiji Shinozaki, Hiroki Hara, Tomohiro Nishina, Yoshito Komatsu, Satoshi Yuki, Masashi Wakabayashi, Shogo Nomura, Akihiro Sato, Takeshi Kuwata, Masahito Kawazu, Hiroyuki Mano, Yosuke Togashi, Hiroyoshi Nishikawa, and Takayuki Yoshino. Multicenter phase i/ii trial of napabucasin and pembrolizumab in patients with metastatic colorectal cancer (epoc1503/scoop trial). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(22):5887–5894, 2020. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1803.
- [381] Maosen Xu, Tao Zhang, Ruolan Xia, Yuquan Wei, and Xiawei Wei. Targeting the tumor stroma for cancer therapy. *Molecular cancer*, 21(1):208, 2022. doi: 10.1186/s12943-022-01670-1.
- [382] Rosandra N. Kaplan, Rebecca D. Riba, Stergios Zacharoulis, Anna H. Bramley, Loïc Vincent, Carla Costa, Daniel D. MacDonald, David K. Jin, Koji Shido, Scott A. Kerns, Zhenping Zhu, Daniel Hicklin, Yan Wu, Jeffrey L. Port, Nasser Altorki, Elisa R. Port, Davide Ruggero, Sergey V. Shmelkov, Kristian K. Jensen, Shahin Rafii, and David Lyden. Vegfr1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069):820–827, 2005. doi: 10.1038/nature04186.
- [383] Jonathan P. Sleeman. The metastatic niche and stromal progression. *Cancer metastasis reviews*, 31(3-4):429–440, 2012. ISSN 0167-7659. doi: 10.1007/s10555-012-9373-9.
- [384] Sung-Cherl Jung, Dawon Kang, and Eun-A Ko. Roles of pdgf/pdgfr signaling in various organs. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 29(2):139–155, 2025. ISSN 1226-4512. doi: 10.4196/kjpp.24.309.
- [385] Laura D. Bennett, James M. Fox, and Nathalie Signoret. Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology*, 134(3):246–256, 2011. ISSN 0019-2805. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03485.x.
- [386] Viviana Marin-Esteban, Jenny Youn, Blandine Beaupain, Agnieszka Jaracz-Ros, Vincent Barlogis, Odile Fenneteau, Thierry Leblanc, Florence Bellanger, Philippe Pellet, Julien Buratti, Hélène Lapijonne, Françoise Bachelier, Jean Donadieu, and Christine Bellanné-Chantelot. Biallelic cxcr2 loss-of-function mutations define a distinct congenital neutropenia entity. *Haematologica*, 107(3):765–769, 2022. ISSN 0390-6078. doi: 10.3324/haematol.2021.279254.
- [387] Jon Våbenø, Marta Oliva-Santiago, Astrid S. Jørgensen, Stefanie Karlshøj, and Mette M. Rosenkilde. Identification of a salt bridge that is functionally important for chemokine receptor cxcr1 but not cxcr2. *ACS pharmacology & translational science*, 6(8):1120–1128, 2023. doi: 10.1021/acspsci.3c00070.
- [388] Eliza Julia Pedraza-Brindis, Karina Sánchez-Reyes, Georgina Hernández-Flores, Alejandro Bravo-Cuellar, Luis Felipe Jave-Suárez, Adriana Aguilar-Lemarroy, Paulina Gómez-Lomelí, Brenda Anahí López-López, and Pablo Cesar Ortiz-Lazareno. Culture supernatants of cervical cancer cells induce an m2 phenotypic profile in thp-1 macrophages. *Cellular immunology*, 310:42–52, 2016. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.001.
- [389] Anna Garcia-Sabaté, Walaa Kamal E. Mohamed, Jiranuwat Sapudom, Aseel Alatoom, Layla Al Safadi, and Jeremy C. M. Teo. Biomimetic 3d models for investigating the role of monocytes and macrophages in atherosclerosis. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 7(3), 2020. ISSN 2306-5354. doi: 10.3390/bioengineering7030113.

- [390] Claudia B. Colon-Echevarria, Tatiana Ortiz, Lizette Maldonado, Melanie J. Hidalgo-Vargas, Jai-leene Pérez-Morales, Alexandra N. Aquino-Acevedo, Roberto Herrera-Noriega, Margarita Bonilla-Claudio, Eida M. Castro, and Guillermo N. Armaiz-Pena. Zoledronic acid abrogates restraint stress-induced macrophage infiltration, pdgf-aa expression, and ovarian cancer growth. *Cancers*, 12(9), 2020. ISSN 2072-6694. doi: 10.3390/cancers12092671.
- [391] Max L. Tejada, Lanlan Yu, Jianying Dong, Kenneth Jung, Gloria Meng, Franklin V. Peale, Gretchen D. Frantz, Linda Hall, XiaoHuan Liang, Hans-Peter Gerber, and Napoleone Ferrara. Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(9):2676–2688, 2006. ISSN 1078-0432. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1770.
- [392] Madhura Joglekar-Javadekar, Steven van Laere, Michael Bourne, Manal Moalwi, Pascal Finetti, Peter B. Vermeulen, Daniel Birnbaum, Luc Y. Dirix, Naoto Ueno, Monique Carter, Justin Rains, Abhijit Ramachandran, Francois Bertucci, and Kenneth L. van Golen. Characterization and targeting of platelet-derived growth factor receptor alpha (pdgfra) in inflammatory breast cancer (ibc). *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(7):564–573, 2017. ISSN 1476-5586. doi: 10.1016/j.neo.2017.03.002.
- [393] Nathalie Sakakini, Laurent Turchi, Aurélie Bergon, Hélène Holota, Samah Rekima, Fabrice Lopez, Philippe Paquis, Fabien Almairac, Denys Fontaine, Nathalie Baeza-Kallee, Ellen van Obberghen-Schilling, Marie-Pierre Junier, Hervé Chneiweiss, Dominique Figarella-Branger, Fanny Burel-Vandenbos, Jean Imbert, and Thierry Virolle. A positive feed-forward loop associating egr1 and pdgfa promotes proliferation and self-renewal in glioblastoma stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 291(20):10684–10699, 2016. doi: 10.1074/jbc.M116.720698.
- [394] Qu-Jing Gai, Zhen Fu, Jiang He, Min Mao, Xiao-Xue Yao, Yan Qin, Xi Lan, Lin Zhang, Jing-Ya Miao, Yan-Xia Wang, Jiang Zhu, Fei-Cheng Yang, Hui-Min Lu, Ze-Xuan Yan, Fang-Lin Chen, Yu Shi, Yi-Fang Ping, You-Hong Cui, Xia Zhang, Xindong Liu, Xiao-Hong Yao, Sheng-Qing Lv, Xiu-Wu Bian, and Yan Wang. EphA2 mediates pdgfa activity and functions together with pdgfra as prognostic marker and therapeutic target in glioblastoma. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1):33, 2022. doi: 10.1038/s41392-021-00855-2.
- [395] Carlo Cenciarelli, Hany E. Marei, Armando Felsani, Patrizia Casalbore, Gigliola Sica, Maria Ausiliatrice Puglisi, Angus J. M. Cameron, Alessandro Olivi, and Annunziato Mangiola. Pdgfra depletion attenuates glioblastoma stem cells features by modulation of stat3, rb1 and multiple oncogenic signals. *Oncotarget*, 7(33):53047–53063, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.10132.
- [396] Ran Xu, Jianxiong Ji, Xin Zhang, Mingzhi Han, Chao Zhang, Yangyang Xu, Yuzhen Wei, Shuai Wang, Bin Huang, Anjing Chen, Di Zhang, Qing Zhang, Wenjie Li, Zheng Jiang, Jian Wang, and Xingang Li. Pdgfa/pdgfra-regulated golm1 promotes human glioma progression through activation of akt. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 36(1):193, 2017. doi: 10.1186/s13046-017-0665-3.
- [397] T. Negri, F. Bozzi, E. Conca, S. Brich, A. Gronchi, R. Bertulli, E. Fumagalli, M. A. Pierotti, E. Tamborini, and S. Pilotti. Oncogenic and ligand-dependent activation of kit/pdgfra in surgical samples of imatinib-treated gastrointestinal stromal tumours (gists). *The Journal of pathology*, 217(1):103–112, 2009. doi: 10.1002/path.2450.

