



Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München

Direktor:
Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess

Die tumorgerichtete Gliazellmigration in der neuralen Invasion im humanen Pankreaskarzinom

Alexandra Reichel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Güralp O. Ceyhan
2. Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess
3. Univ.-Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 12.06.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 15.09.2015 angenommen.

*Für meine Eltern, die mir durch Ihre Entschlossenheit Bekanntes zu verlassen
und Neues anzunehmen alles ermöglicht haben.*

*Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie
sind.*

Aristoteles, 384 – 322 v. Chr.

Veröffentlichungen

1. Liebl, F., Demir, I. E., Rosenberg, R., **Boldis, A.**, Yildiz, E., Kujundzic, K., Kehl, T., Dischl, D., Schuster, T., Maak, M., Becker, K., Langer, R., Laschinger, M., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2013). The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer. *Clin Cancer Res*, 19, 50-61.
2. Demir, I.E.*, **Boldis, A.***, Brunner, E., Klose, N., Kehl, T., Maak, M., Lesina, M., Laschinger, M., Janssen, K.P., Algül, H., Friess, H., Ceyhan, G.O. (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst*, 106, 1-12. ***gleichgestellte Erstautorenschaft**

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	Rinderserum Albumin (Bovine serum albumine)
CCC	Colonkarzinomzellen (Colon cancer cells)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DRG	Spinalganglien (Dorsal root ganglia)
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kalbserum (fetal calf serum)
FMI	Forward Migration Index
g	Gramm
h	Stunde (hour)
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
hSc	Humane Schwann`sche Zellen
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nerve growth factor
°C	Grad Celsius
PBS	Phosphate buffered saline
Pca	Adenokarzinom des Pankreas (Pancreatic adenocarcinoma)
PCC	Pankreaszelllinie (pancreatic cancer cell line)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardabweichung (Standard error of the mean)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	8
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms.....	9
1.3 Tumorpathogenese	11
1.4 Klinik und Therapie	12
1.5 Die neurale Invasion im Pankreaskarzinom.....	14
1.6 Die Rolle neurotropher Faktoren im Pankreaskarzinom und in der neuralen Invasion .	15
1.7 Neurale Plastizität und neuropathischer Schmerz im Pankreaskarzinom	16
1.8 Die periphere Glia im Pankreaskarzinom	17
2. Zentrale Fragestellung.....	19
3. Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Zellkultur.....	20
3.1.2 Präparation der Spinalganglien	22
3.1.3 3-D Migrationsassay	23
3.1.4 Kokultur	25
3.1.5 Proteinlyse und Western Blot.....	25
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Zellkultur.....	28
3.2.2 Präparation der Spinalganglien	30
3.2.3 3-D Migrationsassay	30
3.2.4 Kokultur	32
3.2.5 Proteinlyse und Western Blot.....	32

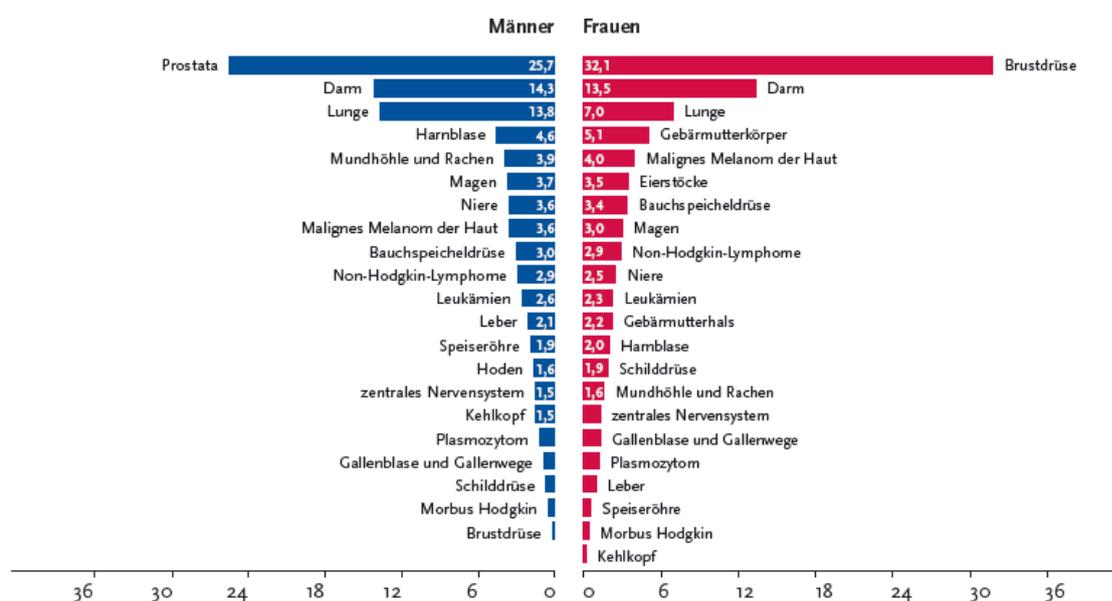
3.2.6 Statistik.....	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Quantifizierung der Migration von Pankreaskarzinomzellen	36
4.2 Pankreaskarzinomzellen zeigen eine spezifischere Migration zu Neuronen als zu Gliazellen	37
4.3 Die Migration der Schwannschen Zellen zum Karzinom ist langsamer aber zielgerichtet.....	41
4.4 Die Migration der Schwannschen Zellen zu den Pankreaskarzinomzellen ist spezifischer als zu anderen Tumorentitäten	44
4.5 Die neuron-gerichtete Migration ist bei Pankreaskarzinomzellen ausgeprägter als bei Kolonkarzinomzellen	47
4.6 Die Rolle des NGF und seiner Rezeptoren p75 und TrkA in der neuralen Invasion.....	52
4.6.1 NGF-Expression im 3-D Migrationsassay mit T3M4 PCCs, hSc und DRGs.....	53
4.6.2 TrkA und p75-Expression im Rahmen der Kokultur von T3M4 PCCs mit DRGs.	54
4.6.3 TrkA und p75-Expression im Rahmen der Kokultur von T3M4 PCCs mit Schwannschen Zellen.....	56
4.6.4 Inhibitor des NGF Rezeptors p75 im Migrationsassay	58
5. Diskussion	63
6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	71
7. Literaturverzeichnis.....	73
8. Danksagung.....	79

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Mit der Diagnose eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas, welches über 80 % der Pankreaskarzinome darstellt, ist fast immer eine fatale Langzeitprognose verbunden. In Deutschland betrug die Anzahl der Erkrankungsfälle im Jahr 2008 für Männer 7390 und für Frauen 7570. Die Anzahl der Sterbefälle lag im selben Jahr für Männer bei 7327 und für Frauen bei 7508. Die 5 – Jahresüberlebensrate beträgt bei Männern nur 5 – 7 % und bei Frauen 3 – 8 %. Obwohl der prozentuale Anteil des Pankreaskarzinoms an allen Krebsneuerkrankungen für Männer nur 2,8 % und für Frauen nur 3,5 % beträgt und damit an neunter beziehungsweise zehnter Stelle aller Krebsneuerkrankungen steht, ist das Pankreaskarzinom aufgrund seiner hohen Aggressivität dennoch die vierthäufigste Krebstodesursache (Robert Koch Institut, 2010).

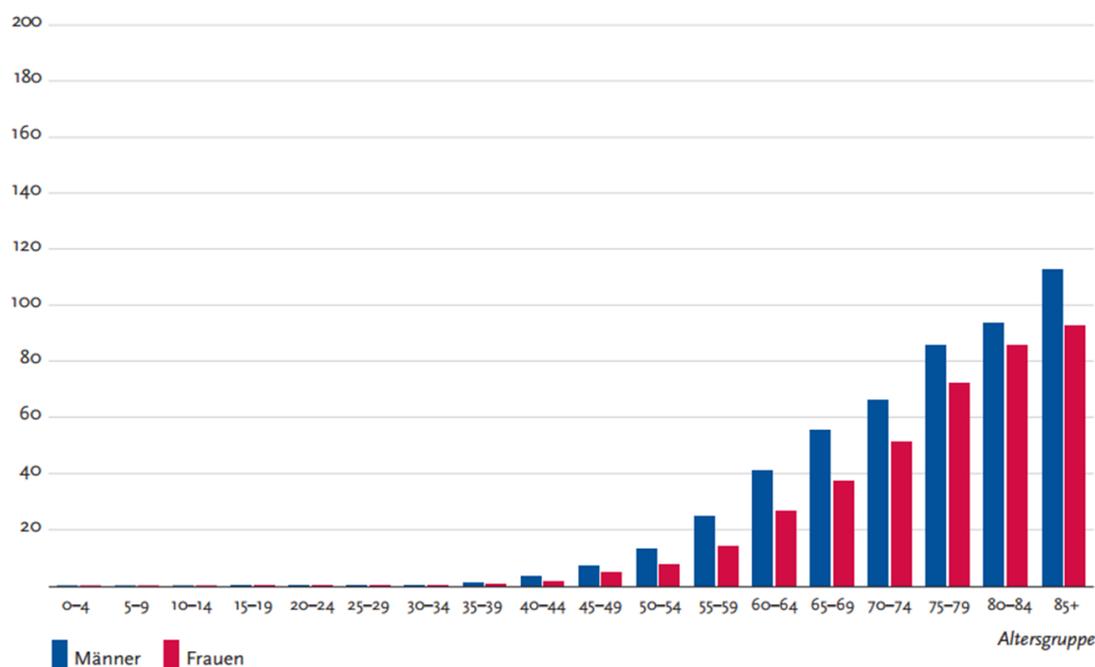
Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008:



Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch Institut, 2010

Seit 1975 steigt die Inzidenz des Pankreaskarzinoms bei Frauen, wohingegen bei Männern die Inzidenz gleichgeblieben ist (Edwards, et al., 2010, pp. 550, 554). Die Mortalität ist jedoch für beide Geschlechter steigend (Edwards, et al., 2010, p. 553). Vor dem 45. Lebensjahr wird die Krankheit selten diagnostiziert. Die Inzidenz nimmt aber mit steigendem Lebensalter zu, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei Männern bei 67 Jahren und bei Frauen bei 74 Jahren liegt (Adler, et al., 2007, p. 1696).

Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht ICD-10 C25, Deutschland 2007-2008, je 100.000:



Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch Institut, 2012

Die Lebenszeitprävalenz des Pankreaskarzinoms beträgt bei beiden Geschlechtern ca. 1 % (Risch, 2003, p. 948).

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist trotz intensiver Forschung weiterhin unklar. Auch konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutigen Risikofaktoren für die Entstehung eines

Pankreaskarzinoms nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Lebensgewohnheiten wie beispielsweise das Rauchen und der Konsum von Alkohol zu einem signifikant früheren Zeitpunkt mit der Diagnose des Pankreaskarzinom einhergehen kann, im Vergleich zu Kontrollgruppen die weder rauchten noch Alkohol konsumierten (Brand, et al., 2009, p. 1010). Ebenfalls wird vermutet, dass Adipositas mit einem BMI > 30 kg/m² das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken im Vergleich zu Personen mit einem BMI < 23 kg/m² deutlich erhöht (Michaud, et al., 2001, p. 921). Weiterhin scheint die chronische Pankreatitis, insbesondere bei langjährigem Bestehen, das Risiko zu erhöhen an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Farrow & Evers, 2002, p. 156). Die akute Pankreatitis dagegen scheint eher ein Vorbote aber kein Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu sein (Bansal & Sonnenberg, 1995; Sharma, Eltawil, Renfrew, Walsh, & Molinari, 2011, p. 250;869). Ferner konnten Studien zeigen, dass langjähriger Diabetes mellitus, insbesondere Typ-2-Diabetes mellitus, das Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms erhöht. Insulin scheint hierbei als Wachstumsfaktor zu fungieren und somit die Karzinogenese in vielen Karzinomen, unter anderem auch im Pankreaskarzinom, zu unterstützen (Cui & Andersen, 2012, p. 14). Typ-2-Diabetiker unter Metformintherapie haben hierbei ein signifikant niedrigeres Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken als Typ-2-Diabetiker unter Insulintherapie (Li, Yeung, Hassan, Konopleva, & Abbruzzese, 2009, p. 485). Ein Diabetes mellitus, welcher kurz vor der Diagnose eines Pankreaskarzinoms symptomatisch wird, scheint dagegen eher eine Manifestation des Pankreaskarzinoms und kein Risikofaktor zu sein (Chari, et al., 2008, p. 95).

Hereditäre Faktoren scheinen für ungefähr 3,5% aller Pankreaskarzinome verantwortlich zu sein (Bartsch, et al., 2004, p. 902). Das höchste Risiko zeigen Personen, die an einer hereditären chronischen Pankreatitis leiden. Hierbei steigt das Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln um das 53-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung (Lowenfels, et al., 1997, p. 444). Ein ebenfalls erhöhtes Risiko haben Personen, welche an einem hereditären Tumorsyndrom beispielsweise Peutz-Jeghers Syndrom, FAMMM-PC (familial atypical multiple mole melanoma), HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrom), FPC oder auch HOBC (hereditary breast and ovarian cancer) leiden (Rieder & Bartsch, 2004, pp. 70-73).

1.3 Tumorpathogenese

Das Pankreas besteht aus drei zellulären Kompartimenten: dem azinären, dem duktalem -beide zusammen bilden den exokrinen Teil des Pankreas- und dem endokrinen Teil, den Inselzellen. Die histopathologische Typisierung der Pankreaskarzinome erfolgt anhand der WHO. 60% aller PCa sind typischerweise im Kopfbereich, 30% im Corpus/ Cauda Bereich und nur 5% allein im Cauda Bereich des Pankreas lokalisiert (Henne-Bruns D. , 2008, p. 546). Über 90% der Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome ausgehend von den duktalem Anteilen des Pankreas, wobei dieser nur 4% des exokrinen Anteils des Pankreas darstellt. Obwohl das azinäre Kompartiment 80% des Pankreasparenchyms bildet, sind azinäre Tumore selten (Risch, 2003, pp. 948, 949). Ein Erklärungsmodell für die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist das „injury-inflammation-cancer“ Modell. Hierbei wird angenommen, dass inflammatorische Mediatoren, welche durch Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus, chronische Pankreatitis etc. induziert werden, Genmutationen begünstigen und dadurch zur Entstehung von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien beitragen (Momi, Kaur, Krishn, & Batra, 2012, pp. 283-284). Entzündungen des Pankreas führen zur Produktion und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin 6 und Interferon- γ . Eine Erhöhung dieser Zytokine findet sich auch im Pankreaskarzinom (Friess, Guo, Nan, Kleeff, & Büchler, 1999, pp. 114-116). TNF- α führt unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher als Transkriptionsfaktor Einfluss auf den Zellzyklus, die Apoptose und die Inflammation nimmt (Dong, Jimi, Zeiss, Hayden, & Ghosh, 2010, p. 1709). Für das Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass TNF- α durch Aktivierung von NF- κ B die Apoptose von Pankreaszellen inhibiert (McDade, Perugini, Vittimberga, Carrigan, & Callery, 1999, pp. 58-60). Durch die Inflammation kommt es weiterhin zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche bei oxidativem Stress gebildet werden. ROS führen zu DNA-Schäden, welche Mutationen in Tumorsupressor- oder Tumoronkogenen hervorrufen können. Dies kann die Karzinogenese initiieren (Kundu & Surh, 2008, pp. 15-17). Die am häufigsten mutierten Gene im Pankreaskarzinom sind K-ras und p53 (Shin, et al., 2013, p. 216). Die Mutation dieser Gene kann über mehrere Vorstufen zum invasiven duktalem Adenokarzinom des Pankreas führen. Zum jetzigen Zeitpunkt werden drei Vorläuferläsionen beschrieben: die am häufigsten vorkommende Läsion ist die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIn), weiterhin

gefolgt von der intraduktalen papillären muzinösen Neoplasie (IPMN) und der muzinös-zystischen Neoplasie (MCN) (Mazur & Siveke, 2012, p. 1489).

1.4 Klinik und Therapie

Ein Grund für die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ist die erst sehr späte klinische Manifestation von Symptomen. Aufgrund dessen liegt bei Erst-Diagnosestellung in 65 % der Fälle bereits ein organüberschreitendes Wachstum vor, so dass von allen Pankreaskarzinomen lediglich 20% resektabel sind (Niederhuber, Brennan, & Menck, 1995, pp. 1673-1674). Klinisch wird das Pankreaskarzinom anhand der TNM-Klassifikation eingeteilt und anhand der UICC in vier Stadien unterteilt (Sobin, Gospodarowicz, Wittekind, & International Union against Cancer., 2010).

Das Leitsymptom des Pankreaskarzinoms im Kopfbereich ist der schmerzlose Ikterus, der bei 70-80% aller Patienten auftritt (Freelove & Walling, 2006, pp. 485-486). Weitere häufige Symptome sind Gewichtsabnahme sowie uncharakteristische Oberbauch- und Rückenschmerzen, welche auf eine Infiltration der intra- und extrapancreatischen Nerven hindeuten und somit auf ein bereits weit fortgeschrittenes Tumorstadium (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009; di Mola & di Sebastiano, 2008, pp. 182; 919-920). Patienten mit uncharakteristischen Oberbauchschmerzen, beziehungsweise Rückenschmerzen haben auch ein verkürztes mittleres Überleben von 5,7 Monaten im Vergleich zu Patienten ohne Schmerzen von 15 Monaten (Kuvshinoff & Bryer, 2000, p. 429). Weiterhin kann es durch eine Duodenalobstruktion zu Übelkeit und Erbrechen kommen, sowie infolge paraneoplastischer Ereignisse zu Thrombophlebitiden und Thrombosen. Bei Vorliegen einer Peritonealkarzinose kann ein Aszites als klinisches Korrelat auftreten (Henne-Bruns D. , 2008; Siewert, 2010, pp. 546, 569).

Bei Vorliegen des Verdachts eines Pankreaskarzinoms sollten Patienten eine computertomographische Untersuchung erfahren. In 95% der Fälle kann mit Hilfe dieser Untersuchung der Verdacht auf ein Pankreaskarzinom erhärtet werden. Die beiden sensitivsten Verfahren um ein Pankreaskarzinom zu detektieren sind die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) in Kombination mit der Magnetresonanztomographie (MRCP) ("S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom," 2013, p. 56). Typische Zeichen im CT sind eine hypodense

Raumforderung oder ein dilatierter Pankreasgang. Bei Patienten mit einer Raumforderung im Bereich des Pankreaskopfes findet man häufig eine Obstruktion des Gallenganges. Gleichzeitig lässt sich die Ausdehnung des Tumors einschätzen (Kuvshinoff & Bryer, 2000, p. 429). Patienten in einem bereits metastasierten Stadium, am häufigsten sind die Leber und das Peritoneum betroffen, profitieren häufig nicht mehr von einer chirurgischen Intervention. Weiteres Kriterium gegen ein chirurgisches Eingreifen stellt die Infiltration über 180° von nahe gelegenen arteriellen Gefäßen dar (Arteria hepatica, Arteria mesenterica superior oder Truncus coeliacus). Nur etwa 20% aller Patienten sind Kandidaten für eine chirurgische Resektion. Für Tumore im Kopf- und Korpusbereich ist der einzige kurative Ansatz eine Whipple'sche Operation. Hierbei werden der Pankreaskopf, das Duodenum, ein Teil des Magens, die Gallenblase und lokale Lymphknoten entfernt. Heutzutage wird eher die organschonende pyloruserhaltende Whipple'sche Operation durchgeführt. Die Whipple'sche Operation stellt einen großen Eingriff für den Patienten dar, ist jedoch die einzig potenziell kurative Therapieoption. Patienten mit einem Pankreaskarzinom haben nach einer Resektion ein signifikant längeres Überleben gezeigt als nach alleiniger Radiochemotherapie (Doi, et al., 2008, p. 1024). Eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine zeigte in einer großen multizentrischen Studien ein signifikant längeres medianes Überleben bei Patientin mit Pankreaskarzinom, unabhängig vom Tumorstadium, und das 5-Jahres-Überleben betrug in der Gemcitabine-Gruppe 16,5% im Vergleich zu 5,5 % in der Kontrollgruppe (Oettle, et al., 2007; Wagner, et al., 2004, pp. 271-272; 589). Der Grund für das schlechte Überleben der Patienten liegt möglicherweise an der Schwierigkeit eine wirkliche R0-Resektion des Pankreaskarzinoms zu erreichen. Durch enge Lagebeziehung zu großen Gefäßen, einem direkten Lymphabfluss in die Leber aber vor allem auch aufgrund einer frühen Metastasierung entlang der Perineuralscheiden der initial intra- und später extrapancreatischen Nerven, werden der chirurgischen Resektion Grenzen gesetzt (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009, p. 185). Insbesondere die neurale Invasion der Pankreaskarzinomzellen senkt die Prognose der Patienten drastisch. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ohne neurale Invasion das 5-Jahresüberleben bei 75 % lag. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass bei einem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und zusätzlich neuraler Invasion der Tumorzellen das 5-Jahresüberleben lediglich bei 29 % lag (Chen & Prinz, 2007, p. 128). Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur neuralen Invasion im Pankreaskarzinom beitragen, könnte lokale Rezidive und extrapancreatische Ausbreitung der

Pankreaskarzinomzellen hemmen oder möglicherweise sogar verhindern und somit zu einer verbesserten Langzeitprognose des Pankreaskarzinoms beitragen.

1.5 Die neurale Invasion im Pankreaskarzinom

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts beschrieben Anatomen und Physiologen das Phänomen der Invasion der Nerven von Krebszellen, und 1930 stellte Jentzer die Hypothese auf, dass die Karzinomzellen die Nerven nicht nur infiltrieren, sondern diese auch benutzen um in weit entfernte Areale zu metastasieren (Ozaki, et al., 1999, p. 18). 1985 definierte der amerikanische Pathologe John Batsakis die neurale Invasion als: "cancer cell invasion in, around and through the nerve" (Demir, et al., 2010, p. 1514). Das Besondere am duktalem Adenokarzinom des Pankreas ist, dass die neurale Invasion in bis zu 100 % aller histopathologischen Schnitte zu erkennen ist (Batsakis, 1985, p. 426). Bockman et al. konnten 1994 durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachweisen, dass es bei dem Phänomen der neuralen Invasion nicht nur zu einer Annäherung der Karzinomzellen an die Nerven, sondern vielmehr zu einer Infiltration der Nerven durch die Pankreaskarzinomzellen kommt. Dabei wird das Perineurium zerstört und die Karzinomzellen infiltrieren das Endoneurium mit den dort befindlichen Strukturen, den Axonen und den Schwannschen Zellen. Es kommt hierbei nicht nur zu einer Infiltration der Nerven sondern vielmehr zu einer Zerstörung nicht nur des Perineuriums und der Axone, sondern des Nerven als Ganzes (Dai, et al., 2007, p. 299). Um die neurale Invasion histopathologisch besser charakterisieren zu können, wurde diese anhand verschiedener Wachstumsmuster der Pankreaskarzinomzellen entlang der Nerven in fünf Kategorien eingeteilt: 1) Direkte Invasion der Nerven, 2) Kontinuierliches Karzinomzellwachstum im Perineurium, 3) Verteilung der Karzinomzellen an Aufzweigungen der Nerven, 4) Bildung einer führenden Leitgruppe der Karzinomzellen, 5) Direkte Invasion angrenzender Lymphknoten, wobei das kontinuierliche Wachstumsmuster am häufigsten beobachtet wurde (Bockman, Buchler, & Beger, 1994, p. 221). Durch diese Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Pankreaskarzinomzellen kontinuierlich entlang der Nerven in den extrapankreatisch gelegenen Plexus metastasieren und damit die chirurgische R0-Resektion des Pankreaskarzinoms deutlich limitieren. Aufgrund dessen wurde die Vermutung aufgestellt, dass die neurale Invasion jenen Metastasierungsweg darstellt, welcher im weiteren Verlauf zu Lymphknotenmetastasierung führt (Kayahara,

Nakagawara, Kitagawa, & Ohta, 2007, p. 222). Jedoch ist die kontinuierliche Metastasierung entlang der Nerven nicht die einzige Möglichkeit der Ausbreitung von Pankreaskarzinomzellen. In mehr als 50 % aller histopathologischer Schnitte des Pankreaskarzinoms konnte eine neurale Invasion in ansonsten gesundem Pankreasgewebe, weit entfernt von der Haupttumormasse, beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde als „Nex“ (intra-pancreatic, extra-tumoral neural invasion) bezeichnet (Demir, et al., 2010, pp. 1515-1516). Jedoch bleibt weiterhin die Frage offen, wieso die Prävalenz der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom so unvergleichbar groß ist im Gegensatz zu anderen gastrointestinalen Tumoren. Eine Hypothese besagt, dass die Anatomie des Pankreas mitverantwortlich ist für die neurale Invasion. Das Pankreas enthält eine Vielzahl von intrapancreatischen neuralen Strukturen, beispielsweise Ganglia, welche vom autonomen Nervensystem, ausgehend von dem Plexus coeliacus und dem Plexus, welcher die A. mesenterica superior umgibt, innerviert werden. Weiterhin hat das Pankreas als retroperitoneales Organ eine enge Lagebeziehung nicht nur zu dem Plexus coeliacus, sondern auch zu dem dorsalen Plexus hepaticus (Takahashi, Ishikura, Kato, Tanabe, & Yoshiki, 1992, p. 166). Reicht aber diese Lagebeziehung aus, um die hohe Attraktivität der Pankreaskarzinomzellen zu den Nerven zu erklären? Lange wurde angenommen, dass die neurale Invasion nur ein Weg des geringeren Widerstandes für die Karzinomzellen ist. Heute glaubt man jedoch, dass es ein Resultat aus einer aktiven und sehr spezifischen gegenseitigen Anziehung peripherer Nerven und Pankreaskarzinomzellen ist. Auf Grund dessen hat sich das Augenmerk der Forschung vor allem auf molekulare Mechanismen gerichtet, welche für diese Attraktivität neuronaler Strukturen für maligne Zellen verantwortlich sein könnten. Beispielsweise könnten neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren erstklassige Kandidaten für die Entstehung dieser Attraktivität darstellen, weil sie eine potente Wirkung auf das neuronale Wachstum ausüben und chemoattraktive Eigenschaften besitzen (Marchesi, Piemonti, Mantovani, & Allavena, 2010, p. 78).

1.6 Die Rolle neurotropher Faktoren im Pankreaskarzinom und in der neuralen Invasion

Neurotrophe Faktoren, zu welchen BDNF, Neurotrophin 3 und 4/5 und NGF zählen, sind für die Differenzierung, Funktion und das Überleben von Neuronen sowohl im zentralen als auch

im peripheren Nervensystem verantwortlich. Neurotrophe Faktoren sind einzigartig in der Hinsicht, dass sie sowohl Wachstum stimulieren, als auch Apoptose induzieren können, je nach Vorhandensein ihrer beiden Rezeptoren. Diese beiden Rezeptoren sind zum einen der high-affinity Tyrosinkinase Rezeptor (TrkA, B oder C, wobei TrkA der bevorzugte Rezeptor von NGF ist) und der low-affinity p75 Rezeptor, an welche alle neurotrophen Faktoren mit derselben Affinität binden (Liebig, Ayala, Wilks, Berger, & Albo, 2009, pp. 3383, 3387). In Pankreaskarzinomzellen konnte eine Hochregulation des NGFs auf Proteinebene beobachtet werden, wobei der TrkA Rezeptor kaum in Pankreaskarzinomzellen vorhanden war (Ma, Jiang, Sun, & Zhao, 2008, pp. 1854-1855). Gleichzeitig zeigte sich eine hohe Expression des TrkA Rezeptors im Perineurium peripherer Nerven. Auf mRNA Ebene konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass in Tumorgewebe, welches eine hohe Inzidenz neuraler Invasion nachwies, NGF und TrkA hochreguliert waren im Vergleich zu Tumorgewebe, in welchem kaum neurale Invasion vorhanden war (Kurihara, Shinohara, Yoshino, Takeda, & Shiba, 2003, pp. 76-77). Weitere Studien zeigten, dass, obwohl die Expression des p75 sowohl in normalen Pankreata als auch im PCa schwach war, es dennoch eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der neuralen Invasion und der Expression von p75 in Pankreaskarzinomzellen gab. Weiterhin kommt es bei einer erhöhten Expression von p75 in Pankreaskarzinomzellen zu einer verstärkten Migration in Richtung von NGF (Z. Zhu, et al., 1999, p. 2427). All diese Beobachtungen erhärten die Hypothese, dass sowohl NGF als auch seine Rezeptoren Trk A und p75 eine wichtige Rolle in der Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom einnehmen.

1.7 Neurale Plastizität und neuropathischer Schmerz im Pankreaskarzinom

Die intrapancreatischen neuralen Veränderungen im Pankreaskarzinom beschränken sich nicht allein auf die Invasion von Tumorzellen in die Nerven, sondern es kommt gleichzeitig zu einer veränderten pankreatischen Neuroplastizität und zu den damit assoziierten neuropathischen abdominalen Schmerzen (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009, pp. 179-182).

Im Vergleich zu normalen Pankreata zeigt sich im Pankreaskarzinom ebenfalls eine neurale Hypertrophie und eine erhöhte neurale Dichte, wobei der Grad der neuralen Invasion mit dem Grad der neuralen Hypertrophie und Dichte assoziiert ist (Wang, et al., 2009, pp. 830-831). Desweiteren unterliegen die neuronalen Strukturen im Pankreaskarzinom Veränderungen und

es kommt zum Phänomen der neuralen Plastizität. Dies konnte mithilfe der Immunoreaktivität der Nerven für den Marker GAP-43, ein bekannter Marker für neuroplastische Veränderungen, festgestellt werden. Ebenfalls ließ sich im Pankreaskarzinom im Vergleich zum normalen Pankreas eine pankreatische Neuritis feststellen, welche wiederum mit dem Grad der neuralen Dichte korrelierte (Ceyhan, Demir, et al., 2009, p. 2558).

Im Pankreaskarzinom berichten 40–80 % der Patienten von Schmerzen (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009, pp. 179-182). Für die Entstehung des Schmerzes im Pankreaskarzinom wird eine multifaktorielle Genese diskutiert, wobei der genaue Entstehungsmechanismus bis heute nicht geklärt ist. In einer Studie von Ceyhan et al. 2009 konnte jedoch gezeigt werden, dass der Schmerz im Pankreaskarzinom positiv mit der Größe der intrapancreatischen Nerven und deren Dichte korreliert. Somit konnte nachgewiesen werden, dass neuropathische Veränderungen eine potentiell wichtige Rolle in der Pathogenese des abdominellen Schmerzes beim Pankreaskarzinom spielen. Auch der Grad der neuralen Invasion korrelierte positiv mit dem Schweregrad des abdominellen Schmerzes beim Pankreaskarzinom (di Mola & di Sebastiano, 2008, p. 919). Dies bedeutet, dass der Schmerz, den die Patienten mit einem Pankreaskarzinom verspüren, möglicherweise ein neuropathischer Schmerz ist, denn neuropathischer Schmerz wird von der International Association for the Study of Pain (IASP) definiert als „Schmerz, welcher die unmittelbare Konsequenz einer Läsion oder einer Krankheit des somatosensorischen Systems ist“ (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009, pp. 179-182).

1.8 Die periphere Glia im Pankreaskarzinom

Schwannsche Zellen, die Glia des peripheren Nervensystems, werden in letzter Zeit als Ursache der Entstehung des neuropathischen Schmerzens diskutiert (Scholz & Woolf, 2007, pp. 1361-1362). Jedoch ist der Einfluss der Schwannschen Zellen nicht allein auf die Entstehung des Schmerzgeschehens im Pankreaskarzinom zu beschränken, sondern möglicherweise vielfältiger als heute bekannt. In der Tat werden Schwannsche Zellen heute auch als elementarer Bestandteil nicht nur in der Entstehung des neuropathischen Schmerzes, sondern auch in der Entstehung der Inflammation und der peripheren Nervenverletzung angesehen. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Schwannsche Zellen im Pankreaskarzinom eine Reaktivierung erfahren. Zum einen zeigte sich, dass es in

Schwannschen Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Gliazellmarkers Sox10, ein Marker, den hauptsächlich adulte Schwann'sche Zellen exprimieren, im Pankreaskarzinom kommt. Gleichzeitig wird in Nerven, die von Tumorzellen infiltriert werden, Nestin, ein Marker für neurale Vorläuferzellen, vermehrt exprimiert (de Leon-Casasola, 2011, p. 100). Bei Verletzungen von peripheren Nerven, wie sie auch im Pankreaskarzinom zu finden sind, werden Schwannsche Zellen aktiviert und beginnen GAP-43 zu exprimieren, ein Marker welcher normalerweise von Schwann Zell-Vorläufern und nicht myelinisierenden Schwannschen Zellen exprimiert wird (Ceyhan, Demir, et al., 2009, p. 2559). Weiterhin kommt es zu einer Hochregulation von NGF und gleichzeitig p75, einem Phänomen, welches auch im Pankreaskarzinom zu beobachten ist. Diese Kombination führt beim peripheren Nervenschaden zu einer Proliferation und Migration Schwannscher Zellen und als Folge davon zur Aussprossung von Axonen und axonaler Regeneration (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009, p. 183). Dies könnte bedeuten, dass beim Nervenschaden, welcher im Pankreaskarzinom durch infiltrierende Tumorzellen entsteht, Schwannsche Zellen reaktiviert werden und dadurch eine potentielle Rolle im Rahmen der neuralen Invasion einnehmen (Terenghi, 1999, pp. 4-5). Trotz aller Erkenntnisse bleibt dennoch weiterhin unklar, ob die Schwannschen Zellen in diesem Szenarium eine aktive oder doch nur eine passive Rolle einnehmen.

2. Zentrale Fragestellung

Obwohl die letzten 10 Jahre eine erstaunliche Vielzahl an Entdeckungen im Bereich der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom hervorbrachten, ist die Entstehung dieses Phänomens und der genaue Pathomechanismus bis heute nicht geklärt. Bislang ging man bei der neuralen Invasion von einer Affinität von Krebszellen zu Nerven aus. Jedoch bestehen periphere Nerven nicht nur aus neuronalen Strukturen, den Axonen, sondern auch aus glialen Strukturen, den Schwannschen Zellen. Viel wichtiger aber ist die Tatsache, dass die Schwannschen Zellen eine Barriere der Nerven gegenüber den Krebszellen darstellen. Weiterhin kommt es bei Verletzungen von peripheren Nerven, welche auch im Pankreaskarzinom vorzufinden sind, zu einer Aktivierung der die Nerven umhüllenden Glia, den Schwannschen Zellen, welche unter diesen Umständen proliferieren und migrieren (Bockman, et al., 1994, p. 221). Auf Grund dessen war das primäre Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung der Neuroaffinität der Pankreaskarzinomzellen, um Unterschiede im Potenzial der Attraktion von Karzinomzellen zwischen Neuronen und Gliazellen zu evaluieren. Die potenzielle Rolle der Glia in der Krebszellattraktion durch periphere Nerven wurde ebenfalls untersucht und weiterhin das Migrationsverhalten der Schwannschen Zellen zu anderen Tumorentitäten des gastrointestinalen Bereiches evaluiert. Während im Pankreaskarzinom bis zu 100 % neurale Invasion beobachtet wird, haben andere gastrointestinale Tumorentitäten wie beispielsweise das kolorektale Karzinom eine Inzidenz von nur 20 % (Liu & Lu, 2002, p. 470). Die Frage, ob das Phänomen der neuralen Invasion einzigartig für das Pankreaskarzinom ist, oder ebenfalls eine spezifische Migration von Karzinomzellen anderer Tumorentitäten Richtung Nerven beobachtet werden kann wurde untersucht. Auf molekularer Ebene wurde in dieser Arbeit die Bedeutung des neurotrophen Faktors NGF und seiner Rezeptoren Trk A und p75 in der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom erforscht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkultur

Charakterisierung der Zelllinien:

T3M4:

Humane epitheliale Zelllinie aus einer Lebermetastase eines Adenokarzinoms des Pankreas. Mit freundlicher Genehmigung von R. S. Metzgar, Durham, North Carolina, USA.

Humane Schwannsche Zellen:

Schwannsche Zellen isoliert aus humanen Spinalnerven. Diese wurden nach der ersten Passage kryokonserviert verschickt und bis zur zehnten Passage für Experimente verwendet. Erworben bei der Firma ScienCell (Carlsbad, USA).

HTC-116:

Humane epitheliale Zelllinie eines kolorektalen Adenokarzinomas. Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe um Dr. Klaus-Peter Janssen, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

HT-29:

Humane epitheliale Zelllinie eines kolorektalen Adenokarzinomas. Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe um Dr. Klaus-Peter Janssen, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

SW 707:

Humane epitheliale Zelllinie eines kolorektalen Adenokarzinomas. Mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe um Dr. Klaus-Peter Janssen, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München.