- [398] Margaret von Mehren and Heikki Joensuu. Gastrointestinal stromal tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 36(2):136–143, 2018. ISSN 0732-183X. doi: 10.1200/JCO.2017.74.9705.
- [399] I. Sulzbacher, M. Träxler, I. Mosberger, S. Lang, and A. Chott. Platelet-derived growth factor- $\alpha\alpha$ and α -receptor expression suggests an autocrine and/or paracrine loop in osteosarcoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 13(6):632–637, 2000. doi: 10.1038/modpathol.3880109.
- [400] Irene Sulzbacher, Peter Birner, Klemens Trieb, Margit Träxler, Susanna Lang, and Andreas Chott. Expression of platelet-derived growth factor- $\alpha\alpha$ is associated with tumor progression in osteosarcoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 16(1):66–71, 2003. doi: 10.1097/01.MP.0000043522.76788.0A.
- [401] P. P. Piccaluga, M. Rossi, C. Agostinelli, F. Ricci, A. Gazzola, S. Righi, F. Fuligni, M. A. Laginestra, M. Mancini, M. R. Sapienza, A. de Renzo, P. L. Tazzari, D. Gibellini, P. Went, F. Alviano, P. L. Zinzani, G. P. Bagnara, G. Inghirami, C. Tripodo, and S. A. Pileri. Platelet-derived growth factor α mediates the proliferation of peripheral t-cell lymphoma cells via an autocrine regulatory pathway. *Leukemia*, 28(8):1687–1697, 2014. doi: 10.1038/leu.2014.50.
- [402] Guanzhen Yu, Aidong Zhou, Jianfei Xue, Chen Huang, Xia Zhang, Shin-Hyuk Kang, Wen-Tai Chiu, Christina Tan, Keping Xie, Jiejun Wang, and Suyun Huang. Foxm1 promotes breast tumorigenesis by activating pdgf- α and forming a positive feedback loop with the pdgf/akt signaling pathway. *Oncotarget*, 6(13):11281–11294, 2015. doi: 10.18632/oncotarget.3596.
- [403] Suppression of platelet-derived growth factor receptor- α overcomes resistance to trastuzumab through stat3-dependent il-6 reduction in her2-positive breast cancer cells. *Biomedicines*, 11(3), 2023. ISSN 2227-9059. doi: 10.3390/biomedicines11030675.
- [404] Jia Wang, Ruwen Cui, Cecila G. Clement, Ranjana Nawgiri, Don W. Powell, Irina V. Pinchuk, and Tammara L. Watts. Activation pdgfr- α /akt mediated signaling pathways in oral squamous cell carcinoma by mesenchymal stem/stromal cells promotes anti-apoptosis and decreased sensitivity to cisplatin. *Frontiers in oncology*, 10:552, 2020. ISSN 2234-943X. doi: 10.3389/fonc.2020.00552.
- [405] Francesco Sabbatino, Yangyang Wang, Xinhui Wang, Keith T. Flaherty, Ling Yu, David Pepin, Giosue Scognamiglio, Stefano Pepe, John M. Kirkwood, Zachary A. Cooper, Dennie T. Frederick, Jennifer A. Wargo, Soldano Ferrone, and Cristina R. Ferrone. Pdgfra up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to braf inhibitor resistance in melanoma cells with braf mutation. *Oncotarget*, 5(7):1926–1941, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.1878.
- [406] Rui Wang, Yumei Li, Yueyue Hou, Qingling Yang, Sulian Chen, Xi Wang, Zishu Wang, Yan Yang, Changjie Chen, Zhiwei Wang, and Qiong Wu. The pdgf-d/mir-106a/twist1 pathway orchestrates epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine resistance hepatoma cells. *Oncotarget*, 6(9):7000–7010, 2015. doi: 10.18632/oncotarget.3193.
- [407] Pratibha Pandey, Fahad Khan, Tarun Kumar Upadhyay, Moon Seungjoon, Moon Nyeo Park, and Bonglee Kim. New insights about the pdgf/pdgfr signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 161:114491, 2023. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114491.
- [408] Yanjun Xu, Rui Hou, Qijie Lu, Yang Zhang, Lei Chen, Yuanyi Zheng, and Bing Hu. Mir-491-5p negatively regulates cell proliferation and motility by targeting pdgfra in prostate cancer. *American journal of cancer research*, 7(12):2545–2553, 2017. ISSN 2156-6976.