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Mc Coy`s 5A	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) (high Glucose)	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Human Schwann Cell Medium	ScienCell	California, USA
PBS	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Fetal bovine serum	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Antibiotics Penicilline and Streptomycine	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
0,25 % Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen	Paisley, UK
Poly-D-Lysine Hydrobromid	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
Aqua	Braun	Melsung, GER
DMSO	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, GER

Ansätze:

Lösung	Ansatz
RPMI	10 % FCS 1 % Penicillin und Streptomycin
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	10 % FCS 1 % Penicillin und Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Mc Coy`s	10 % FCS 1 % Penicillin und Streptomycin
Poly-D-Lysine 2 mg/ml	100 mg Poly-D-Lysin 50 ml Bidest
Zellkultur-Färbelösung zur Überprüfung der Zellvitalität	50 % Zellsuspension 50% Trypan Blue stain solution
Einfriermedium	Entsprechendes Medium der Zelllinie 20 % DMSO

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
Pipettenspitzen	Star Lab	Ahrensburg, GER
Pipetten in ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Gewebekulturflaschen 25 und 75 ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf	Wesseling-Erzdorf, GER

PP-Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner	Frickenhausen, GER
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging	Chicago, USA
Cryo-Tube	Nunc	Roskilde, DK
Zellschaber	Sarstedt	Newton, USA

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Sterile Werkbank	Hera Safe, Thermo Science	Bonn, GER
Zentrifuge 5424	Eppendorf	Wesseling-Erzdorf, GER
Zentrifuge, Multifuge 3SR+	Thermo Science	Bonn, GER
Wasserbad Aqualine AL 18	Lauda	Lauda-Königshofen, GER
Mikroskop, Axiovert 40 CFL	Zeiss	Jena, GER
Inkubator, Hera cell 150	Thermo Science	Bonn, GER
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior	Lauda-Königshofen, GER
Pipetboy, IBS	Integra Biosciences	Fernwald, GER
Pipetten, Pipetman	Gilson	Villiers-le-Bel, FR
Isopropanolbehälter	Nunc	Roskilde, DK

3.1.2 Präparation der Spinalganglien

Versuchstiere:

Wistar Ratten, Jungtiere 2-15 Tage alt

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort
MEM (Minimal Essential Medium)	Promo Cell	Heidelberg, GER
HBSS (Hank`s BSS)	Promo Cell	Heidelberg, GER
Refobacin	Merck Pharma	Darmstadt, GER
Metronidazol	Merck Pharma	Darmstadt, GER
Collagenase Type 2	Worthington, Lakewood	New Jersey, USA

Ansätze:

Lösung	Ansatz
MEM	20 mg/ 500 ml Gentamicin 2,5 mg/ 500 ml Metronidazol
HBSS	20 mg/ 500 ml Gentamicin 2,5 mg/ 500 ml Metronidazol
Kollagenase 1%	100 mg Kollagenase Typ 2 10 ml Bidest Sterile Filtration durch 0,2 µm Nalgene Filter

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
Petrischale 100x20mm	Greiner	Frickenhausen, GER
Petrischale 60x15mm	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
Syringe filters	Nalgene	Rochester, USA
Spritze, Injekt	Braun	Melsungen, GER
Einmal-Injektions-Kanülen, Sterican	Braun	Melsungen, GER

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Semi-sterile Werkbank	Hera guard, Thermo Science	Bonn, GER
OP-Mikroskop SMZ 1500	Nikon	Düsseldorf, GER
Licht KL 1500 LCD	Zeiss	Jena, GER
Präparationsbesteck	Dumont	Inox, CH

3.1.3 3-D Migrationsassay

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort
ECM gel	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
Neurobasal Medium	Gibco Invitrogen	Paisley, UK
B 27-Supplement	Gibco Invitrogen	Paisley, UK
L-Glutamine	Gibco Invitrogen	Paisley, UK
P75 Inhibitor (Ro 08-2750)	Tocris	Bristol, UK

Material und Methoden

HEPES Buffer Solution	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
------------------------------	-----------------------	-------------------

Ansätze:

Lösung	Ansatz
Neurobasal	1 % Penicillin / Streptomycin 2 % B 27 (Gibco) 0,5 mM L-Glutamine HEPES 50 µl in 2 ml (25 mM)

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
Fluoro Dishes	FluoroDish, World Precision Instruments	Sarasoto, USA

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Mikroskop Observer Z1	Zeiss	Jena, GER
CO₂ Modul	Zeiss	Jena, GER
Temperatur Modul	Zeiss	Jena, GER
Computer	Dell	Frankfurt am Main, GER

Software:

Produkt	Hersteller	Ort
Software	Dell	Frankfurt am Main, GER
Windows Betriebssystem	Microsoft	Unterschleißheim, GER
Axio Vision Software	Zeiss	Jena, GER
MS Word	Microsoft	Unterschleißheim, GER
Image J	National Institute of Health	Maryland, USA
Graph Pad	GraphPad Software Inc.	California, USA

3.1.4 Kokultur

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
Coculture-Inserts 6-well plates	Greiner	Frickenhausen, GER
1,0 µm pore size	BD Falcon	Franklin Lakes, USA

3.1.5 Proteinlyse und Western Blot

Chemikalien und Lösungen:

Produkt	Hersteller	Ort
Tris	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, GER
HCl	Apothek des Klinikums	München, GER
NaCl	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, GER
NP-40	Roche	Mannheim, GER
Sodium deoxycholate	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
Complete Mini EDTA-free	Roche	Mannheim, GER
BSA (für Standards)	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Rockford, USA
Glycerol	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
β-2 Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
Bromphenolblau	Carl Roth	Karlsruhe, GER
SDS ultra pure	Carl Roth	Karlsruhe, GER
TEMED	Carl Roth	Karlsruhe, GER
Ammonium persulfate	Sigma	Taufkirchen, GER
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth	Karlsruhe, GER
PageRuler, Prestained Protein Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot, GER
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe, GER
Methanol	Merck	Darmstadt, GER
ε-Amino-capronsäure	Sigma Aldrich	Taufkirchen, GER
Ethanol	Merck	Darmstadt, GER
Milchpulver	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, GER
Tween 20	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, GER
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK

Ansätze:

Lösung	Ansatz
RIPA (200 ml)	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl, 1mM Na ₂ EDTA 1% NP-40 1% sodium deoxycholate
6x LSB (200 ml)	35 ml Tris HCl (1M9 pH6,8 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β-2-Mercapto
BSA Standards	0 µg/µl, 0,125 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, 4 µg/µl, 8 µg/µl in Ripa Puffer
4x Upper Tris	1,5 M (=60,8g) Tris 0,4 % (=4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 6,8
4x Lower Tris	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4 % (= 4 g) SDS ad 1 l H ₂ O Check pH 8,8
10 % Ammonium persulfate	100 mg Ammonium persulfate 1 ml H ₂ O
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g fc: 250 mM Gylcin 144g fc: 1,99M SDS 10g fc: 1% ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer I	Tris 36,3 g fc: 0,3 M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O check pH 10,4
Anodenpuffer II	Tris 3,03g fc: 0,025M Methanol 200 ml fc: 20% ad 1 l H ₂ O check pH 10,4
Kathodenpuffer	Tris 3,03g fc: 0,025 M ε-Amino-capronsäure 5,24g fc: 0,04M Methanol 200 ml fc: 20%
PBS	Natriumchlorid 137mM Kaliumchlorid 2,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10,14 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,8 mM
I-Milch (in PBS)	Milchpulver 5 % Tween 20 0,1 %
II-Milch (in PBS)	Milchpulver 7,5 % Tween 20 0,1 %
PBS/Tween (in PBS)	Tween 20 0,1 %
4 % Sammelgel (10ml)	Bidest 6,2 ml 4 x UT 2,5 ml AA/BIS 1,35 ml

Material und Methoden

	TEMED 20 μ l 10 % APS 30 μ l
7,5 % SDS Polyacrylamidgel (40 ml)	Bidest 19,6 ml 4 x LT 10 ml AA/BIS 10 ml TEMED 40 μ l 10 % APS 450 μ l

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller	Ort
Whatman	Whatman International Ltd.	Maidstone, UK
PVDF Membran	Millipore, Billerica	Massachusetts, USA
Fuji Medical X-Ray Film	Fuji	Düsseldorf, GER

Geräte:

Produkt	Hersteller	Ort
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, GER
Thermomixer Comfort 1,5ml	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, GER
Western Blotting Kammer	Biometra	Göttingen, GER
Power Pack 25	Biometra	Göttingen, GER
Roller Mixer	Stuart	Shaffordshire, UK
Vortex Mixer	Corning LSE	Massachusetts, USA

Antikörper:

Produkt	Hersteller	Ort	Verdünnung
TrkA, sc-118, (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Germany	
NGF, sc-548, (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Germany	
P75, (mouse)	Sigma	Taufkirchen, Germany	
GAPDH, sc-32233, (mouse)	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Germany	
Goat anti-mouse, sc-2005	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Germany	1:2000
Donkey anti-rabbit	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK	1:2000

3.2 Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und gemeinsam ausgewertet.

3.2.1 Zellkultur

Kulturbedingungen:

Die Zelllinie T3M4 wurde in RPMI Medium versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin in 75 ml Gewebekulturflaschen bei 37 °C in 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Die Zelllinie HCT-116 wurde in McCoy`s Medium versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin und die Zelllinien HT-29 und SW-707 in DMEM versetzt mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin und 2 mM L-Glutamine unter denselben Umgebungsbedingungen wie die T3M4-Zellen kultiviert. Die Schwannschen Zellen wurden in Schwann-Zellmedium mit 5 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % hSc Growth Supplement kultiviert. Für die Schwannschen Zellen wurden die Petrischalen mit Poly-D-Lysin beschichtet. Hierfür wurden 2 ml Poly-D-Lysin in Bidecst gelöst (Konzentration 2 mg/ml), auf der Petrischale gleichmäßig verteilt und für 15 min unter der sterilen Werkbank belassen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Petrischale wurde zweimal mit 5 ml Bidecst gewaschen. Die Platte wurde mit leicht geöffnetem Deckel für mindestens 30 min unter der sterilen Werkbank zum Trocknen belassen. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in Sterilwerkbänken durchgeführt. Die Kulturmedien wurden bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch 30 min in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das Kulturmedium wurde alle 72 h gewechselt.

Passagieren von Zellen:

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt. Die Zellen wurden daraufhin mit 5 ml PBS gewaschen und nachfolgend mit 2 ml Trypsin für 5 min im Inkubator inkubiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden der Gewebekulturflaschen wurde das Trypsin mit 8 ml Medium neutralisiert. Je nach Verwendungszweck wurde die entsprechende Menge an Zellen in eine neue Gewebekulturflasche mit 10 ml frischem Medium überführt.

Kryokonservierung der Zellen

Zur Vermeidung von Veränderungen innerhalb der Zelllinien wurde ein Teil der Zellen zu Beginn der Arbeit kryokonserviert. Dafür wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 2 ml Trypsin 5 min im Inkubator behandelt. Nachdem sich die Zellen vom Boden abgelöst hatten, wurde das Trypsin mit 8 ml Medium geblockt. Aus der Zellsuspension wurden 10 µl zur Zellzählung entnommen und der restliche Anteil in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Zeitgleich zur Zentrifugation wurde die Zellzählung durchgeführt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, so dass eine Konzentration von 2 Millionen Zellen/ml erreicht wurde. Aus dieser Suspension wurden jeweils 500 µl in ein Cryovial, welches vorher auf Eis gelagert wurde, überführt. Die gleiche Menge an Einfriermedium (entsprechendes Medium der jeweiligen Zelllinie mit 20 % DMSO) wurde langsam tröpfchenweise in das Vial zugegeben, wobei dieses leicht geschwenkt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung des DMSO zu erreichen. Anschließend wurden die Vials in einem Isopropanolbehälter über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Vials in flüssigen Stickstoff transferiert.

Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl der Zellen in einem ml einer bestimmten Suspension zu bestimmen, wurde 10 µl dieser Suspension entnommen und mit 10 µl Trypanblaulösung zusammengeführt. Hieraus wurden 10 µl entnommen, in die Neubauer Zählkammer eingebracht und die Anzahl der Zellen pro Quadrat ermittelt. Hierbei galt:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen in allen Quadraten}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zellyse

Um Zellysate für das Western Blotting zu gewinnen wurden das Medium der Zellen abgesaugt und diese mit 5 ml PBS gewaschen. Darauffolgend wurde eine entsprechende Menge an Lysis Puffer (RIPA) zugesetzt, die Zellen mit dem Zellscraper von der Gewebekulturflasche entfernt und mit einer Pipette in ein Eppendorftube überführt. Die

Lysate wurden sofort für das Immunoblotting verwendet oder bis zur ihrer Verwendung in minus 20 °C überführt und aufbewahrt.

3.2.2 Präparation der Spinalganglien

Nach Dekapitation der Jungtierratten wurde eine anteriore Laminektomie durchgeführt und die DRGs unter mikroskopischer Sicht freigelegt und entnommen, wie bereits vorbeschrieben (Wang, et al., 2009, p. 831). Die entnommenen DRGs wurden in MEM auf Eis überführt. Nachfolgend wurden die Ausläufer der DRGs entfernt. Daraufhin wurden die DRGs in 900 µl HBSS transferiert und 100 µl Trypsin in einer Endkonzentration von 2 mg / ml hinzugefügt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 min inkubiert, um die Kapsel der Spinalganglien zu verdauen. Nach abgeschlossener Verdauung wurden die Spinalganglien mit 2 Sterican Kanülen mit abnehmendem Durchmesser dissoziiert, um die Neurone komplett aus der Kapsel herauszulösen. Daraufhin wurden die Neurone in der Neubauer Zählkammer gezählt. 2000-3000 Neurone wurden für einen Ansatz verwendet.

3.2.3 3-D Migrationsassay

3-D Migrationsassay ohne Inhibitor

Das ECM Gel wurde 30 min auf Eis gelagert, um es aus seinem festen Zustand in einen flüssigen Aggregatzustand zu überführen. Nachdem die Schwannschen Zellen und die T3M4-Zellen mindestens 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin 5 min im Inkubator behandelt. Das Trypsin wurde mit jeweils 8 ml des entsprechenden Mediums geblockt. Aus dieser Zellsuspension wurden jeweils 10 µl für die Zellzählung entnommen. Die restliche Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Für jeden 3-D Migrationsassay wurden 10⁵ Zellen benötigt und die entsprechende Menge der Zellsuspension in ein Eppendorf Tube überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Zellpellet in 25 µl ECM Gel resuspendiert. Zuerst wurden die Schwannschen Zellen als Tropfen auf der Flouro Dish Petrischale aufgebracht. Zwischen jedem Schritt wurde die Petrischale 5 min im Inkubator

inkubiert. Dies gewährleistete das Erhärten des Gels. Somit wurde ein Ineinanderlaufen der einzelnen Tropfen verhindert. Danach wurden schrittweise die Pankreaskarzinomzellen, die Spinalganglien und das leere Gel ausgesät. Darauffolgend wurde die Petrischale für 10 min im Inkubator inkubiert. Es wurden 8 μ l ECM Gel verwendet, um die Brücken zwischen den Zellen zu pipettieren. Danach wurde die Petrischale für weitere 15 min im Inkubator inkubiert. Zum Schluss wurden 2 ml Neurobasal Medium mit 10 % FCS und 25 mM HEPES zugegeben.

3-D Migrationsassay mit p75-Inhibitor

Der p75-Inhibitor (Ro 08-2750) wurde in NaOH gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einer Verdünnung von 500 nM, 5 μ M und 50 μ M in 10 ml Serum Free RPMI Medium suspendiert. In diese Lösung wurden 500 000 T3M4-Zellen eingebracht, welche vorher mit PBS gewaschen, trypsinisiert und gezählt wurden. Die Zellen wurden mit dem p75-Inhibitor für 30 min im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Kontrollgruppe wurden weitere 500 000 Zellen in Serum Free RPMI Medium für 30 min im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden daraufhin bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Sie wurden erneut gezählt und es wurden jeweils 100 000 Zellen entnommen, in Eppendorftubes übertragen und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Zellpellet in 25 μ l ECM-Gel gelöst und nach Protokoll im 3-D Migrationassay verarbeitet.

Digitale Time-Lapse Mikroskopie

Nach einer Initialphase von 60h im Inkubator wurde das 3-D Migrationassay-Setup in die Kammer des digitalen time lapse Mikroskops transferiert. In dieser Kammer herrscht, generiert durch das Temperatur- und das CO₂ Modul, eine Temperatur von 37°C und eine CO₂ Sättigung von 5 %. Mit Hilfe der Axio Vision Software wurden alle 5 Minuten von allen Fronten der Zellen Bilder generiert, welche nachfolgend zu einer Bildersequenz zusammengestellt wurden. Die Aufnahmen erfolgten über einen Zeitraum von 12 h.

Analyse der Migration der Zellen

Ein speziell für die Migration von Zellen ausgerichtetes Tool von IBIDI wurde mit Hilfe der ImageJ Software ausgeführt. Hierbei wurde der zurückgelegte Weg einzelner Zellen einer

Population an einer Front über die gesamten 12h nachverfolgt. An jeder Front wurden mindestens 30 Zellen getrackt. Das Tool von IBIDI ermöglicht es, zu jeder Zelle Aussagen zu treffen bezüglich der folgenden Paramentern: Euklidisch zurückgelegte Strecke, akkumuliert zurückgelegte Strecke, Geschwindigkeit und FMI, ein Paramater für die Direktionalität der Migration einer Zelle. Die Daten wurden mit GraphPad Prism 4 und dem one-way anova Test statistisch ausgewertet.

3.2.4 Kokultur

Die Spinalganglien (2000 Neurone mit Gliazellen) beziehungsweise Schwannsche Zellen (10^5) wurden auf eine mit Poly-D-Lysin beschichtete 6-Well Plate ausgesät und in 3 ml Neurobasal Medium mit 10 % FCS für 72 h kultiviert. Nach 72 h wurde das Medium der Spinalganglien, beziehungsweise der Schwannschen Zellen gewechselt. Zum gleichen Zeitpunkt wurden die T3M4-Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und gezählt. Es wurden 150 000 T3M4-Zellen in 2 ml Neurobasalmedium mit 10 % FCS pro Insert ausgesät und in die 6 Well-Plates jeweils auf die Spinalganglien oder die Schwannschen Zellen aufgebracht. Zu allen drei Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) wurden Triplikates für die Proteinanalyse verwendet.

3.2.5 Proteinlyse und Western Blot

Die Zellysate wurden auf Eis aufgetaut. Im Ultraschallbad wurden die Zellmembranen schonend eröffnet und die Proteine freigesetzt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der verschiedenen Zellysate wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit bestimmt, um bei der Auftrennung der Proteine im Gel eine einheitliche Proteinkonzentration der verschiedenen Zellysate erreichen zu können. Mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit lässt sich die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Komplexbildung der Proteine mit Kupfer und einem, dadurch entstehenden violetten Reaktionsprodukt mit Absorptionsmaximum bei 562 nm, bestimmen. Die Menge an violettem Reaktionsprodukt ist direkt proportional zu der Proteinmenge im Zellysat. Mit Hilfe von Standards, die bei jeder Messung mitlaufen, kann dann die Proteinmenge im Zellysat errechnet werden. In einer 96

Well-plate werden 5 µl der Zelllysate, beziehungsweise der Standards, in 200 µl des Protein Kits zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Menge an violetter Reaktionsprodukt mit Hilfe eines ELISA Readers bestimmt. Die Eichkurve der Albuminstandards wird als Referenz für die Proben genommen und durch die Linearität der Standards kann die Proteinmenge der Zelllysate errechnet werden.

Zusammensetzung der Proben

Für die Proben wurde 40 µl Volumen verwendet. Es wurden 30 µg Protein und ein 6 x LSD-Puffer für jede Probe verwendet. Um ein einheitliches Volumen zu generieren, wurde der Rest mit H₂O aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C in dem Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert und in die Taschen der Gele geladen.

Auftrennung der Proteine im Gel

Das Auftrennen der Proteine erfolgte in 7,5 % SDS-Polyacrylamidgelen mit einem 4 % igen Sammelgel in einem Biometra Elektrophorese System, welches mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel erfolgte die Auftrennung der Proteine so lange, bis das Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde nun aus den Glasplatten entnommen und das Sammelgel abgetrennt.

Immunoblot

Das Western Blotting wurde nach der Semidry-Methode durchgeführt. Hierfür wurden entsprechend nach Gelgröße Whatmanfilter vorbereitet. Eine PVDF-Membran wurde für 5 min in Ethanol inkubiert und dadurch aktiviert. In Transferrichtung wurden 6 Whatmanfilter aus dem Anodenpuffer I, 3 Whatmanfilter aus dem Anodenpuffer II, PVDF-Membran, Gel und 6 Whatmanfilter aus dem Kathodenpuffer nach dem „Sandwich-Modell“ zusammengebaut. Die Apparatur wurde mit 1 kg Gewicht beschwert um einen gleichmäßigen Transfer zu ermöglichen. Der Transfer wurde bei 0,8 mA pro cm² des Gels für 2 h durchgeführt.

Immundetektion

Die Inkubation der Membranen mit den verschiedenen Antikörpern erfolgte anhand des Schemas in Tabelle 1. Für den Primärantikörper p75 und seinen Sekundärantikörper wurde I-Milch verwendet, für alle weiteren Primärantikörper II-Milch.

Zeitintervall	Lösung	Vorgang
1h	I-Milch bzw II-Milch	Blocken
Über Nacht, 4 °C	Primär AK in I-Milch bzw. II-Milch gelöst	
3x10 min	I-Milch	Waschen
45 min	Sekundär AK in I-Milch bzw II-Milch gelöst	
3x10 min	I-Milch bzw II-Milch	Waschen
2x10 min	PBS / Tween	Waschen

Tbl. 1: Schematische Darstellung der Inkubation der Membran im Rahmen der Immundetektion.

Der Detektionsvorgang erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blotting Detection Reagents. Hierfür wurden die Membranen 5 min mit ECL bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Membranen wurden in eine Entwicklungskassette übertragen und mit Hilfe der Fuji-Röntgenfilme mit den Expositionszeiten 1, 3, 6, 9 und 15 min entwickelt.

Stripping

Durch Stripping konnten bereits benutzte Membranen mit einem anderen Primär- und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert werden. Hierfür wurden die Membranen für 10 min mit 50 mM NaOH Lösung, für 10 min mit H₂O und für 10 min mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurde mit dem Standardschema aus Tabelle 1 weiterverfahren.

Auswertung

Die Western Blots wurden eingescannt und die Stärken der Banden mit Hilfe von Image J und einem Gelanalysis PlugIn densitometrisch ausgewertet und mit Microsoft Excel und Graph Pad Prism 4 statistisch ausgewertet.

3.2.6 Statistik

Um einen Vergleich zwischen 2 Gruppen zu erzielen, wurde der Mann Whitney U Test verwendet. Bei 3 oder mehr Gruppen wurde der Kruskal Wallis Test verwendet. Um Subpopulationen zu vergleichen wurde der Dunns Multiple Comparison Test verwendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert angegeben \pm Standardabweichung [Standard error of mean (SEM)]. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Quantifizierung der Migration von Pankreaskarzinomzellen

In früheren Studien konnte beobachtet werden, dass es unter Kokultivierung von PCCs mit DRGs in einem 3-D Migrationsassay zu einer spezifischen morphologischen Veränderung der PCCs in Gegenwart der Neurone kommt (Ceyhan, et al., 2008, p. 443). Allerdings konnte keine quantitative Aussage über das Migrationsverhalten einzelner PCCs gemacht werden. Auf Grund dessen war das erste Ziel dieser Arbeit die Migration einzelner Zellen zu erfassen und quantitativ auszuwerten. Für diesen Zweck wurden die Zellen an den einzelnen Fronten des 3-D Migrationsassays mit Hilfe eines digitalen time lapse Mikroskops alle 5 min für 12 h aufgezeichnet. Einzelne Zellen wurden später mit einem manuellen Tracking Programm der Firma IBIDI in Image J Bild für Bild nachverfolgt. Mit Hilfe dieses Programms konnten nun die Geschwindigkeit, die akkumulierte und euklidisch (linear) zurückgelegte Strecke und die zielgerichtete Migration („Forward migration index“/FMI) der einzelnen Zellen erfasst werden. Die Geschwindigkeit der Zellen wurde berechnet aus der akkumuliert zurückgelegten Strecke, welche geteilt wurde durch die Zeit die gebraucht wurde, um die Strecke zurückzulegen. Die akkumuliert zurückgelegte Strecke beschreibt diejenige Strecke, welche die Zelle tatsächlich zurückgelegt hat. Im Gegensatz dazu wird durch die euklidisch zurückgelegte Strecke die Luftlinie zwischen Anfangspunkt und Endpunkt der jeweiligen Zelle dargestellt. Der Forward Migration Index (FMI) ist ein Parameter für die zielgerichtete Migration einer Zelle. Er setzt sich aus der euklidisch zurückgelegten Strecke und ihrem Verhältnis zur x- beziehungsweise y-Achse zusammen. Je zielgerichteter eine Zelle migriert desto mehr gleicht sich ihre euklidische Strecke der x- beziehungsweise y-Achse an. Ein FMI=1 entspricht einer parallelen Linie zu x-Achse und damit einer direkten Migration. Dies entspricht einer zielgerichteten Migration. Je kleiner der FMI wird ($0 < \text{FMI} < 1$), desto ungerichteter ist die Migration. Wird der FMI negativ bedeutet das, dass sich die Zellen in die vom Ziel entgegengesetzte Richtung bewegen. An jeder Front wurden mindestens 30 Zellen über den gesamten Zeitraum von 12 h beobachtet.

4.2 Pankreaskarzinomzellen zeigen eine spezifischere Migration zu Neuronen als zu Gliazellen

Man nimmt an, dass die neurale Invasion ein Resultat aus einer charakteristischen Anziehung von PCCs zu Nerven ist (Ceyhan, et al., 2008, pp. 444-445). Da Nerven aber aus Axonen (neurale Strukturen) und Gliazellen (Schwannsche Zellen) bestehen, bleibt die Frage offen, welche Struktur die Anziehung auf die Karzinomzellen ausübt, da die Schwannschen Zellen eine Barriere für die Karzinomzellen auf ihrem Weg der neuralen Invasion darstellen. Weiterhin gehen infolge einer Nervenschädigung Schwannsche Zellen in einen aktiven Zustand über. Solch eine Nervenschädigung wird auch im Pankreaskarzinom beobachtet (Bockman, et al., 1994, pp. 221-222). Aus diesen Gründen stellt sich die Frage, ob und wie die Schwannschen Zellen zur neuralen Pankreaskarzinomzellinvasion beitragen. Hierfür wurde der 3-D Migrationsassay wie folgend durchgeführt:

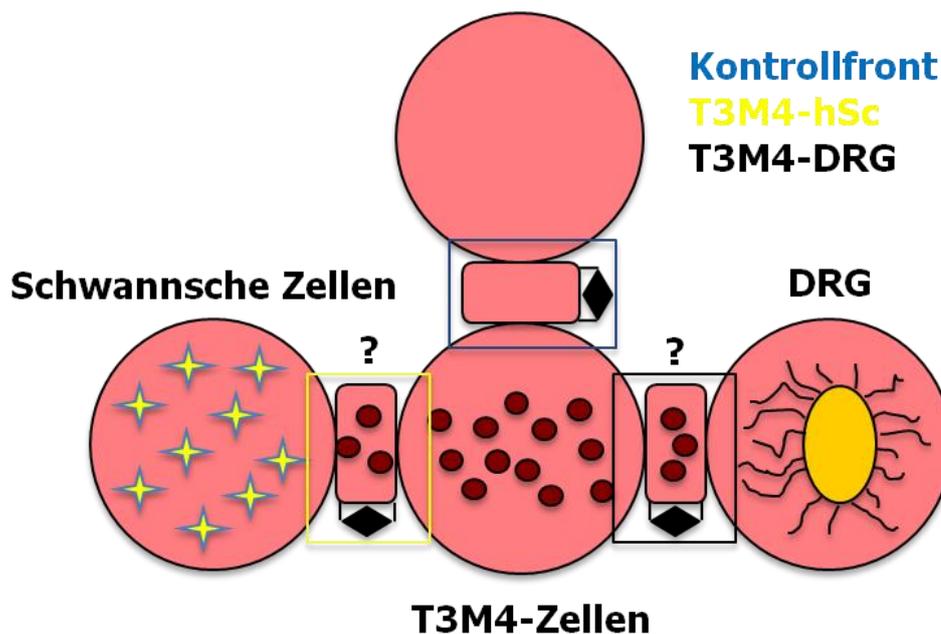


Abb. 1:

Mittig befinden sich T3M4 PCCs, welche mit ECM-Gel Brücken zu Schwannschen Zellen nach links, DRGs nach rechts und zu einem leeren ECM-Gel verbunden sind.

Die Ereignisse an allen drei Fronten der PCCs wurden über einen Zeitraum von 12 h mit Hilfe der digitalen time lapse Mikroskopie aufgezeichnet.

Die Übersichtsbilder der Fronten zeigen nach 60h beziehungsweise 72h deutliche Unterschiede des Migrationsverhaltens der PCCs gegenüber Neuronen im Vergleich zum Negativ-Kontrolle. An der Kontrollfront sieht man nur vereinzelte Zellen, die unspezifisch in alle Richtungen migrieren. Hingegen zeigt sich bereits an den Bildern der Migrationsfront Richtung DRGs eine massive Zunahme der Zellzahl der T3M4 PCCs.

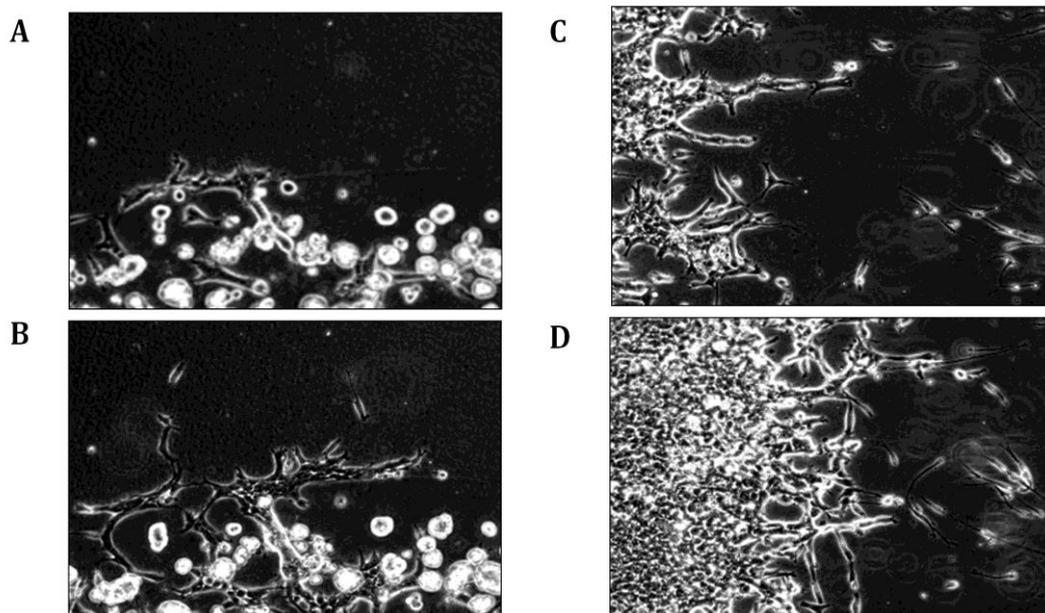


Abb. 2:

Die Kontrollfront der T3M4 PCCs nach 60h (A) und nach 72h (B). Die Migrationsfront der T3M4 PCCs Richtung DRGs nach 60 h (C) und nach 72h (D).

Die quantitative Analyse dieser Experimente ergab, dass die kokultivierten T3M4 PCCs eine signifikant spezifischere Migration zu den DRGs (Abb. 3A: „T3M4-DRG“: 0.27 ± 0.02) als zu dem leeren Gel/negativ-Kontrolle („T3M4-empty“: -0.10 ± 0.03 ; $p < 0,001$) und den Schwannschen Zellen („T3M4-hSc“: 0.05 ± 0.03 ; $p < 0,001$) zeigen. Ebenfalls legten die T3M4 PCCs eine signifikant längere euklidische Strecke in Richtung der DRGs zurück (Abb. 3B: „T3M4-DRG“: $85.9 \mu\text{m} \pm 5.9 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den anderen beiden Fronten („T3M4-hSc“: $42.2 \mu\text{m} \pm 4.3 \mu\text{m}$, „T3M4-empty“: $38.8 \mu\text{m} \pm 4.7 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Genauso legten sie

eine signifikant längere akkumulierte Strecke in Richtung Neurone zurück (Abb. 3C: „T3M4-DRG“: $231.6 \mu\text{m} \pm 10.3 \mu\text{m}$, „T3M4-hSc“: $126.5 \mu\text{m} \pm 10.4 \mu\text{m}$, „T3M4-empty“: $102.9 \mu\text{m} \pm 8.1 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Weiterhin migrierten sie mit einer signifikant höheren Geschwindigkeit in Richtung der DRGs (Abb. 3D: „T3M4-DRG“: $0.31 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$, „T3M4-hSc“: $0.17 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$, „T3M4-empty“: $0.15 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$; $p < 0,001$).

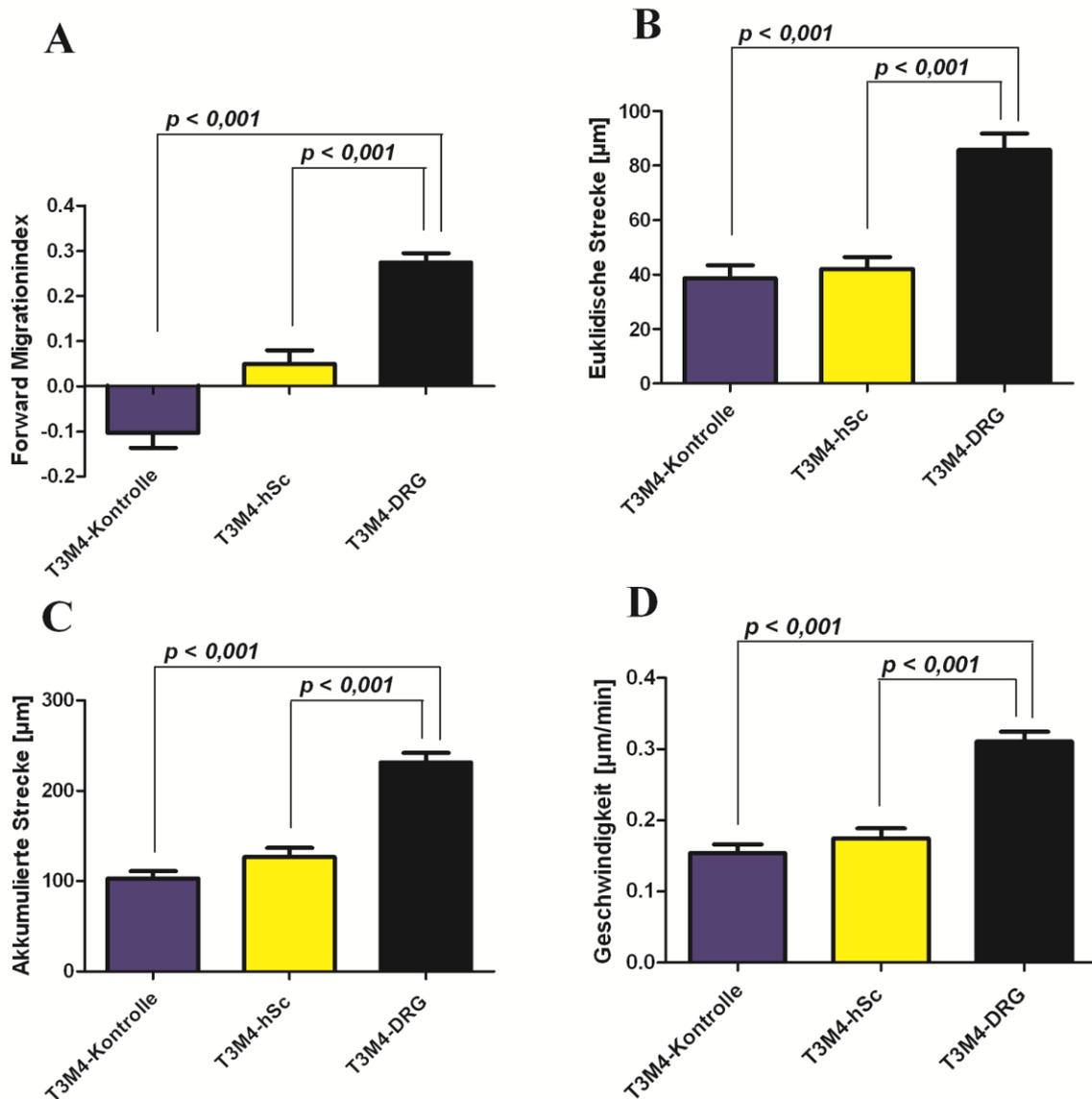


Abb. 3:

Quantitative Analyse der T3M4 PCCs im Hinblick auf ihre gerichtete Migration (A), ihre zurückgelegte euklidische Strecke (B), die zurückgelegte akkumulierte Strecke (C), die Geschwindigkeit der Migration (D).

Um nicht nur Aussagen über Einzelzellmigration treffen zu können, wurde in einem nächsten Schritt die Fläche der Karzinomzellmasse bestimmt, welche über den Verlauf von 12 h in Richtung der DRGs, Schwannschen Zellen und dem leeren Gel durch Migration der Zellen entstanden ist. Hierbei konnte eine signifikante Massenzunahme der PCCs an der Front Richtung DRGs festgestellt werden (Abb. 4C: „T3M4-DRG“: 6.05 % ± 0.15 %) im Vergleich zu den Fronten Richtung Schwannschen Zellen („T3M4-hSc“: 1.61 % ± 0.32%; $p < 0,01$) und dem leeren Gel („T3M4-empty“: 1.77 % ± 0.34 %; $p < 0,01$).