- [409] Peigen Zhang, Suting Li, Zhijun Chen, Yan Lu, and Huanyao Zhang. Lncrna snhg8 promotes proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting the mir-491/pdgfra axis. *Human cell*, 33(1):123–130, 2020. doi: 10.1007/s13577-019-00290-0.
- [410] Chunyan Li, Yulin Wang, Shuming Lu, Zhuqing Zhang, Hua Meng, Lina Liang, Yan Zhang, and Bo Song. Mir-34a inhibits colon cancer proliferation and metastasis by inhibiting platelet-derived growth factor receptor α . *Molecular medicine reports*, 12(5):7072–7078, 2015. doi: 10.3892/mmr.2015.4263.
- [411] Dongfeng Chen, Duo Zuo, Cheng Luan, Min Liu, Manli Na, Liang Ran, Yingyu Sun, Annette Persson, Elisabet Englund, Leif G. Salford, Erik Renström, Xiaolong Fan, and Enming Zhang. Glioma cell proliferation controlled by erk activity-dependent surface expression of pdgfra. *PLoS one*, 9(1):e87281, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0087281.
- [412] Ni Gong, Runliu Wu, Boni Ding, and Wei Wu. Erbb4 promotes the progression of inflammatory breast cancer through regulating pdgfra. *Translational cancer research*, 9(5):3266–3273, 2020. ISSN 2218-676X. doi: 10.21037/tcr-19-2132.
- [413] Mariusz Adam Goscinski, Stein Gunnar Larsen, Karl-Erik Giercksky, Jahn Marthin Nesland, and Zhenhe Suo. Pdgfr- α and cd117 expression pattern in esophageal carcinomas. *Anticancer research*, 35(7):3793–3799, 2015.
- [414] Ines Gockel, Markus Moehler, Kirsten Frerichs, Daniel Drescher, Tran Tong Trinh, Friedrich Duen-schede, Thomas Borschitz, Katrin Schimanski, Stefan Biesterfeld, Kerstin Herzer, Peter R. Galle, Hauke Lang, Theodor Junginger, and Carl C. Schimanski. Co-expression of receptor tyrosine kinases in esophageal adenocarcinoma and squamous cell cancer. *Oncology reports*, 20(4):845–850, 2008.
- [415] Zijian Wu, Jin Xu, Rong Tang, Wei Wang, Bo Zhang, Xianjun Yu, Jiang Liu, and Si Shi. The role of pdgfra in predicting oncological and immune characteristics in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of oncology*, 2022:4148805, 2022. ISSN 1687-8450. doi: 10.1155/2022/4148805.
- [416] Thomas Karsten Kilvaer, Mehrdad Rakaee, Turid Hellevik, Jørg Vik, Luigi de Petris, Tom Donnem, Carina Strell, Arne Ostman, Lill-Tove Rasmussen Busund, and Inigo Martinez-Zubiaurre. Differential prognostic impact of platelet-derived growth factor receptor expression in nscl. *Scientific reports*, 9(1):10163, 2019. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-019-46510-3.
- [417] Wenling Wang, Lifeng Qi, Minhan Tan, Zhenting Zhang, Ju Du, Xiaona Wei, and Xin Yao. Effect of platelet-derived growth factor- β on renal cell carcinoma growth and progression. *Urologic oncology*, 33(4):168.e17–27, 2015. doi: 10.1016/j.urolonc.2014.12.015.
- [418] Alexandra Abramsson, Per Lindblom, and Christer Betsholtz. Endothelial and nonendothelial sources of pdgf- β regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *The Journal of clinical investigation*, 112(8):1142–1151, 2003. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/JCI18549.
- [419] Tao Wei, Li-Na Zhang, Yi Lv, Xiao-Ya Ma, Lei Zhi, Chang Liu, Feng Ma, and Xu-Feng Zhang. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor α promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 5(21):10307–10317, 2014. doi: 10.18632/oncotarget.2537.

- [420] Inês Carvalho, Fernanda Milanezi, Albino Martins, Rui M. Reis, and Fernando Schmitt. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast cancer research : BCR*, 7(5):R788–95, 2005. doi: 10.1186/bcr1304.
- [421] Hong-Da Pan, Yi-Fan Peng, Gang Xiao, and Jin Gu. High levels of serum platelet-derived growth factor-aa and human epidermal growth factor receptor-2 are predictors of colorectal cancer liver metastasis. *World journal of gastroenterology*, 23(7):1233–1240, 2017. ISSN 1007-9327. doi: 10.3748/wjg.v23.i7.1233.
- [422] Li-Han Lin, Jiun-Sheng Lin, Cheng-Chieh Yang, Hui-Wen Cheng, Kuo-Wei Chang, and Chung-Ji Liu. Overexpression of platelet-derived growth factor and its receptor are correlated with oral tumorigenesis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2020. doi: 10.3390/ijms21072360.

Abbildungsverzeichnis

1	Barrett-Dysplasie-Karzinom-Sequenz: Durch den anhaltenden Reflux und das daraus resultierende chronisch proinflammatorische Mikromilieu kommt es durch die Aktivierung von morphogenen Signalwegen (CDX, Notch, SHH) zu einer intestinalen Metaplasie. Durch weitere Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen entwickelt sich aus der Metaplasie eine Low-Grade- und High-Grade-intraepitheliale Neoplasie bis hin zum invasiven gastroösophagealen Adenokarzinom (GEAC) (modifiziert nach [12])	4
2	Signaltransduktionskaskaden der EGFR/HER2-Rezeptoren: Schematische Darstellung der HER2-Rezeptor-Aktivierung mit den nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden RAS/MAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT3. Aufgrund des Fehlens eines eigenen Liganden fungiert HER2 als ligandenunabhängiger, bevorzugter Dimerisierungspartner der übrigen HER-Rezeptoren. Die Dimerisierung der Rezeptor resultiert in eine Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Diese führt letztendlich zur Aktivierung der Signalproteine RAS, PI3K, oder JAK. Die Aktivierung dieser Signalwege führt zur Transkription von Genen, die die Proliferation, die Angiogenese, die Migration und den Zellzyklus beeinflussen. Trastuzumab und Pertuzumab inhibieren vor allem durch Bindung an eine extrazelluläre Domäne die Dimerisierung der Rezeptoren. Lapatinib hemmt die intrazelluläre-Tyrosinkinase-Domäne. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [75])	10
3	Schematische Darstellung der unterschiedlichen molekularen Mechanismen sekundärer Therapiereistenzen: Chemotherapie: Sekundäre Chemotherapie-Resistenzen sind bis heute unzureichend verstanden. Durch die zugrunde liegende intratumorale Heterogenität kann die Chemotherapie selbst im Sinne eines Selektionsdrucks Zellen selektieren, welche nach diskontinuierlicher Therapie zu einer erneuten Progression führen. Hier spielen genetische Veränderungen, zelluläre Plastizität sowie ABC-Transporter eine entscheidende Rolle. Zielgerichtete Therapie: Durch eine genetische Adaption der Tumorzellen, z. B. durch eine erworbene Mutation innerhalb der therapeutischen Zielstruktur, entfalten die Tumorzellen eine sekundäre Therapieresistenz. Darüber hinaus können Phänotypen wie Stammzellen und EMT-Zellen eine Resistenz vermitteln. Ebenso kann die Aktivierung sogenannter Bypass-Signale die Wirkung zielgerichteter Therapien beeinflussen. Immuntherapie: Hier können tumorintrinsic Mechanismen, z. B. die Mutation des Beta-2-Mikroglobulins als Bestandteil des MHC-I-Rezeptors, die Effektivität der Immuntherapie beeinflussen. tumorextrinsic Mechanismen beschreiben die Veränderung des Mikroenvironment, z. B. durch weniger Effektor-T-Zellen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [157])	19
4	Schematische Darstellung der Monozyten Subtypen: Die Monozyten-Subtypen werden durch ihrer unterschiedliche Expression der Oberflächenrezeptoren CD16 und CD14 differenziert. Die Subtypen kommen in unterschiedlichen Mengen im Blut vor und haben verschiedene Funktionen. Der klassische Monozyt migriert vor allem in das Gewebe und differenziert sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [232])	24

5	Schematische Darstellung der Eigenschaften und Funktionen von M1- und M2-Makrophagen: M1-Makrophagen sind durch Expression der Oberflächenmarker iNOS, MHC-II, TLR-4 und CD86 charakterisiert. Sie zeichnen sich durch einen proinflammatorischen Phänotyp aus und sekretieren Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β . M2-Makrophagen bilden die Oberflächenmoleküle CD204, CD163, FIZZ1 und CD206. Sie wirken über die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF geweberegenerierend und protumorigen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [238])	25
6	Schematische Darstellung der M2-Makrophagen-Polarisierung: M2-Makrophagen können je nach Funktion und Zytokinprofil in weitere Subtypen differenziert werden. M2a-Makrophagen fördern Regeneration und Wachstum durch die Freisetzung von u. a. TGF- β , IL-10 und IGF. M2b-Makrophagen regulieren durch die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen die Immunantwort. M2c-Makrophagen fördern durch die Freisetzung von IL-10 die Immuntoleranz und Gewebestabilisierung. M2d-Makrophagen fördern das immunsuppressive Mikroenvironment von Tumoren und fördern Angiogenese und Proliferation. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [238]).	26
7	Schematische Darstellung der Funktionen von tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) in der Karzinogenese: TAMs zeichnen sich durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle wie CD206, CD163, CSF1R und PDL1/2 aus. Darüber hinaus können sie multiple Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren freisetzen. Sowohl durch direkten als indirekten Kontakt zu Tumorzellen können sie das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Therapieresistenz, die Migration und Invasion fördern. Zusätzlich können sie Immunzellen rekrutieren und durch die Aktivierung regulatorischer T-Zellen ein immunsuppressives Mileau schaffen. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [256])	28
8	Schematische Darstellung des experimentellen Vorgehens des vorliegenden Projektes: Zu Hypothesengenerierung und Untersuchung der Expression makrophagen-spezifischer Gene diente ein cDNA-Mikroarray von 64 GEAC-Patienten als 'Discovery Set'. Diese erhobenen Befunde wurden anschließend in einem Tissue Mikroarray (TMA) von 360 GEAC-Patienten verifiziert und zusätzlich der Einfluss der Makrophageninfiltration auf die klinisch-pathologischen Parameter untersucht. Anschließend wurden diese Befunde in einem <i>in-vitro</i> indirekten Kokultursystem mechanistisch weiter untersucht und daraufhin erneut im 'Discovery Set' und 'Validation Set' validiert.	33
9	Schematische Darstellung zur Tissue Microarray-Konstruktion: Mit Hilfe eines Gewebezyllinders werden repräsentative Tumorbereiche ausgestanzt und in einen Paraffin-Empfängerblock überführt. In diesen wurden zuvor mit der gleichen Stanze dazu kongruente Säulen gestanzt. Aus diesem TMA-Block können 4 μ m dicke Gewebeschnitte mit einem Mikrotom angefertigt und anschließend histochemisch gefärbt werden. Abbildung wurde mit Biorender erstellt (modifiziert nach [304])	48
10	Schema der Dichtegradientenzentrifugation: A) In einem 50 ml Reaktionsgefäß werden 15 ml Separationsmedium vorgelegt. Dieses wird sehr langsam mit verdünntem Blut überschichtet und anschließend zentrifugiert. B) Nach der Zentrifugation entstehen durch die unterschiedlichen Dichten Phasenringe. Ein Phasenring enthält die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, welche für die weiteren Experimente genutzt werden.	51

11	Versuchsaufbau der indirekten Kokultur: Die THP1-Monozyten werden für 24 Stunden mit 200 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) inkubiert. Dies dient einer Differenzierung dieser Zellen in Makrophagen. Zur weiteren Verifizierung erfolgte die Kokultur auch mit primären Monozyten, die aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes von gesunden Spendern isoliert wurden. Als Modell des GEAC dienen die Zelllinien PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Diese Zellen werden für 72 Std indirekt mit den Makrophagen kokultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich in Abwesenheit der Makrophagen kultiviert.	53
12	Reaktionsablauf MTT-Assay: Das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz wird von vitalen Zellen aufgenommen und vornehmlich in den Mitochondrien durch die Succinat-Dehydrogenase NADH abhängig reduziert. Das daraus entstehende blauviolette wasserunlösliche Formazan kann nach Zugabe durch Lösungsmittel (DMSO) photometrisch bestimmt werden.	54
13	Schematische Darstellung der Wirkweise von RNAScope: 1) Die RNAScope-Sonde (Z-Sonde) besteht aus einer DNA-Sequenz, welche am 5'-Ende eine Sequenz aufweist, die spezifisch für die Zielgenesequenz ist, während das 3'-Ende die Pre-Amplifier-Bindungsseite darstellt. Diese Sequenz dient als Andockstelle für die Pre-Amplifier-Oligonukleotide, die den ersten Schritt der Signalverstärkung einleiten. 2) Die Z-Sonden hybridisieren an der Ziel-RNA und sobald zwei Z-Sonden direkt nebeneinander an die Ziel-RNA binden (ZZ-Paar), schließen sich ihre Linker-Sequenzen zu einer Bindungsplattform für den Pre-Amplifier zusammen. Diese ist wiederum Bindungsstelle für die Amplifier und diese für die Detektionssonden, welche in diesem Fall an ein Enzym (Alkalische Phosphatase + Meerrettichperoxidase (HRP)) gekoppelt sind (modifiziert nach [305]).	60
14	Schematischer Aufbau eines Western-Blot-Sandwich: Nachdem die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür werden unter das SDS-Gel zwei Whatman-Papiere und ein in Laufpuffer getränkter Schwamm platziert. Über das Gel werden die Nitrozellulosemembran, zwei Whatman-Papiere und ebenfalls ein in Laufpuffer getränkter Schwamm platziert. Nachdem eine Spannung angelegt wurde, migrieren die negativ geladenen Proteine auf die Membran.	64
15	Die Analyse des Sekretoms erfolgt mithilfe einer Nitrozellulosemembran, auf der 105 Antikörper gegen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren immobilisiert sind. Auf dieser Membran werden die sekretierten Faktoren durch die immobilisierten Antikörper gebunden. Durch Zugabe biotinylierter Antikörper, die spezifisch für die jeweiligen Faktoren sind, kann mithilfe von HRP-gekoppelten Streptavidin-Molekülen ein Signal über eine chemilumineszente Substratreaktion detektiert werden.	66
16	Untersuchung der Genexpression des cDNA Microarrays GSE13898. Die normalisierten Expressionswerte der Gene <i>CD68</i> (A), <i>CD163</i> (B), <i>MSR1</i> (C), <i>NOS2A</i> (D), <i>HLDA-DR</i> (E), von 28 Patienten mit nicht-neoplastischen Kontrollgewebe (NT), 15 Patienten mit einer Barrett-Vorläuferläsion (BAR) und 64 Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) wurden aus dem Array extrahiert und als mediane Expressionswerte mit dem 25 % - 75 % interquartilen Abstand dargestellt. Der Kruskal-Wallis One-Way ANOVA Test wurde für die statistische Analyse verwendet. Mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparisons Test wurden die adjustierten P-Werte berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$	72