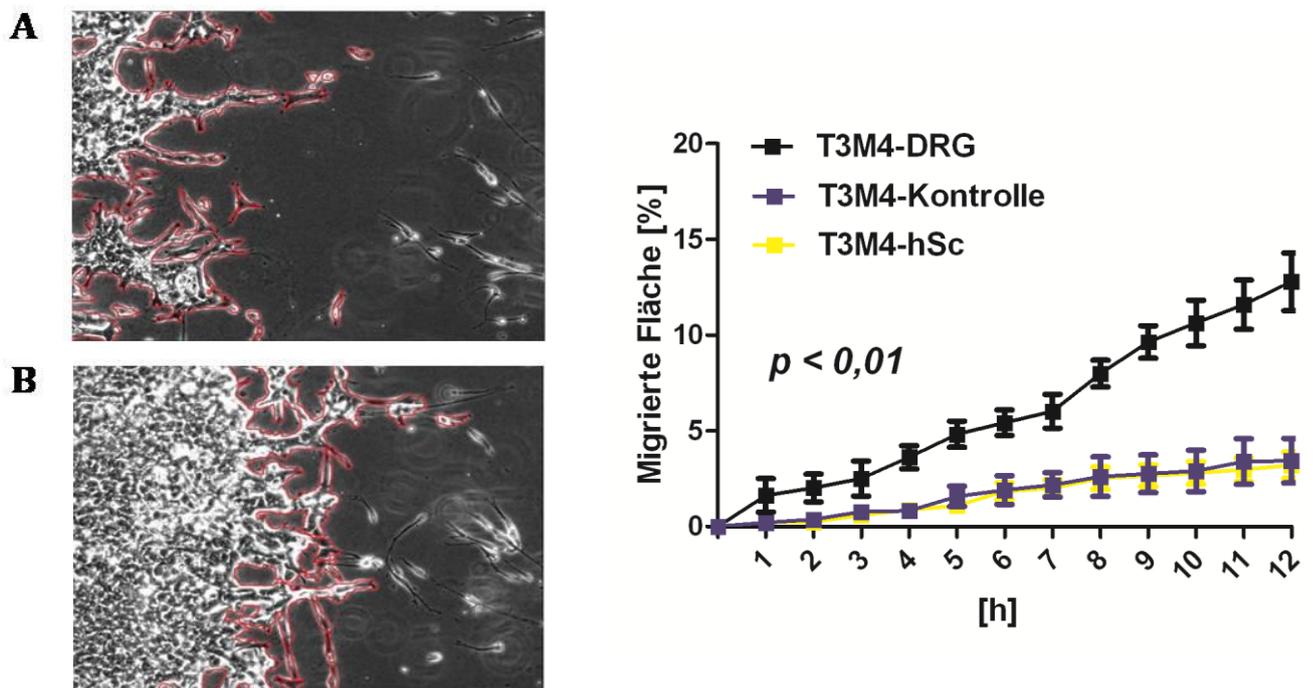


Abb. 4:

Migrierte Masse der Tumorzellen nach 60h (A) und nach 72h (B) in Richtung DRGs. Analyse der migrierten Tumormasse an der Migrationsfront, prozentual zur Gesamtfläche, im Vergleich zu den Fronten Richtung Schwannschen Zellen und dem leeren Gel (C).

4.3 Die Migration der Schwannschen Zellen zum Karzinom ist langsamer aber zielgerichtet

Bei näherer Betrachtung der Gliazellen unter Kokultivierung mit PCCs und DRGs zeigte sich ein unerwartetes Verhalten der Schwannschen Zellen. Während sich die PCCs gerade erst im Anfangsstadium der Migration befanden, hatten sich die Schwannschen Zellen schon zu einer pfeilförmigen Migrationsfront umgruppiert. Sie erreichten die T3M4 Zellen zeitlich gesehen lange bevor die Tumorzellen die DRGs erreichen konnten.

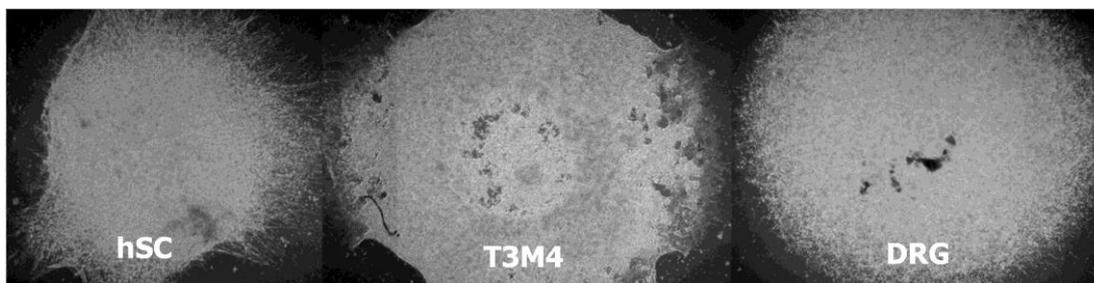


Abb. 5:

Triple-Setting mit Schwannschen Zellen, T3M4 PCCs und DRGs nach 72h (Liebl, et al., 2013, p. 55).

In einem nächsten Schritt wurde daher die Migration der Schwannschen Zellen Richtung T3M4 PCCs und die Migration der Karzinomzellen Richtung Glia quantitativ erfasst. Schwannsche Zellen an der Migrationsfront Richtung PCCs legten eine signifikant geringere akkumulierte Distanz (Abb. 6, C: „hSc-T3M4“: $121.1 \mu\text{m} \pm 7.0 \mu\text{m}$, „T3M4-hSc“: $168.2 \mu\text{m} \pm 5.5 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) mit einer signifikant geringeren Geschwindigkeit (Abb. 6, D: „hSc-T3M4“: $0.16 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$, „T3M4-hSc“: $0.22 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$; $p < 0,001$) zurück, als die ihnen gegenüberliegenden PCCs, während sich die Migrationsfronten und die Kontrollfronten sowohl der Schwannschen Zellen als auch der T3M4 PCCs in diesen Parametern nicht unterschieden (Abb. 6, C: „hSc-empty“: $128.8 \mu\text{m} \pm 6.1 \mu\text{m}$, „T3M4-empty“: $172.1 \mu\text{m} \pm 9 \mu\text{m}$ und Abb. 6, D: „hSc-empty“: $0.18 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$, „T3M4-empty“: $0.24 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$). Jedoch migrierten die Schwannschen Zellen an der Migrationsfront signifikant zielgerichteter zu den PCCs im Vergleich zur ihrer Kontrollfront und den PCCs (Abb. 6, A: „hSc-T3M4“: 0.55 ± 0.04 , „hSc-empty“: 0.17 ± 0.05 , „T3M4-hSc“: 0.15 ± 0.02 ; $p < 0,001$) und konnten somit eine signifikant längere

euklidische Strecke zu den Karzinomzellen zurücklegen, als diese zu ihnen (Abb. 6, B: „hSc-T3M4“: $81.4\mu\text{m} \pm 6\mu\text{m}$, „T3M4-hSc“: $52.6\mu\text{m} \pm 3.3\mu\text{m}$; $p < 0,05$).

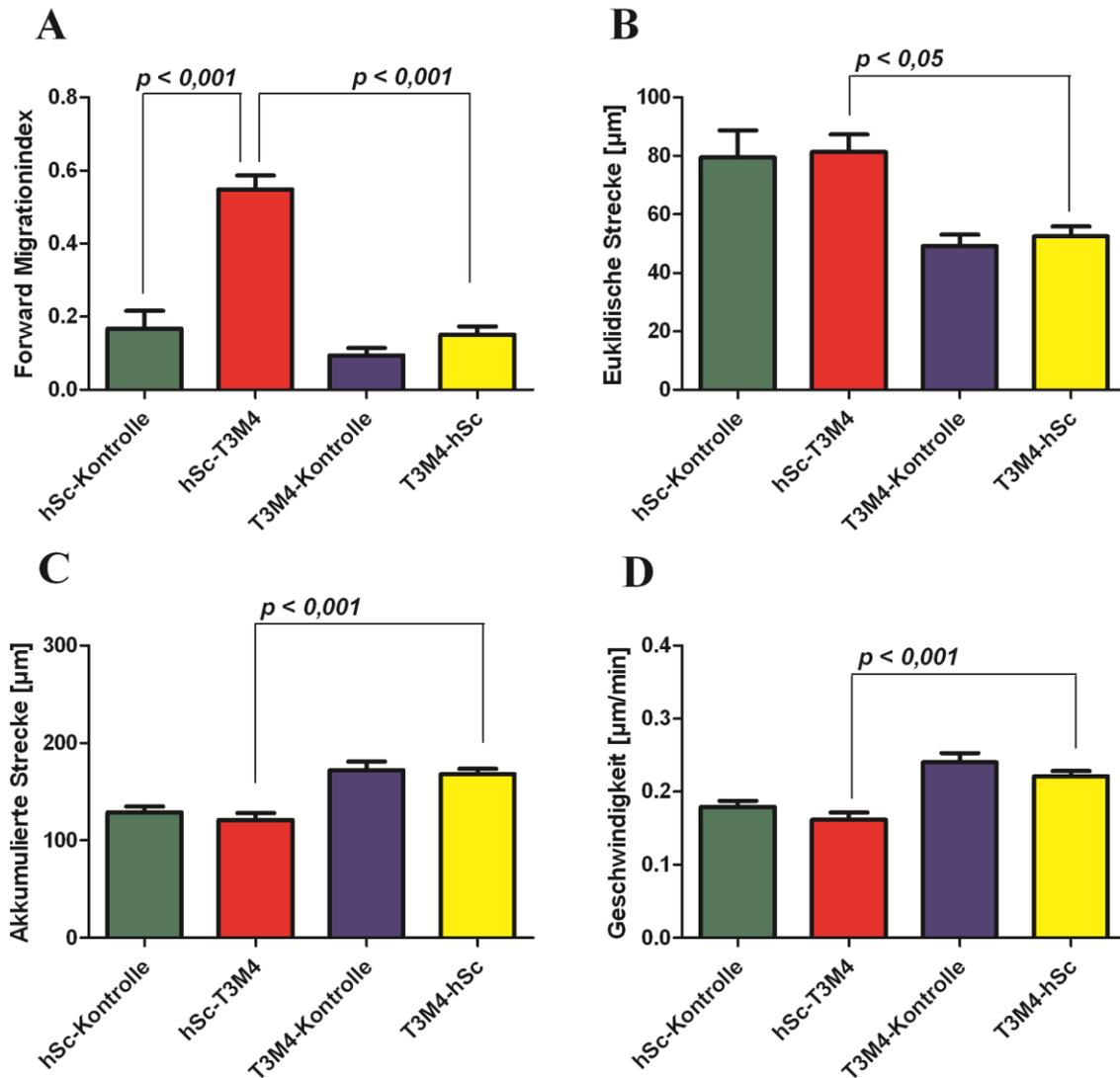


Abb. 6:

Quantitative Analyse der Schwannschen Zellen und der T3M4 PCCs im Hinblick auf die zielgerichtete Migration, FMI (A), zurückgelegte euklidische Strecke (B), zurückgelegte akkumulierte Distanz (C) und die Geschwindigkeit der Migration (D).

Im direkten Vergleich des FMIs der Schwannschen Zellen Richtung PCCs und des FMIs der PCCs Richtung DRGs stellte sich heraus, dass der FMI der Schwannschen Zellen Richtung

Karzinomzellen signifikant größer war als der FMI der PCCs Richtung DRGs (Abb. 7: „T3M4-DRG“: 0.27 ± 0.02 , „hSc-T3M4“: 0.55 ± 0.04 ; $p < 0,001$).

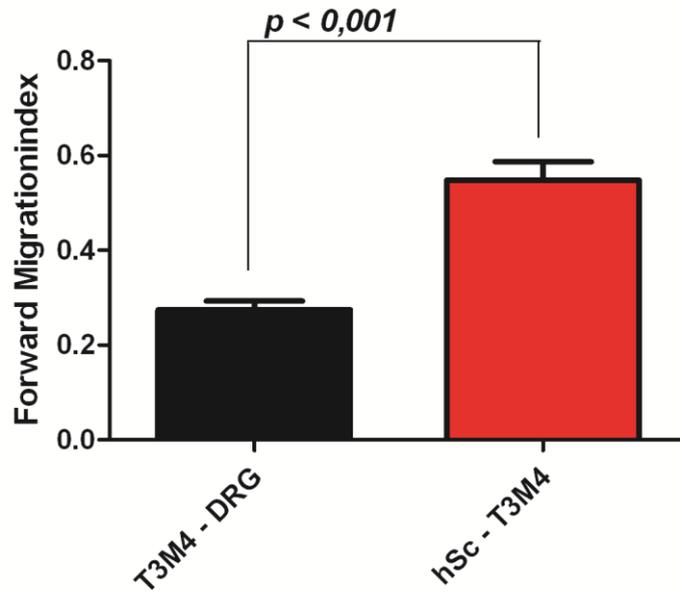


Abb. 7:

Vergleich der FMIs der Schwannschen Zellen Richtung PCCs und der PCCs Richtung DRGs.

4.4 Die Migration der Schwannschen Zellen zu den Pankreaskarzinomzellen ist spezifischer als zu anderen Tumorentitäten

Die Ergebnisse der spezifischen Migration der Schwannschen Zellen in Richtung Pankreaskarzinomzellen ließen die Frage aufkommen, ob Karzinomzellen anderer Entität eine gleichartige Anziehungskraft auf die Schwannschen Zellen auslösen, oder ob das Phänomen der zielgerichteten Migration alleine auf die Pankreaskarzinomzellen zurückzuführen ist. Aufgrund dessen kombinierten wir in einem 3-D Migrationsassay Schwannsche Zellen mit T3M4-Pankreaskarzinomzellen und gleichzeitig mit einer Kolonkarzinomzelllinie SW 707. Somit konnte das Migrationsverhalten der Schwannschen Zellen einerseits in Richtung Pankreaskarzinomzellen, andererseits in Richtung Kolonkarzinomzellen aufgezeichnet und verglichen werden.

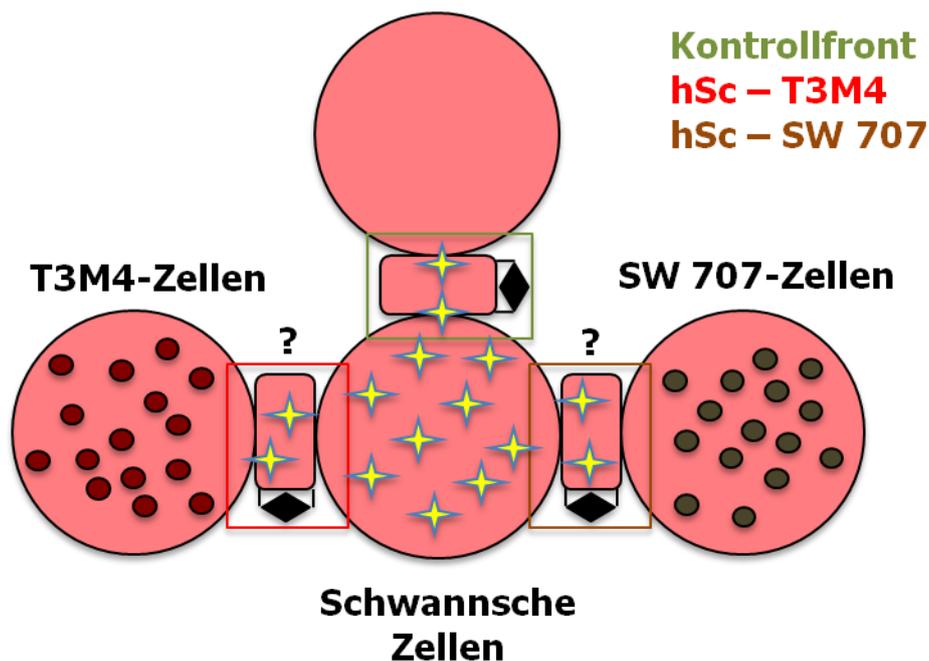


Abb. 8:

Mittig befinden sich Schwannsche Zellen, welche mit ECM-Gel Brücken zu T3M4-Pankreaskarzinomzellen nach links, SW 707-Kolonkarzinomzellen nach rechts und zu einem leeren ECM-Gel verbunden sind.

Die quantitative Analyse des Migrationsverhaltens der Schwannschen Zellen ergab einen signifikant höheren Forward Migrationindex der Schwannschen Zellen in Richtung beider Karzinomzellentitäten im Vergleich zur Kontrollfront (Abb. 9, A: „hSc-Kontrolle“: 0.23 ± 0.04 , „hSc-T3M4“: 0.77 ± 0.04 , $p < 0,001$; „hSc-SW 707“: 0.50 ± 0.04 ; $p < 0,01$). Es zeigte sich weiterhin, dass die Migration der Schwannschen Zellen signifikant zielgerichteter war in Richtung T3M4-Zellen als in Richtung Kolonkarzinomzellen ($p < 0,001$). Die durch die Schwannschen Zellen zurückgelegte direkte Strecke war signifikant länger in Richtung T3M4 als im Vergleich zu der Front Richtung der SW 707-Zellen ($p < 0,01$). Im Vergleich zur Kontrollfront war an beiden Fronten die euklidische Strecke signifikant länger (Abb. 9, B: „hSc-Kontrolle“: $66.18\mu\text{m} \pm 3.62\mu\text{m}$, „hSc-T3M4“: $117.1\mu\text{m} \pm 5.77\mu\text{m}$, $p < 0,001$; „hSc-SW 707“: $83.82\mu\text{m} \pm 3.69\mu\text{m}$, $p < 0,05$). Die akkumulierte Strecke, die die Schwannschen Zellen zurücklegten unterschied sich statistisch nicht an den Fronten in Richtung Karzinomzellen und in Richtung Kontrollfront (Abb. 9, C: „hSc-Kontrolle“: $118.0\mu\text{m} \pm 5.26\mu\text{m}$, „hSc-T3M4“: $139.8\mu\text{m} \pm 5.4\mu\text{m}$, „hSc-SW 707“: $128.8\mu\text{m} \pm 4.86\mu\text{m}$). Ebenfalls zeigte die gemessene Geschwindigkeit der Schwannschen Zellen an allen drei Fronten statistisch gesehen keine Unterschiede (Abb. 9, D: „hSc-Kontrolle“: $0.08\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.004\mu\text{m}/\text{min}$, „hSc-T3M4“: $0.1\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.004\mu\text{m}/\text{min}$, „hSc-SW 707“: $0.09\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.003\mu\text{m}/\text{min}$).