17	Vorgehensweise der Patientenselektion: A) Korrelationsanalyse der normalisierten CD68 und CD163 Expressionswerte. Auswahl von jeweils vier GEAC-Patienten mit starker bzw. schwacher CD68 und CD163 Expression. B) Quantil-Normalisierung nach Patientenselektion. Die Quantil-Normalisierung erfolgte mit einem Online-Tool von https://software.broadinstitute.org/morpheus . Dieses implementiert die klassische Quantil-Normalisierung (Quantile Normalization) nach dem etablierten Verfahren von: Bolstad et al., 2003	73
18	A) Venn-Diagramm der differenziell regulierten Gene in GEAC-Patienten mit starker und schwacher Expression der Makrophagen-spezifischen Gene <i>CD68</i> und <i>CD163</i> B) Volcano-Plot der differenziell regulierten Gene in GEAC-Patienten mit starker und schwacher Expression der Makrophagen-spezifischen Gene <i>CD68</i> und <i>CD163</i> . Dargestellt sind adjustierte und logarithmierte p-Werte ($-\log_{10}(\text{p-Werts})$) $\log_2$ -Änderungsfaktor (Fold Change). Adjustierte p-Werte $< 0,05$ und ein $\log_2$ -Änderungsfaktor von 1,6 wurden als signifikant angesehen. C) Heatmap der z-standardisierten Expressionswerte differentiell exprimierter Gene in GEAC-Proben. Die Proben ($M\Phi^+$: EAC_026, EAC_041, EAC_030, EAC_007, $M\Phi^-$: EAC_050, EAC_057, EAC_062, EAC_058) wurden anhand hierarchischer Clusteranalyse mit euklidischer Distanzmessung gruppiert. Die Farbskala repräsentiert die Z-Scores der Genexpression (blau = niedrige, rot = hohe Expression). Zusätzlich sind die mittels k-means-Clustering identifizierten Subgruppen $M\Phi^+$ und $M\Phi^-$ dargestellt. Die Erstellung der Heatmap erfolgte mit https://software.broadinstitute.org/morpheus . . .	74
19	Bubble-Plot der GSEA-Analyse von GEAC-Patienten mit hoher <i>CD68</i> - und <i>CD163</i> -Expression ($M\Phi^+$) im Vergleich zu Patienten mit niedriger <i>CD68</i> - und <i>CD163</i> -Expression ($M\Phi^-$). Die GSEA-Analyse wurde unter Verwendung der <i>Hallmark Gene Sets</i> sowie der <i>C2 curated Gene Sets</i> durchgeführt. Signifikant regulierte Gen-Sets wurden selektiert und übergeordneten biologischen Kategorien wie Krankheitsprogression, Metastasierung, Therapieresistenz und Zellteilung zugeordnet. Dargestellt ist der Enrichment Score, der die Stärke der Anreicherung unter Berücksichtigung der jeweiligen Gen-Set-Größe widerspiegelt. Die Punktgröße repräsentiert die Anzahl der im jeweiligen Gen-Set enthaltenen Gene, während die Farbkodierung die statistische Signifikanz der Anreicherung widerspiegelt. Als statistisch signifikant wurde ein adjustierter p-Wert von $< 0,005$ definiert	77
20	Immunhistologische Untersuchung des Tissue Microarray: Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung von A) CD68, C) CD163 und E) iNOS. Exemplarisch ist für jeden Makrophagenmarker eine als stark und eine schwach kategorisierte Färbung dargestellt. Einzelne Makrophagen sind rot umrandet dargestellt. Die Aufnahmen wurden in 10x und 40x Vergrößerung aufgenommen. Prozentuale Verteilung der Patienten mit starker und schwacher Färbung von B) CD68, D) CD163 und F) iNOS.	80
21	Absolute Zellzahl der A) CD68, B) CD163 und C) iNOS positiven Makrophagenpopulation in GEAC-Patienten mit verschiedenen klinisch-pathologischen Stadien. Verglichen wurde jeweils der Progress der Tumordinfiltration (pT1-pT2 vs. pT3-pT4), das Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung (pN0 vs. pN1-pN3), der Grad der Differenzierung (G1-G2 vs. G3-G4) und das Vorliegen einer Fernmetastasierung (M0 vs. M1). Ergebnisse wurden als mediane Makrophagenanzahl und interquartiler Abstand dargestellt. Für die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$	83

- 22 Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von **A)** CD68 (stark und schwach), **C)** CD163 (stark und schwach) sowie **E)** iNOS (stark und schwach). Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Darstellung der 1-5- und 10-Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz von **B)** CD68 (stark und schwach), **D)** CD163 (stark und schwach) sowie **F)** iNOS (stark und schwach) . . . 85
- 23 **A)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert. Die schwarzen Pfeile markieren spindelförmig konfigurierte Tumorzellen. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Analyse der vitalen GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und anschließend wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 89
- 24 **A)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert. Die pinken Zellen stellen die proliferativ-aktiven Zellen dar. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Analyse des Proliferationsindex der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und anschließend wurde der Ki67-Proliferationsindex mittels IFF-Färbung bestimmt. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 91
- 25 **A)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert. Die Gele wurden mit 10 µg Proteinlysate beladen. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet **B)** Densitometrische Analyse der Cyclin D1 und Cyclin E1 Menge in den mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590 und LN1590 Zellen. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensität wurde anschließend auf die Ladekontrolle Actin normalisiert. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 92
- 26 **A)** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von CD68, CD163, iNOS und Ki67 in zwei repräsentativen Patienten. **B)** Korrelationsanalyse der CD68-, CD163- und iNOS-positiven Tumorzellen mit dem prozentualen Anteil Ki67-positiver Tumorzellen. Korrelationskoeffizient und statistische Signifikanz wurden bei nicht normalverteilten Daten mittels Spearman-Korrelation (Rangkorrelation) bestimmt. **C)** Quantifizierung des prozentualen Anteils Ki67-positiver Zellen in Patienten mit schwacher bzw. starker CD68-, CD163- und iNOS-Infiltration. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Bestimmung der statistischen Signifikanz und des p-Werts durch den Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.) 94

- 27 **A)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4, PT6216. Die grüne Färbung detektiert den HER2-Rezeptor. Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Repräsentative Western-Blot-Bilder GEAC-Zellen PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4, PT6216. Detektiert wurde das Protein HER2. Das Gel wurde mit 15 µg Proteinlysate beladen. Actin diente als Ladekontrolle. 96
- 28 **A,C)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und zusätzlich mit Lapatinib behandelt (2 µM PT1590 und 1 µM NCI-N87). Eine DMSO Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B,D)** Analyse der vitalen GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, ** : p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001. 97
- 29 **A,C)** Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und zusätzlich mit Lapatinib behandelt (2 µM PT1590 und 1 µM NCI-N87). Eine DMSO Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die pinken Zellen stellen die proliferativ aktiven Zellen dar. **B,D)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, ** : p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001. 99
- 30 **A)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der GEAC-Zellen PT1590 und NCI-N87. Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 µg Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine p-STAT3, STAT3, p-AKT, AKT, p-ERK und ERK detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet **B)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine STAT3, AKT und ERK in den mono- bzw. THP1-kokultivierten und Lapatinib-behandelten PT1590- und NCI-N87-Zellen. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteine wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Diese normalisierten Intensitäten wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche analysiert. *: p < 0,05, ** : p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 100