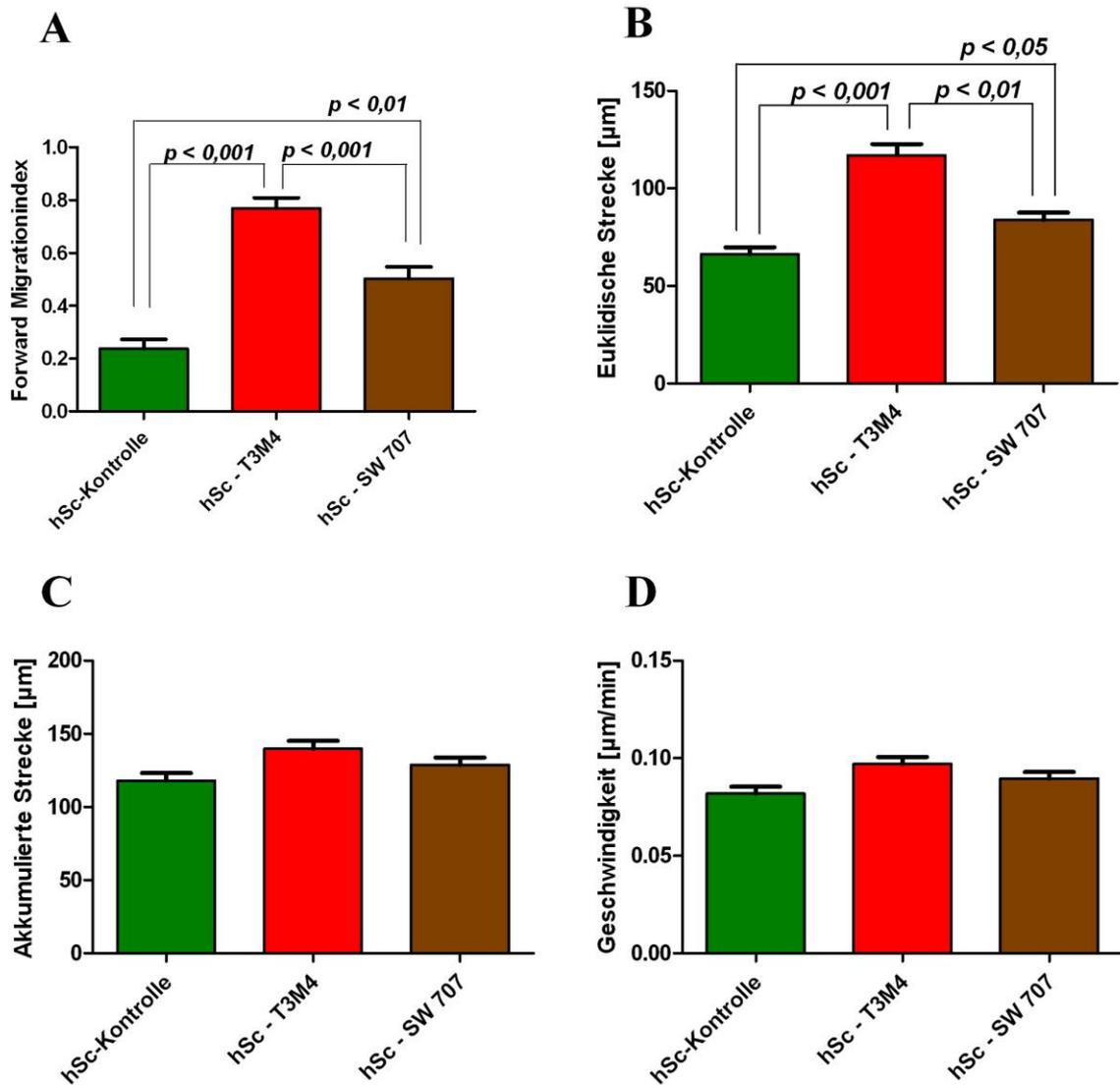


Abb. 9:

Quantitative Analyse der Schwannschen Zellen im Hinblick auf die zielgerichtete Migration, FMI (A), zurückgelegte euklidische Strecke (B), zurückgelegte akkumulierte Distanz (C) und die Geschwindigkeit der Migration (D) sowohl in Richtung der Pankreaskarzinomzelllinie T3M4 als auch in Richtung der Kolonkarzinomzelllinie SW 707.

4.5 Die neuron-gerichtete Migration ist bei Pankreaskarzinomzellen ausgeprägter als bei Kolonkarzinomzellen

Im Pankreaskarzinom findet sich in bis zu 100 % aller histopathologischen Schnitte eine Karzinomzellinvasion der intrapankreatischen Nerven (Batsakis, 1985, p. 426). In anderen intestinalen Tumoren ist die neurale Invasion dagegen kaum auffindbar: Beispielsweise zeigt im Kolonkarzinom die neurale Invasion nur eine Prävalenz von ca. 20 % (Liu & Lu, 2002, p. 470). In einem nächsten Schritt wurde auf Grund dessen die Fragestellung bearbeitet, ob die in-vitro beobachtete, zielgerichtete Migration der Pankreaskarzinomzellen in Richtung Neurone spezifisch für das Pankreaskarzinom ist oder auch in anderen Tumorentitäten auffindbar ist, welche in-vivo viel seltener neurale Invasion aufweisen. Hierfür wurde die Pankreaskarzinomzelllinie T3M4 durch zwei unterschiedliche Kolonkarzinomzelllinien ersetzt: Die Zelllinie HCT-116, die sich durch ein geringes Migrationspotenzial auszeichnet und die Zelllinie HT-29, welche ein hohes Migrationspotenzial besitzt.

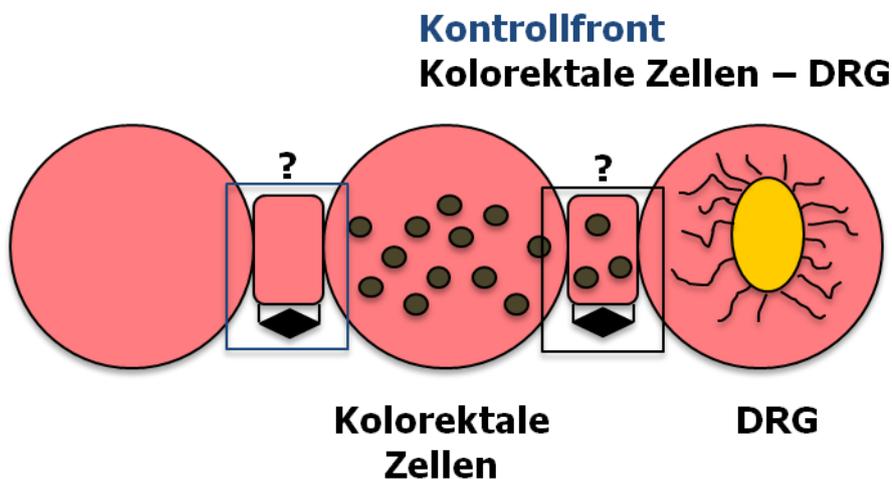


Abb. 10:

Kolorektale Zelllinien HCT-116 und HT-29 wurden mit DRGs kokultiviert. Als Kontrolle wurde ein leeres Gel auf dem gegenüberliegenden Pol der CCs verwendet.

Bereits die Übersichtsbilder der 3-D Migrationsassays nach 72 h zeigen, dass sich weder bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 noch bei der durch starkes Migrationspotenzial gekennzeichneten Zelllinie HT-29 Unterschiede an der Migrationsfront Richtung Spinalganglien und Kontrollfront zeigen (Abb. 11 und 12).

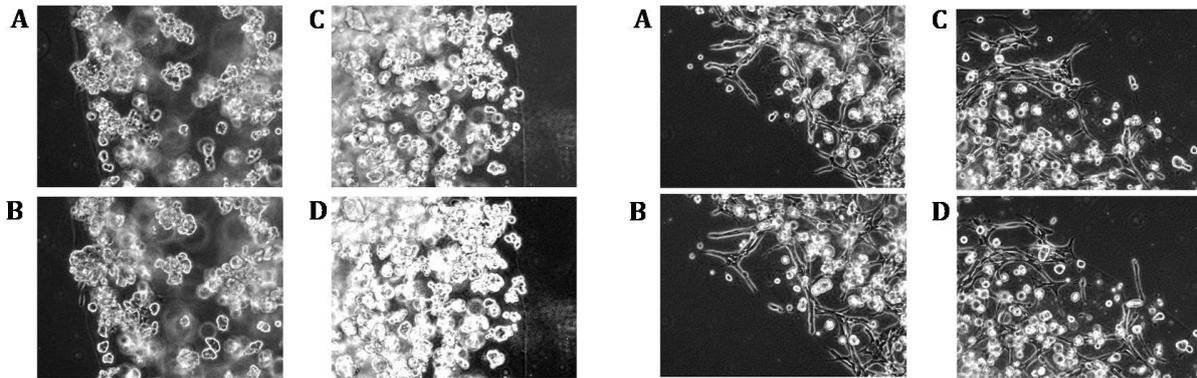


Abb. 11:

Die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 an ihrer Kontrollfront nach 60 h (A) und nach 72 h (B). An der Migrationsfront Richtung DRGs nach 60 h (C) und nach 72 h (D) (Liebl, et al., 2013, p. 53).

Abb. 12:

Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 an der Kontrollfront nach 60 h (A) beziehungsweise nach 72 h (B) und an der Migrationsfront Richtung Neurone nach 60 h (C) und nach 72 h (D) (Liebl, et al., 2013, p. 55).

Die kolorektale Zelllinie HCT-116 zeigte an der Migrationsfront im Vergleich zur Kontrollfront keine signifikant spezifischere Migration in Richtung Neurone (Abb. 13, A: „HCT-116-DRG“: 0.027 ± 0.02 , „HCT-116-empty“: 0.016 ± 0.018). Es zeigte sich eher eine Tendenz der Zellen an der Migrationsfront in die entgegengesetzte Richtung, Richtung leeres Gel zu migrieren, was am negativen FMI „HCT-116-DRG“ deutlich wird. Weiterhin legten die Zellen an der Migrationsfront keine signifikant längere direkte Strecke zurück (Abb. 13, B: „HCT-116-DRG“: $9.5\mu\text{m} \pm 0.8\mu\text{m}$, „HCT-116-empty“: $10.7\mu\text{m} \pm 0.8\mu\text{m}$). Auch in der akkumuliert zurückgelegten Strecke unterschieden sich die beiden Fronten nicht signifikant (Abb. 13, C: „HCT-116-DRG“: $36.3\mu\text{m} \pm 1.9\mu\text{m}$, „HCT-116-empty“: $44.2\mu\text{m} \pm 2.0\mu\text{m}$). Ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit der Migration der Zellen an der Migrationsfront und der Kontrollfront (Abb. 13, D: „HCT-116-DRG“: $0.05\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.003\mu\text{m}/\text{min}$, „HCT-116-Kontrolle“: $0.06\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.003\mu\text{m}/\text{min}$).

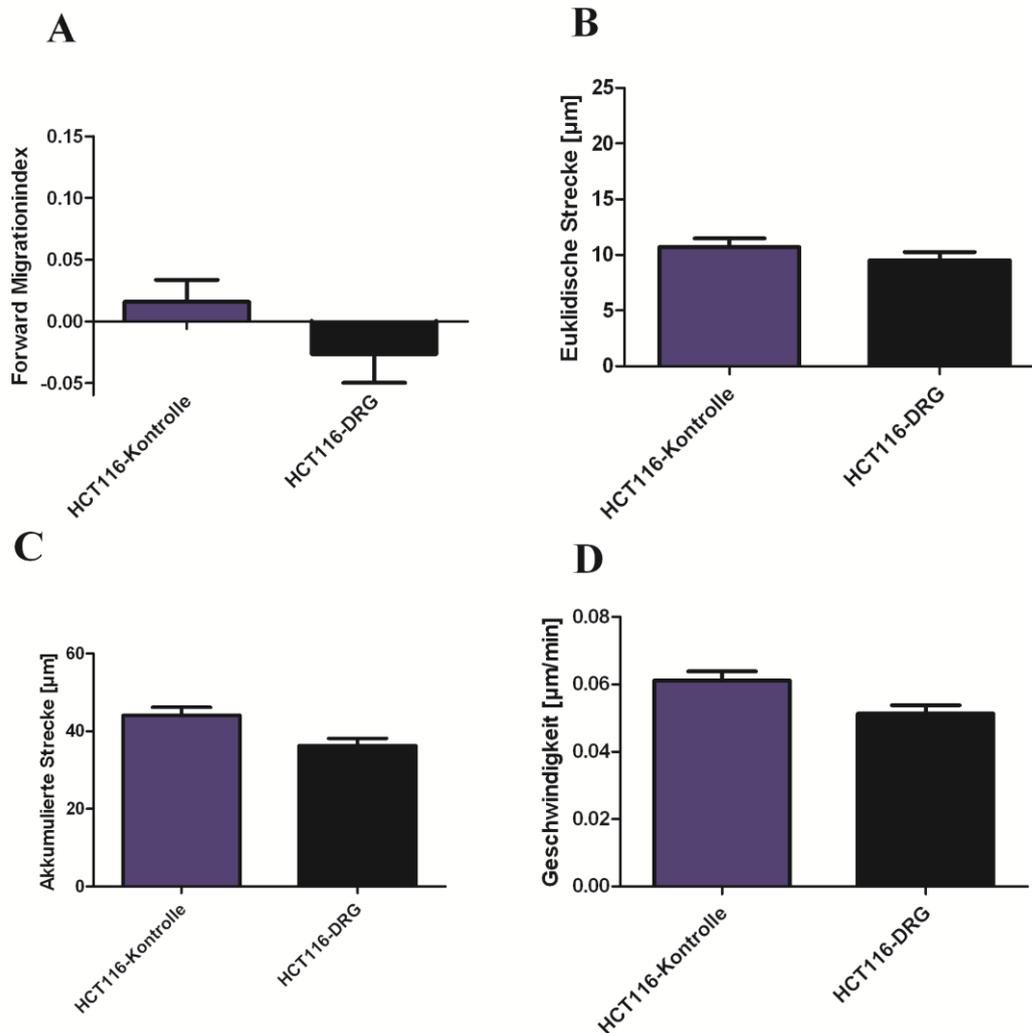


Abb. 13:

Quantitative Analyse der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116. Die spezifisch gerichtete Migration (A), die euklidische zurückgelegte Strecke (B) und die akkumuliert zurückgelegte Strecke (C) und die Geschwindigkeit der Migration (D) jeweils der Migrationsfront Richtung DRG und der Kontrollfront Richtung leeres Gel.

Die Zelllinie HT-29 zeigte erstaunlicherweise eine zielgerichteter Migration an der Kontrollfront im Vergleich zur Migrationsfront, welche aber keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 14, A: „HT-29-DRG“: 0.13 ± 0.03 , „HT-29-Kontrolle“: 0.08 ± 0.04). Die direkte zurückgelegte Strecke zeigte in Richtung DRGs im Vergleich zur Kontrollfront keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14, B: „HT-29-DRG“: $20.0\mu\text{m} \pm 1.5\mu\text{m}$, „HT-29-

Kontrolle“: $15.5\mu\text{m} \pm 1.3\mu\text{m}$). Die akkumulierte Strecke, die die Zellen migrierten zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede an beiden Fronten (Abb. 14, C: „HT-29-DRG“: $47.4\mu\text{m} \pm 2.4\mu\text{m}$, „HT-29-Kontrolle“: $42.0\mu\text{m} \pm 2.1\mu\text{m}$). Auch die Geschwindigkeit der Migration der Zellen an den beiden Fronten zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 14, D: „HT-29-DRG“: $0.07\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.003\mu\text{m}/\text{min}$, „HT-29-Kontrolle“: $0.06\mu\text{m}/\text{min} \pm 0.003\mu\text{m}/\text{min}$).

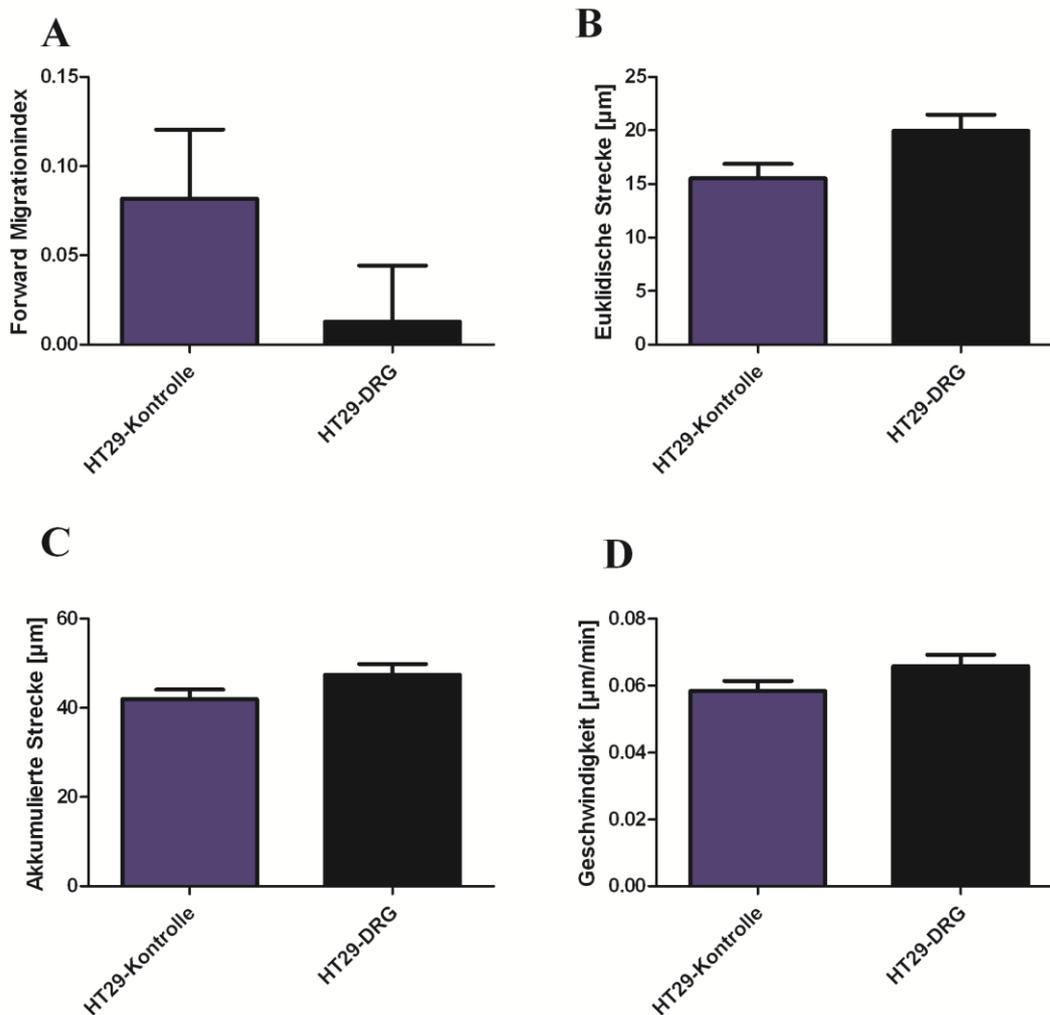


Abb. 14:

Analyse des Migrationsverhaltens der kolorektalen Zelllinie HT-29: Spezifische Migration (A), direkte zurückgelegte Strecke (B), akkumuliert zurückgelegte Distanz (C) und die Geschwindigkeit der Migration (D) an der Migrationsfront und der Kontrollfront.