- 31 CD14-Durchflusszytometrie vor und nach negativer magnetischer Zellseparation. Das kleine Gate umfasst Erythrozyten, Lymphozyten, Debris und tote Zellen. Das große Gate umfasst Monozyten und Granulozyten **A,B)** Dot-Plot SSC-A und FSC-A sowie CD-14-PE vor magnetischer Zellseparation. **C,D)** Dot-Plot SSC-A und FSC-A sowie CD-14-PE nach magnetischer Zellseparation. **E)** Quantifizierung des prozentualen Anteils CD14-positiver Monozyten vor und nach Separation. Es wurden mindestens drei biologische Replikate (Probanden) durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$. **F)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der ausplattierten MDM nach Aussaat und vor Start der Kokultur sowie am Ende der Mono- bzw.- PT1590-Kokultur. 102
- 32 Quantifikation der Vitalität der PT1590 **A)**, NCI-N87 **B)** und LN1590 **C)** Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. MDM-Kokultur und gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib. Die Vitalität der Zellen wurde anschließend mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten GEAC-Zellen. Repräsentative Phasenkontrastbilder **D)** und Immunfluoreszenzbilder **F)** der GEAC-Zellen PT1590. Die pinken Zellen stellten die Ki67-positiven Zellen dar. **E)** Quantifikation der Ki67-positiven PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. MDM-Kokultur. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten PT1590-Zellen. **F)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der PT1590-Zellen Die Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1-kokultiviert und gleichzeitig mit Lapatinib behandelt. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 µg Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine p-STAT3, STAT3, p-AKT, AKT, p-ERK und ERK detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * $< 0,05$, ** $< 0,002$. *: $p < 0,05$, ** : $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 104
- 33 **A)** Relative Genexpressionsanalyse des Gens *STAT3* nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur und gleichzeitigem siRNA-vermittelten Knockdown von *STAT3* (siSTAT3). Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Genexpressionswerte wurden mittels qPCR bestimmt und die *STAT3*-mRNA-Menge wurde auf GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche. **B)** Repräsentative Western-Blotbilder der *STAT3*-Proteinmenge der siSTAT3- bzw. scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur. Es wurden 15 µg Proteinlysate verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. * $< 0,05$, ** $< 0,002$. *: $p < 0,05$, ** : $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 105

- 34 **A)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der siTSAT3-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diene als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 μ M Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diene als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation des Anteils der vitalen scrRNA- bzw. siSTAT3-transfizierten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten, DMSO-behandelten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen. **C)** Quantifikation des Anteils der vitalen Nababucasin (0,5 μ M) und Lapatinib (2 μ M) behandelten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 107
- 35 **A)** Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der siTSAT3-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diene als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 μ M Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diene als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten DMSO-behandelten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. **C)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der mono- bzw. THP1-kokultivierten siRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen. DMSO diene als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μ g Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine Cyclin D1 und Cyclin E1 detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 108
- 36 **A)** Repräsentative Bilder der Sekretom-Analyse mittels membranbasierter Antikörper-Arrays der Kokultur-Überstände der Lapatinib- bzw. DMSO-behandelten PT1590-Zellen und THP1-Zellen. Eine Monokultur der THP1-Makrophagen und PT1590-Zellen diene als Kontrolle. **B)** Die Spotintensitäten der 105 verschiedenen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wurden densitometrisch ausgewertet und als log2-adjustierte Daten in einer Heatmap dargestellt. Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte nach euklidischer Distanzmessung. **C)** Absolute Signalintensitäten der differenziell sezernierten Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (CCL2, CCL3, CCL20, CCL19, GDF-15, IL-8, Osteopontin, PDGF-AA und RANTES). 110

- 37 Quantifikation des Anteils der vitalen PT1590-Zellen nach Stimulation mit **A)** CCL3, **B)** CCL20, **C)** IL-8, **D)** Osteopontin, **E)** RANTES. Die PT1590-Zellen wurden für 72 Std mit 10 ng/ml oder 50 ng/ml Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Parallel wurden die Zellen für 48 Std mit 2 μ M Lapatinib behandelt. PBS und DMSO dienten dabei als Kontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der PBS-stimulierten und DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 112
- 38 **A)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der PT1590-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml PDGF-AA und 2 μ M Lapatinib-Behandlung. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation des Anteils der vitalen PT1590-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml oder 50 ng/ml PDGF-AA. Die PT1590-Zellen wurden für 72 Std stimuliert und parallel für 48 Std mit 2 μ M Lapatinib behandelt. PBS und DMSO dienten dabei als Kontrolle. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der PBS-stimulierten und DMSO-behandelten PT1590-Zellen. **C,D)** Dosis-Wirkungs-Kurve der PT1590-Zellen, die mit einer Verdünnungsreihe (0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5) μ M Lapatinib behandelt und gleichzeitig mit 10 ng/ml PDGF-AA stimuliert. Für die Bestimmung der IC₅₀ (50 %-inhibitorische Konzentration) wurde eine logistische Dosis-Wirkungs-Analyse mit variabler Steigung verwendet. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 114
- 39 **A)** Quantifikation der PDGF-AA-Konzentration der PT1590- und TPH1-Monokultur- bzw. Kokultur-Überstände. Die Konzentration wurde mittels ELISA-Verfahren bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche von mindestens drei biologischen Replikaten. **B)** Relative Genexpressionsanalyse des Gens *PDGFA* nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur und gleichzeitiger Behandlung mit Lapatinib (2 μ M). Die Genexpressionswerte wurden mittels qPCR bestimmt und die *PDGFA*-mRNA-Menge wurde auf GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 115
- 40 Gene-Set-Enrichment-Analyse (GSEA) der Gensets 'Signaling by PDGF' und **B)** 'PDGFRA-Pathway' in Abhängigkeit vom Phänotyp (M Φ + vs. M Φ -) Der normalisierte Enrichment Score (NES) quantifiziert die Stärke der Anreicherung unter Berücksichtigung der Gen-Set-Größe. Der nominale p-Wert gibt die statistische Signifikanz der beobachteten Anreicherung an, während die False Discovery Rate (FDR) die multiple Testung kontrolliert. 116