Die Analyse der migrierten Zellmasse ergab bei der Zelllinie HCT-116 keinen statistisch signifikanten Unterschied an der Migrationsfront im Vergleich zur Kontrollfront (Abb. 15: „HCT-DRG“: $0.25\% \pm 0.05\%$, „HCT-116-Kontrolle“: $0.18\% \pm 0.04\%$).

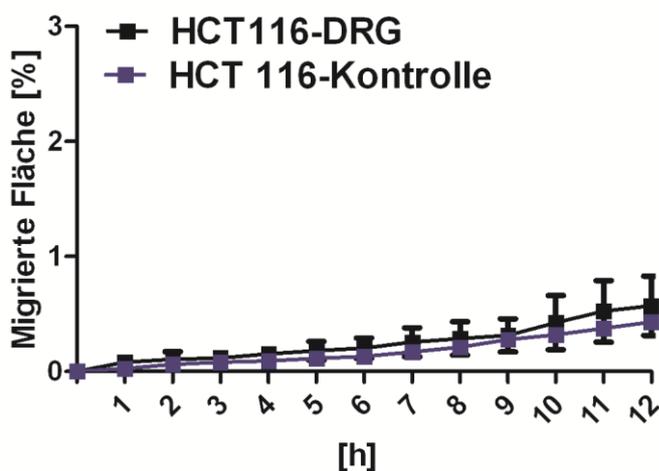


Abb. 15: Quantitative Analyse der migrierten Tumormasse der Zelllinie HCT-116 in Richtung Neurone („HCT-116-DRG“) und in Richtung des leeren Gels (HCT-116-Kontrolle).

Die Auswertung der gewanderten Zellmasse der Zelllinie HT 29 ergab an der Front Richtung leeres Gel eine signifikante relative Zunahme der Karzinomzellmasse im Vergleich zur Migrationsfront in Richtung der Neurone (Abb. 16: „HT-29-DRG“: $0.19\% \pm 0.03\%$, „HT-29-Kontrolle“: $0.54\% \pm 0.07\%$; $p < 0,01$).

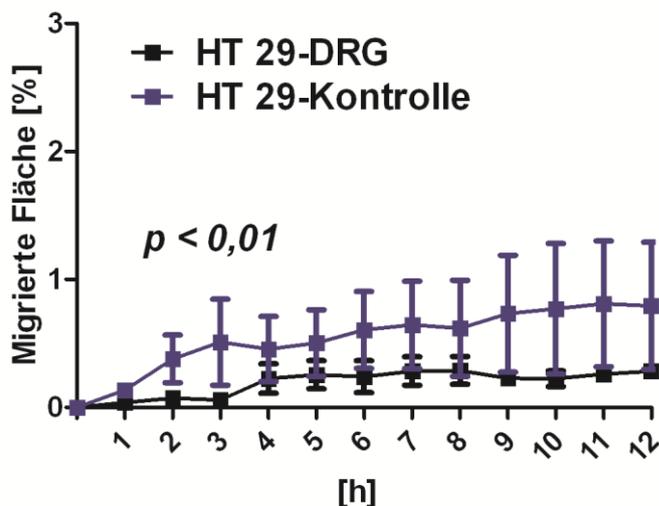


Abb. 16: Auswertung der Zunahme der Zellmasse der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 an beiden Fronten, im Vergleich zur Gesamtfläche des Bildes.

4.6 Die Rolle des NGF und seiner Rezeptoren p75 und TrkA in der neuronalen Invasion

Chemokine sind chemotaktisch wirksame Zytokine, welche durch Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors diverse intrazelluläre Signalwege aktivieren. Diese können wiederum im weiteren Verlauf eine Chemotaxis der Zellen bedingen (Liebl, et al., 2013, p. 55). Es ist weiterhin bekannt, dass auch neurotrophe Faktoren wie beispielsweise NGF, ein Zytokin der Neurotrophin-Familie, chemoattraktives Potenzial besitzen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen, welche mit einem p75 exprimierenden Vektor transfiziert wurden, ein höheres Migrationspotenzial zu NGF aufwiesen als Kontrollzellen. In derselben Studie konnte nachgewiesen werden, dass in histopathologischen Schnitten die p75-Expression positiv mit dem Grad der neuronalen Invasion korrelierte (Allen, Crown, & Handel, 2007).

Nachfolgend wurde infolgedessen die Expression von NGF und seiner Rezeptoren p75 und TrkA in T3M4 PCCs, Schwannschen Zellen und DRGs untersucht. Die Analyse der Expression von NGF wurde hierbei im 3-D Migrationassay durchgeführt, während p75 und TrkA in den drei Zelltypen T3M4 PCCs, Schwannsche Zellen und DRGs unter Kokulturbedingungen untersucht wurden.

4.6.1 NGF-Expression im 3-D Migrationsassay mit T3M4 PCCs, hSc und DRGs

Im 3-D Migrationsassay konnte kein signifikanter Anstieg der NGF-Expression in T3M4 Zellen nachgewiesen werden, welche entweder nur mit Schwannschen Zellen oder mit Schwannschen Zellen und DRGs kokultiviert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 17: „T3M4 Kontrolle“: 0.16 ± 0.03 , „T3M4+hSc“: 0.26 ± 0.09 , „T3M4+hSc+DRG“: 0.28 ± 0.04). Auch in den Schwannschen Zellen konnte kein signifikanter Anstieg der NGF Konzentration festgestellt werden, welche entweder nur mit T3M4 Zellen oder mit T3M4 Zellen und DRGs kokultiviert wurden („hSc Kontrolle“: 0.87 ± 0.08 , „hSc+T3M4“: 1.16 ± 0.2 , „hSc+T3M4+DRG“: 1.1 ± 0.15).

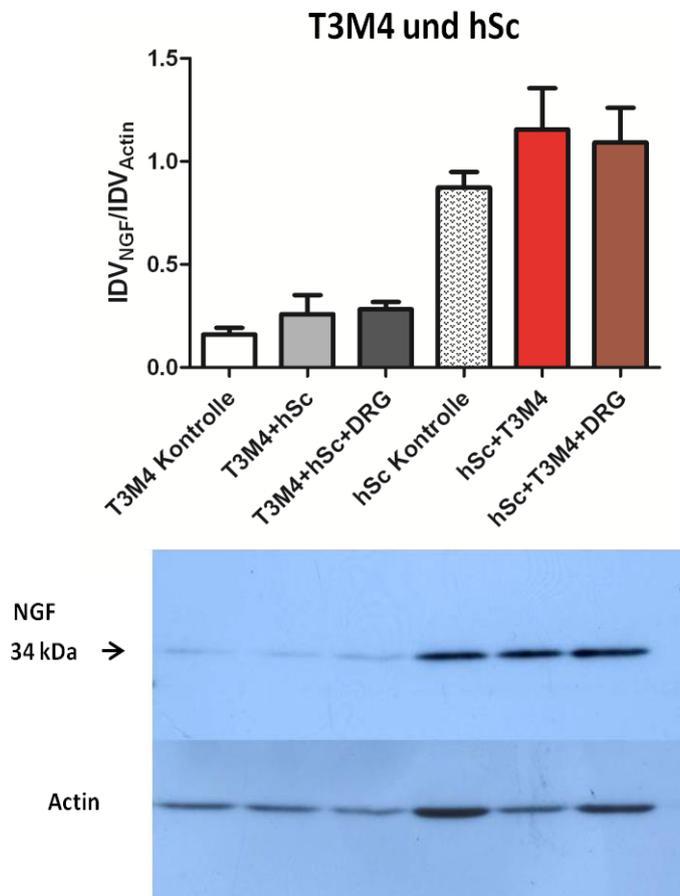


Abb. 17:

Nachweis der NGF-Expression via Western Blotting in T3M4 PCCs und hSc im 3-D Migrationassay nach 72 h. T3M4 PCCs und hSc wurden entweder alleine als Kontrolle oder mit jeweils hSc oder T3M4 PCCs und DRGs kokultiviert. Die NGF-Expression in den Zellen wurde im Vergleich zur Actin-Expression quantitativ analysiert.

4.6.2 TrkA und p75-Expression im Rahmen der Kokultur von T3M4 PCCs mit DRGs

Sowohl nach 24, 48 als auch nach 72 h konnte in den Pankreaskarzinomzellen in Kokultur mit Neuronen ein leichter Anstieg der Konzentration des NGF Rezeptors p75 mit dem Western Blotting nachgewiesen werden, welcher aber keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 18, A: „T3M4 Kontrolle“: 0.05 ± 0.01 , „T3M4 24h“: 0.88 ± 0.06 , „T3M4(+DRG) 24h“: 1.4 ± 0.03 , „T3M4 48h“: 1.0 ± 0.02 , „T3M4 (+DRG) 48h“: 1.4 ± 0.02 , „T3M4 72h“: 0.9 ± 0.05 , „T3M4 (+DRG) 72h“: 1.3 ± 0.25). Die Konzentration des Rezeptors TrkA nahm zwar über den Zeitraum von 24 bis 72 h in den T3M4 PCCs der Kontrollgruppe zu, jedoch konnte kein signifikanter Anstieg, im Vergleich zur Kontrolle zu diesen Zeitpunkten in den kokultivierten PCCs mit DRGs festgestellt werden (Abb. 18, B: „T3M4 Kontrolle“: 1.3 ± 0.5 , „T3M4 24h“: 1.1 ± 0.4 , „T3M4(+DRG) 24h“: 1.0 ± 0.4 , „T3M4 48h“: 1.6 ± 0.3 , „T3M4 (+DRG) 48h“: 1.6 ± 0.4 , „T3M4 72h“: 2.0 ± 0.3 , „T3M4 (+DRG) 72h“: 1.7 ± 0.3).

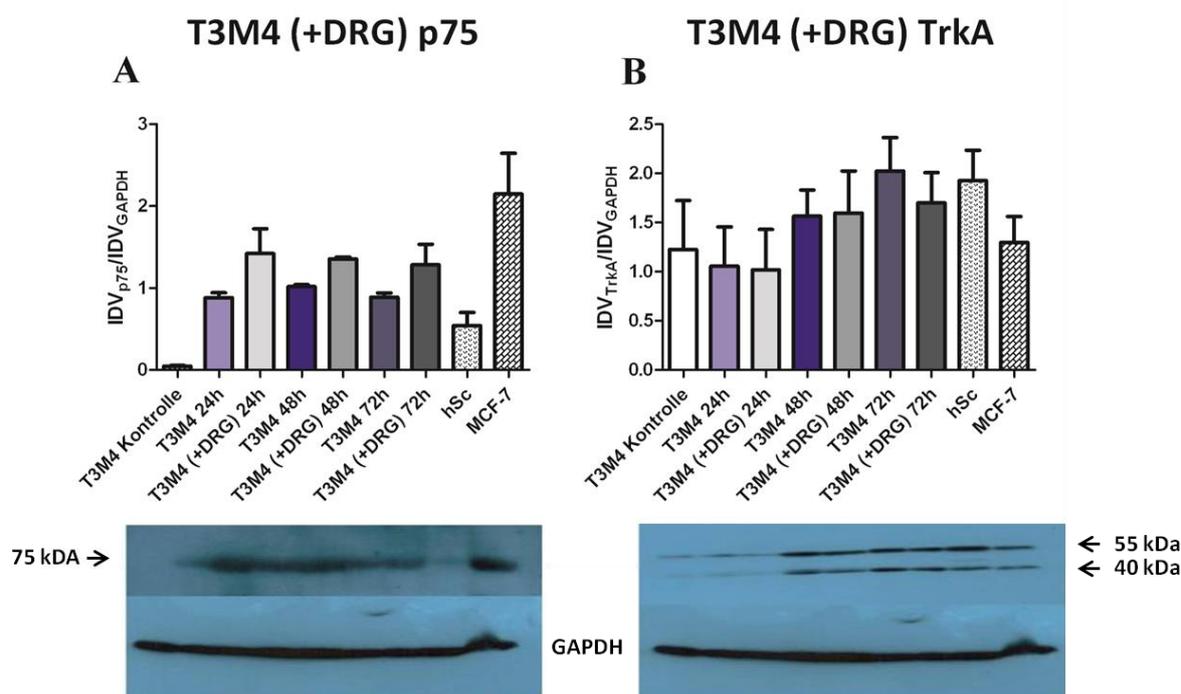


Abb. 18:

Western Blot Ergebnisse und quantitative Analyse der Expressionsniveaus der NGF Rezeptoren p75 (A) und TrkA (B) in T3M4 PCCs alleine und unter Kokultivierung mit DRGs zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h. Als Kontrollen wurden hSc und MCF-7 Zelllinien verwendet.

In den DRGs ließ sich zwar von Anfang an eine hohe Konzentration von sowohl p75, als auch von TrkA erkennen, jedoch kam es unter Kokulturbedingungen mit T3M4 PCCs zu keiner signifikanten Veränderung des Expressionslevels des NGF-Rezeptors p75 (Abb. 19; A: „DRG Kontrolle“: 3.8 ± 0.5 , „DRG 24h“: 3.2 ± 1.4 , „DRG (+T3M4) 24h“: 2.1 ± 1.3 , „DRG 48h“: 1.9 ± 0.2 , „DRG (+T3M4) 48h“: 1.8 ± 0.3 , „DRG 72h“: 2.1 ± 0.4 , „DRG (+T3M4) 72h“: 2.5 ± 0.4). Ebenfalls kam es zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression des NGF Rezeptors TrkA unter Kokulturbedingungen (Abb. 19, B: „DRG Kontrolle“: 6.4 ± 2.5 , „DRG 24h“: 3.9 ± 0.4 , „DRG (+T3M4) 24h“: 3.3 ± 0.7 , „DRG 48h“: 3.3 ± 0.4 , „DRG (+T3M4) 48h“: 3.0 ± 0.3 , „DRG 72h“: 3.2 ± 0.5 , „DRG (+T3M4) 72h“: 3.1 ± 0.6).

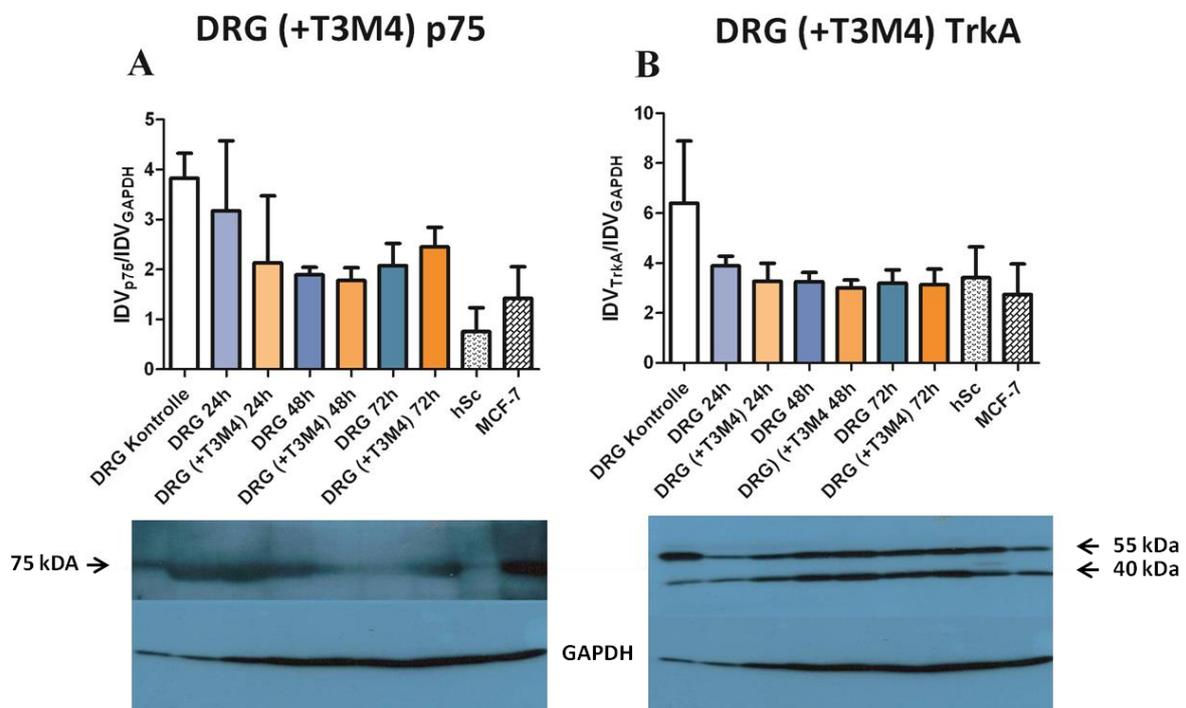


Abb. 19:

Western Blot-Ergebnisse des NGF-Rezeptors p75 (A) und des Rezeptors TrkA (B) und quantitative Analyse dieser Blots im Vergleich zum Equal Loading mit GAPDH der DRGs in der Kontrollgruppe und mit T3M4 PCCs unter Kokultivierung. Als Positivkontrollen wurden hSc und die Zelllinie MCF-7 verwendet.

4.6.3 TrkA und p75-Expression im Rahmen der Kokultur von T3M4 PCCs mit Schwannschen Zellen

Unter Kokulturbedingungen mit Schwannschen Zellen konnte in den T3M4 PCCs keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Kontrollen in der Expression des NGF-Rezeptors p75 festgestellt werden. Über den Zeitraum von 72 h kam es zu einer leichten Abnahme der Konzentration des Rezeptors, welche aber keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 20, A: „T3M4 Kontrolle“: 1.15 ± 0.07 , „T3M4 24h“: 1.2 ± 0.13 , „T3M4 (+hSc) 24h“: 1.3 ± 0.09 , „T3M4 48h“: 1.0 ± 0.13 , „T3M4 (+hSc) 48h“: 1.0 ± 0.01 , „T3M4 72h“: 0.9 ± 0.09 , „T3M4 (+hSc) 72h“: 0.8 ± 0.2). Die Kokultur von T3M4 PCCs und hSc erbrachte auch keine signifikante Veränderung der Expression des NGF Rezeptors TrkA nach 24, 48 und 72 h (Abb. 20, B: „T3M4 Kontrolle“: 2.1 ± 0.3 , „T3M4 24h“: 1.1 ± 0.2 , „T3M4 (+hSc) 24h“: 1.0 ± 0.1 , „T3M4 48h“: 1.1 ± 0.12 , „T3M4 (+hSc) 48h“: 1.1 ± 0.2 , „T3M4 72h“: 1.1 ± 0.15 , „T3M4 (+hSc) 72h“: 1.0 ± 0.1).