- 41 **A)** Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der PDGF-AA-stimulierten und Lapatinib (2 μ M) behandelten. Eine PBS-Stimulation und DMSO-Behandlung dienten als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der mittlere prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. $< 0,05$, * $< 0,002$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 117
- 42 textbfA) Repräsentative Western-Blot-Bilder der PT1590-Zellen nach zeitabhängiger Stimulation mit 20 ng/ml PDGF-AA (0 min - 15 min - 30 min - 60 min - 8 Std - 24 Std). PBS diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μ g Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine p-STAT3, STAT3, p-AKT, AKT, p-ERK und ERK detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **B)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteine wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Diese normalisierten Intensitäten wurden anschließend ins Verhältnis gesetzt. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 118
- 43 **A)** Repräsentative Abbildung der Western Blot Analyse der PT1590, LN1590, NCI-N87, OE33, SKGT4 und PT6216 Zelllinien. Detektiert wurde der HER2 und PDGFR α . Es wurden 15 μ g Proteinextrakt der unterschiedlichen Zelllinien auf dem Gel beladen. Actin wurde als Ladekontrolle verwendet. **B)** Repräsentative Abbildung der immunfluoreszenz-Detektion von PDGFR α und HER2 der Zelllinien PT1590 und HER2. **C)** Kreisdiagramm der prozentualen Verteilung der HER2 positiven GEAC-Patienten, die eine Aktivität des PDGFR α vorweisen. Diese wurde in negativ, schwach und stark unterschieden. 120
- 44 **A)** Relative Genexpressionsanalyse des Gens *PDGFRA* nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur und gleichzeitigem siRNA-vermitteltem Knockdown von *PDGFRA* (siPDGFRA). Eine scrambled RNA diente als Kontrolle (scrRNA). Die Genexpressionswerte wurden mittels qPCR bestimmt und die *PDGFRA*-mRNA-Menge wurde auf GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließender Šidák-Korrektur für multiple Vergleiche. **B)** Repräsentative Western-Blotbilder der PDGFR α -Proteinmenge der siPDGFRA- bzw. scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP1-Kokultur. Es wurden 15 μ g Proteinlysate verwendet. GAPDH diente als Ladekontrolle. * $< 0,05$, ** $< 0,002$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 121

- 45 **A)** Repräsentative Phasenkontrastbilder der siPDGFRA-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diene als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 μ M Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diene als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. **B)** Quantifikation des Anteils der vitalen scrRNA- bzw. siPDGFRA-transfizierten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten, DMSO-behandelten und scrRNA-transfizierten PT1590-Zellen. **C)** Quantifikation des Anteils der vitalen Crenolanib (0,5 μ M) und Lapatinib (2 μ M) behandelten mono- bzw. THP1-kokultivierten PT1590-Zellen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT-Analyse bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bezogen auf das Mittel der monokultivierten DMSO-behandelten PT1590-Zellen. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Test für multiple Vergleiche. * < 0,05, ** < 0,002. *: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 122
- 46 **A)** Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der siPDGFRA-transfizierten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine scrambled RNA diene als Kontrolle (scrRNA). Die Zellen wurden gleichzeitig mit 2 μ M Lapatinib behandelt. Eine DMSO-Behandlung diene als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen. **C)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der mono- bzw. THP1-kokultivierten siRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen. DMSO diene als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μ g Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine PDGFR α Cyclin D1 und Cyclin E1 detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **D)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche. *: p < 0,05, ** : p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001 125

- 47 **A)** Repräsentative Ki67-Immunfluoreszenzbilder der Crenolanib (0,5 μ M) und Lapatinib (2 μ M) behandelten PT1590-Zellen nach drei Tagen Mono- bzw. THP-1-Kokultur. Eine DMSO-Behandlung diente als Negativkontrolle. Die Bilder wurden in einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen **B)** Quantifikation der proliferierenden Ki67-positiven Zellen. Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden pro Versuchsansatz vier repräsentative Bilder aufgenommen und die Ki67-positiven Zellen mittels ImageJ-Bildanalyse quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67-positiven GEAC-Zellen. **C)** Repräsentative Western-Blot-Bilder der mono- bzw. THP1-kokultierten siRNA-transfizierten und Lapatinib-behandelten PT1590-Zellen. DMSO diente als Negativkontrolle. Die Gele wurden mit 15 μ g Proteinlysate beladen. Es wurden die Proteine Cyclin D1 und Cyclin E1 detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. **D)** Densitometrische Analyse der phosphorylierten Proteine. Bandenintensität wurde mit ImageJ-Software bestimmt. Die Intensitäten wurden auf die Ladekontrolle GAPDH normalisiert. Es wurden mindestens drei biologische Replikate durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 126
- 48 Darstellung des prozentualen Anteils an vitalen PT1590-Zellen. Die PT1590 Zellen wurden für drei Tage mono- bzw. THP-1 kokultiert und mit 2 μ Lapatinib und bzw. oder mit 10 ng/ml eines neutralisierenden anti-PDGF-AA Antikörpers behandelt. DMSO oder PBS wurden als Kontrolle verwendet. Die Bestimmung der vitalen Zellen wurde mit Hilfe einer MTT-Analyse durchgeführt. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt. Die zweifaktorielle ANOVA wurde für die statistische Analyse verwendet und der multiple Vergleichstest nach Šídák wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanzen herangezogen. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$ 128
- 49 Repräsentative Abbildungen der Western Blot Analysen von mono- bzw. THP-1-kokultierten **A)** siPDGFR α transfizierten und **B)** Crenolanib behandelten PT1590-Zellen. Gele wurden mit 15 μ g Proteinextrakt beladen und Actin und GAPDH wurden als Ladekontrolle verwendet. Densitometrische Auswertung von der Phosphorylierungsaktivität von STAT3, AKT und ERK in **C)** siPDGFR α transfizierten und **D)** Crenolanib behandelten PT1590 Zellen. Die zweifaktorielle ANOVA wurde für die statistische Analyse verwendet und der multiple Vergleichstest nach Šídák's wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanzen herangezogen. (* $< 0,0332$, ** $< 0,0021$, *** $< 0,0002$, **** $< 0,0001$) 129
- 50 **A)** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von CD68, CD163, STAT3 und p-STAT3 in zwei repräsentativen Patienten. **B)** Korrelationsanalyse der CD68-, CD163-positiven Makrophagen mit der Anzahl p-STAT3-positiver Tumorzellen sowie dem prozentualen Anteil STAT3 positiver Zellkerne (% STAT3-Translokation). Korrelationskoeffizient und statistische Signifikanz wurden bei nicht normalverteilten Daten mittels Spearman-Korrelation (Rangkorrelation) bestimmt. C) Quantifizierung der p-STAT3-positiven Tumorzellen sowie des prozentualen Anteils STAT3 positiver Zellkerne in Patienten mit schwacher bzw. starker CD68-, CD163-Infiltration. Bei nicht normalverteilten Daten. erfolgte die Bestimmung der statistischen Signifikanz und des p-Werts durch den Mann-Whitney-U-Test. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$.) . . . 133
- 51 Immunhistologische Untersuchung des Tissue Microarray: Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung von **A)** p-STAT3, **C)** nukleares STAT3. Exemplarisch ist für jeden Marker eine als stark und eine schwach kategorisierte Färbung dargestellt. Die Aufnahmen wurden in 100x und 400x Vergrößerung aufgenommen. Prozentuale Verteilung der Patienten mit starker und schwacher Färbung von **B)** p-STAT3 **D)** nukleares STAT3 134

52	Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von A) p-STAT3 und C) nukl. STAT3. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Darstellung der 1-5- und 10 Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz von B) p-STAT und D) nukl. STAT3	136
53	Untersuchung der Genexpression des cDNA Microarrays GSE13898. Die normalisierten Expressionswerte der Gene <i>PDGFA</i> (A) , <i>PDGFRA</i> (B) von 28 Patienten mit nicht-neoplastischen Kontrollgewebe (NT), 15 Patienten mit einer Barrett-Vorläuferläsion (BAR) und 64 Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) wurden aus dem Array extrahiert und als mediane Expressionswerte mit dem 25 % - 75 % interquartilen Abstand dargestellt. Der Kruskal-Wallis One-Way ANOVA Test wurde für die statistische Analyse verwendet. Mit Hilfe des Dunn's Multiple Comparisons Test wurden die adjustierten P-Werte berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$	138
54	Korrelationsanalyse der normalisierten Expressionswerte der Gene A) <i>CD68</i> und B) <i>CD163</i> mit <i>PDGFA</i> . Für die Analyse wurden die Daten von 64 EAC Patienten des cDNA Microarrays GSE13898 verwendet. Die Analyse erfolgte mittels Spearman-Korrelationsanalyse. Ein Korrelationskoeffizient $r > 0$ wurde dabei als positive Assoziation gewertet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$	139
55	Repräsentative RNAscope-Färbungen von 10 GEAC-Tumorgeweben: Die Analyse zeigt die Expression von PDGFA (blau) in CD68-positiven Makrophagen (pink). Zellkerne wurden mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Die Kolokalisation von PDGFA mit CD68 wurde mit einem weißen Pfeil markiert. Links eine korrespondierende Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung. Die Aufnahmen wurde in einer 20x und 40x Vergrößerung aufgenommen	140
56	A) Repräsentative Bilder einer immunhistochemischen Färbung von CD163 und PDGFR α von zwei GEAC-Patienten. Nach Überlagerung der Bilder sind die CD163-positiven Makrophagen in grün dargestellt. Die Aufnahme erfolgte in 20x und 40x Vergrößerung und die Zellkerne wurde mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Quantitative Auswertung der Anzahl CD68-positiver A) und CD163-positiver B) Makrophagen in GEAC-Tumoren. Für CD68 konnten 64 und für CD163 109 Gewbespots untersucht werden. Ergebnisse wurden als mediane Makrophagenanzahl und interquartiler Abstand dargestellt. Für die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,002$, ***: $p < 0,0002$, ****: $p < 0,0001$	142
57	Immunhistologische Untersuchung des Tissue Microarray: Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung von A) tum. p-PDGFR α C) membr. p-PDGFR α und E) strom p-PDGFR α . Exemplarisch ist für jede p-PDGFR α Färbung eine als stark, eine als schwach und eine negativ kategorisierte Färbung dargestellt. Die Aufnahmen wurden in 10x und 40x Vergrößerung aufgenommen. Prozentuale Verteilung der Patienten mit starker und schwacher Färbung von B) tum. p-PDGFR α , D) membr. p-PDGFR α und F) strom. p-PDGFR α	144

58	A) Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von p-PDGFR α . Katogorien die miteinander verglichen wurden sind: p-PDGFR α negativ, p-PDGFR α schwach, p-PDGFR α stark. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. B) Darstellung der 1-5-und 10 Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz (graue Linie) von p-PDGFR α	146
59	Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Gesamtüberleben von A) tum. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach), C) membr. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach) sowie E) stroma. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach). Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit als Gesamtüberleben. Die Beobachtungszeit betrug 143 Monate. Der Unterschied der Kurven wurde mit dem Log-Rank-Test bestimmt. Hierfür wurde ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Darstellung der 1-5-und 10 Jahresüberlebensrate (JÜLR) mit prozentualer Differenz von B) tum. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach), D) membr. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach) sowie F) stroma. p-PDGFR α -Färbung (stark und schwach)	147
60	Schematische Darstellung des Patientenkollektivs sowie der Kontrollgruppe. Es wurden Serum-Proben von 56 GEAC-Patienten in die Analyse eingeschlossen. Die absolute Konzentration des PDGD-AA wurde mittels ELISA-Verfahren bestimmt. Das PDGF-AA wurde in ng/ml quantifiziert und logarithmisch dargestellt Median und Interquartilabstand dargestellt. Für die Analyse der nichtparametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test verwendet.	151
61	Absolute Konzentration des Serum-PDGF-AA in GEAC-Patienten mit verschiedenen klinisch-pathologischen Stadien. Verglichen wurde jeweils der Progress der Tumorinfiltration (T1-T2 vs. T3-T4), das Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung (N0 vs. N1-N3), der Lymphangiainvasion (L0 vs. L1), der Gefäßinvasion (V0 vs. V1), der Grad der Differenzierung (G1-G2 vs. G3-G4), der durchgeführten neoadjuvanten Chemotherapie (NTx vs. keine NTx) und dem Verbleib von Tumorzellen im Resektionsrand (R0 vs. R1). Ergebnisse wurden als mediane PDGD-AA-Konzentration und interquartilen Abstand dargestellt. Für die Analyse der nicht parametrischen Daten wurde der zweiseitige Mann-Whitney Test verwendet. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. mbox*: p < 0,05, **: p < 0,002, ***: p < 0,0002, ****: p < 0,0001.	153

A. Anhang

A.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Jörg Schrader für die Möglichkeit, dieses spannende Thema zu bearbeiten, für seine kontinuierliche Unterstützung, seine wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und seine stets offene Tür für Fragen und Diskussionen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Tim Gilberger herzlich für die Übernahme der Zweitbetreuung sowie für seine hilfreichen Anmerkungen und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Ansgar W. Lohse sowie Herrn Prof. Dr. Samuel Huber für die Durchführung der Promotion in der Klinik.

Für die hervorragende technische Unterstützung und ihre zuverlässige Hilfe im Labor danke ich Martina Fahl und Corinna Eggers. Meiner Kollegin Tania Amin gilt mein Dank für die angenehme Zusammenarbeit, die anregenden Gespräche und die gegenseitige Unterstützung im Forschungsalltag. Darüber hinaus möchte ich allen Kollegen des Labors der I. Medizinischen Klinik danken.

Darüber hinaus verdanke ich der Werner-Otto-Stiftung, dass ich mich in den Jahren 2017 bis 2019 mit der erforderlichen Konzentration und Kontinuität meiner wissenschaftlichen Arbeit widmen konnte. Das mir gewährte Stipendium eröffnete mir hierfür die notwendigen finanziellen Freiräume.

All meinen Freunden danke ich für die außerordentlich gute Freundschaft und das erbrachte Verständnis.

Meiner Familie danke ich für die emotionale Unterstützung während meiner beiden Studien und meiner beiden Doktorarbeiten. Mein tief empfundener Dank gilt schließlich meiner Frau Nadine-Marie für ihre uneingeschränkte Rückendeckung und Geduld während der Entstehung dieser Arbeit. Zu guter Letzt danke ich meinen kleinen Töchtern Elea und Lenia, die mein Leben seit ihrer Geburt auf unvergleichliche Weise schöner, lustiger und aufregender machen.

A.2 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

Hamburg, den _____

Unterschrift _____