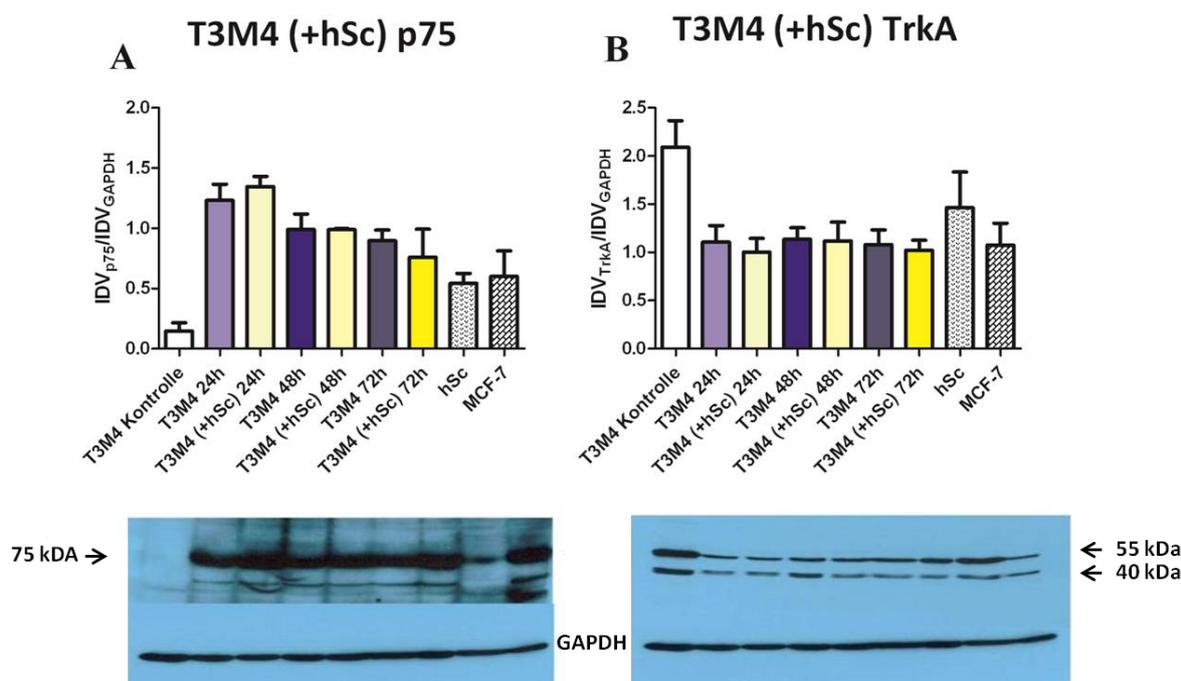


Abb. 20:

Western Blot-Ergebnisse des NGF-Rezeptors p75 (A) und des Rezeptors TrkA (B) und quantitative Analyse dieser Blots im Vergleich zur Ladekontrolle mit GAPDH der T3M4 PCCs in der Kontrollgruppe und mit Schwannschen Zellen unter Kokultivierung. Als Positiv-Kontrollen wurden hSc und die Zelllinie MCF-7 verwendet.

In den Schwannschen Zellen ließ sich nur nach 24 h Kokultivierung mit PCCs ein leichter Anstieg der Konzentration des NGF-Rezeptors p75 im Vergleich zur Kontrolle feststellen, welcher aber keine statistische Signifikanz erreichte. Nach 48 h und 72 h Kokultivierung ließ sich ein geringer Abfall der Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen (Abb. 21, A: „hSc control“: 1.2 ± 0.3 , „hSc 24h“: 1.5 ± 0.3 , „hSc (+T3M4) 24h“: 1.8 ± 0.2 , „hSc 48h“: 1.6 ± 0.2 , „hSc (+T3M4) 48h“: 1.4 ± 0.2 , „hSc 72h“: 1.4 ± 0.2 , „hSc (+T3M4) 72h“: 1.3 ± 0.2). Für den Rezeptor TrkA konnte nach 24 h kein Unterschied, nach 48 und 72 h ein leichter Abfall des Expressionslevels festgestellt werden, ohne statistische Signifikanz. Es kam auch in den Kontrollen zu einem leichten Abfall der nachweisbaren TrkA-Rezeptordichte auf den Schwannschen Zellen nach 48 und 72 h, ohne statistische Signifikanz (Abb. 21, B: „hSc control“: 2.0 ± 1.1 , „hSc 24h“: 1.6 ± 0.1 , „hSc (+T3M4) 24h“: 1.5 ± 0.1 , „hSc 48h“: 1.5 ± 0.1 , „hSc (+T3M4) 48h“: 1.2 ± 0.2 , „hSc 72h“: 1.3 ± 0.1 , „hSc (+T3M4) 72h“: 0.9 ± 0.05).

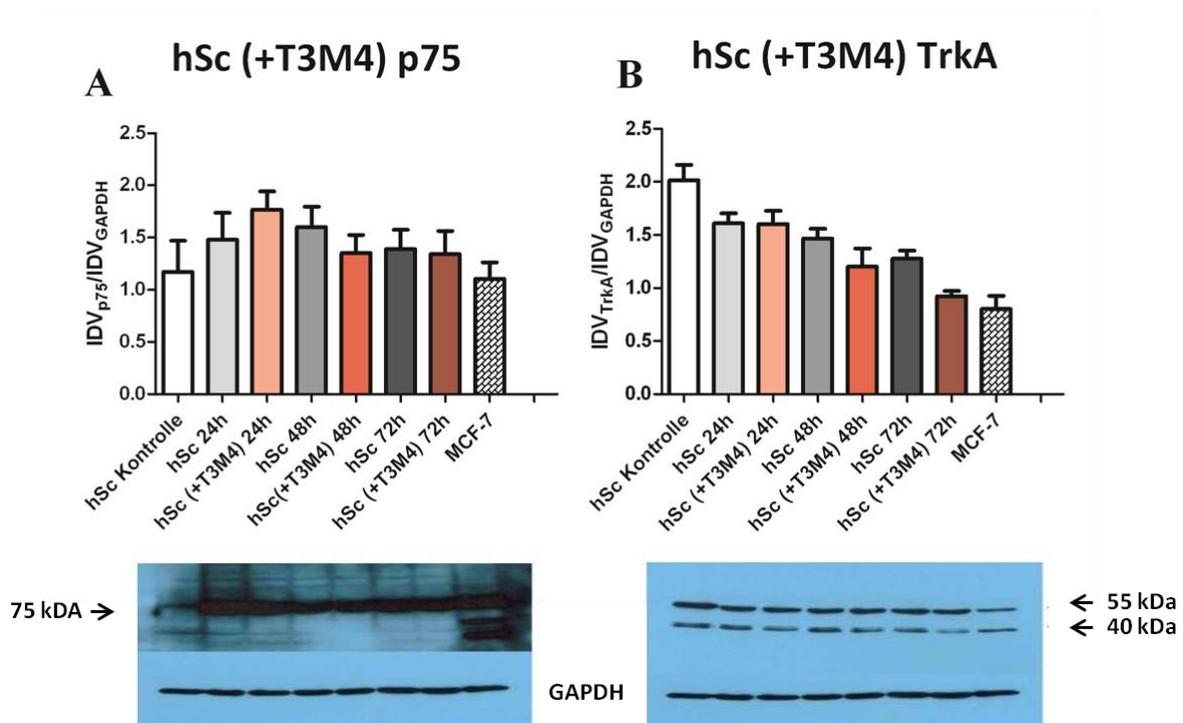


Abb. 21:

Western Blot-Analyse und quantitative Auswertung der Blots im Vergleich zu GAPDH. Kokultivierung der Schwannschen Zellen mit PCCs und Auswertung des Rezeptors p75 (A) und des Rezeptors TrkA (B). Als Positiv-Kontrolle wurde die Zelllinie MCF-7 verwendet.

4.6.4 Inhibition des NGF Rezeptors p75 im Migrationsassay

Nach molekularbiologischer Bestätigung der Änderung des Expressionsprofils des neurotrophen Faktors NGF und seines Rezeptors p75 in PCCs unter Kokultivierung mit DRGs wurde in einem nächsten Schritt das chemotaktische Potenzial von NGF und seiner Rezeptoren TrkA und p75 analysiert. Die chemische Blockade des p75 Rezeptors erfolgte hierbei bei submikromolaren Konzentrationen. Die zusätzliche Blockade des TrkA Rezeptors erfolgte bei Konzentrationen $> 5\mu\text{M}$. Aufgrund dessen wurden die T3M4 PCCs mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors (500nM, 5 μM und 50 μM) vorbehandelt. Die vorbehandelten T3M4 PCCs wurden wie in Abb. 22 dargestellt im 3-D Migrationsassay ausgesät und ihr Migrationsverhalten in Richtung DRGs mit unbehandelten T3M4 PCCs verglichen.

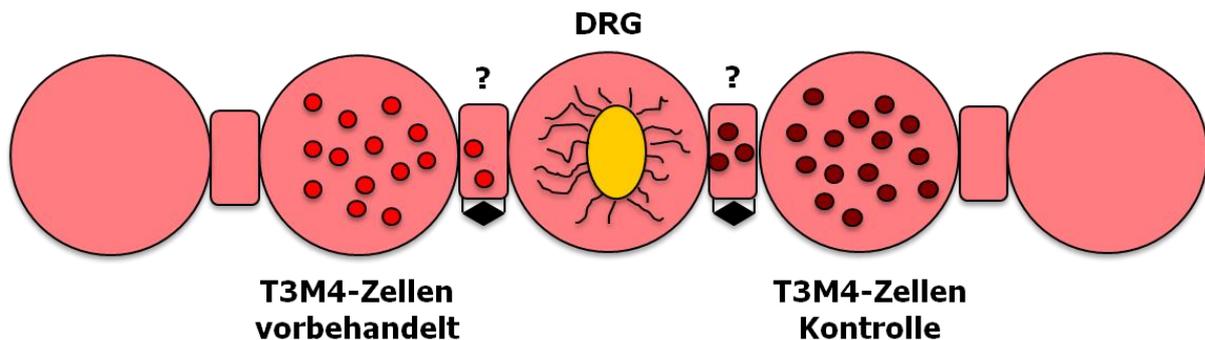


Abb. 22:

Graphische Darstellung des Aufbaus des 3-D Migrationassay zur Untersuchung des chemotaktischen Potenzials des Rezeptors p75 auf den T3M4 PCCs. Mittig wurden die DRGs ausgesät und auf jeweils gegenüberliegende Pole des Gels, die Kontroll-PCCs und die mit Inhibitor vorbehandelten PCCs, platziert.

Es konnte dabei eine nahezu vollständige Elimination der Migration der inhibierten PCCs in Richtung DRGs nachgewiesen werden. Die spezifische Migration war bei allen drei Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant erniedrigt (Abb. 23, A: „T3M4 Kontrolle 1“: 0.09 ± 0.006 , „T3M4 500nM“: 0.01 ± 0.008 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 2“: 0.09 ± 0.005 , „T3M4 5 μ M“: 0.015 ± 0.005 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 3“: 0.1 ± 0.005 , „T3M4 50 μ M“: 0.02 ± 0.007 ; $p < 0,001$), ebenso die direkte (Abb. 23, B: „T3M4 Kontrolle 1“: 89.9 ± 3.8 , „T3M4 500nM“: 24.2 ± 1.7 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 2“: 89.3 ± 3.9 , „T3M4 5 μ M“: 20.6 ± 1.5 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 3“: 101.2 ± 3.4 , „T3M4 50 μ M“: 20.3 ± 1.8 ; $p < 0,001$) und die akkumuliert zurückgelegte Distanz der PCCs in Richtung DRGs (Abb. 23, C: „T3M4 Kontrolle 1“: 160.2 ± 4.7 , „T3M4 500nM“: 56.4 ± 4.0 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 2“: 157.2 ± 6.4 , „T3M4 5 μ M“: 34.9 ± 3.2 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 3“: 160.3 ± 4.2 , „T3M4 50 μ M“: 50.0 ± 2.8 ; $p < 0,001$). Ferner waren auch die Geschwindigkeit der Migration derjenigen Zellen, welche mit Inhibitor vorbehandelt wurden, signifikant erniedrigt (Abb. 23, D: „T3M4 Kontrolle 1“: 0.2 ± 0.006 , „T3M4 500 nM“: 0.08 ± 0.006 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 2“: 0.26 ± 0.01 , „T3M4 5 μ M“: 0.05 ± 0.003 , $p < 0,001$; „T3M4 Kontrolle 3“: 0.22 ± 0.006 , „T3M4 50 μ M“: 0.07 ± 0.004 ; $p < 0,001$).

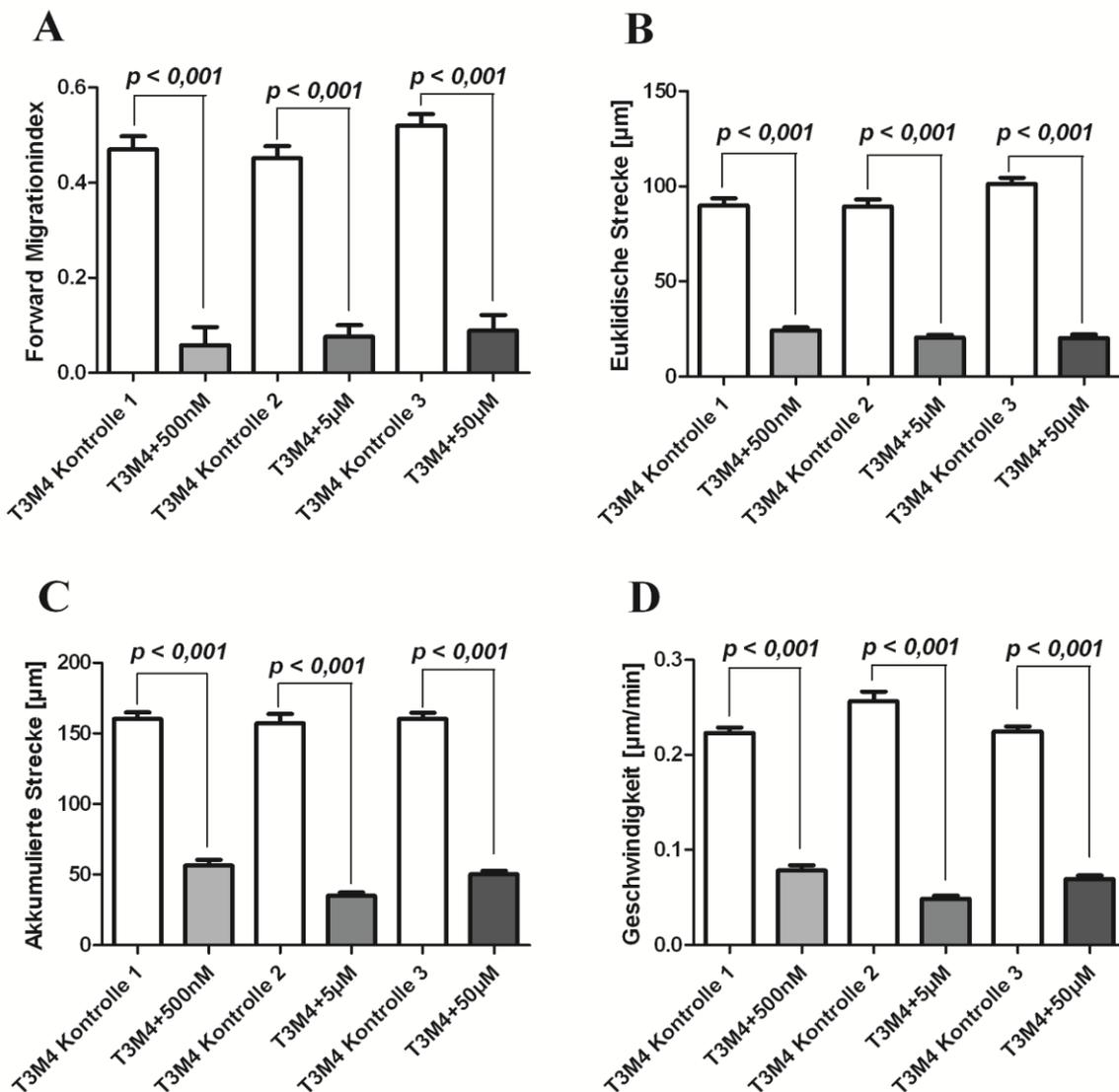


Abb. 23:

Quantitative Analyse des 3-D Migrationsassays der PCCs in Richtung DRGs mit Kontrollgruppe und p75 Rezeptor-Inhibitor. Spezifische Migration (A), direkte Strecke (B), akkumulierte Strecke (C) und Geschwindigkeit der Migration (D) der PCCs an der Migrationsfront der Kontrollgruppe und der vorbehandelten Gruppe mit jeweils drei Konzentrationen des Inhibitors (500 nM, 5 µM und 50 µM).

Da NGF auch auf Schwannsche Zellen chemotaktisch wirkt und von den T3M4 Zellen produziert und sezerniert wird, stellte sich die Frage, ob auch die Migration der Schwannschen Zellen durch Inhibitor der NGF-Rezeptoren TrkA und p75 gemindert ist. Zur Klärung dieser Frage wurde in einem weiteren Schritt die Migration der Schwannschen Zellen

unter Inhibition dieser beiden Rezeptoren in Richtung PCCs untersucht und mit unbehandelten Schwannschen Zellen verglichen.

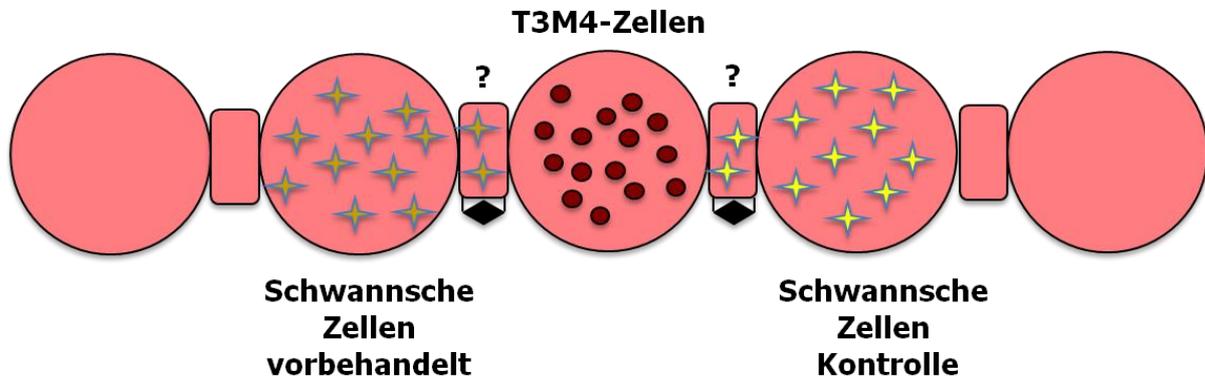
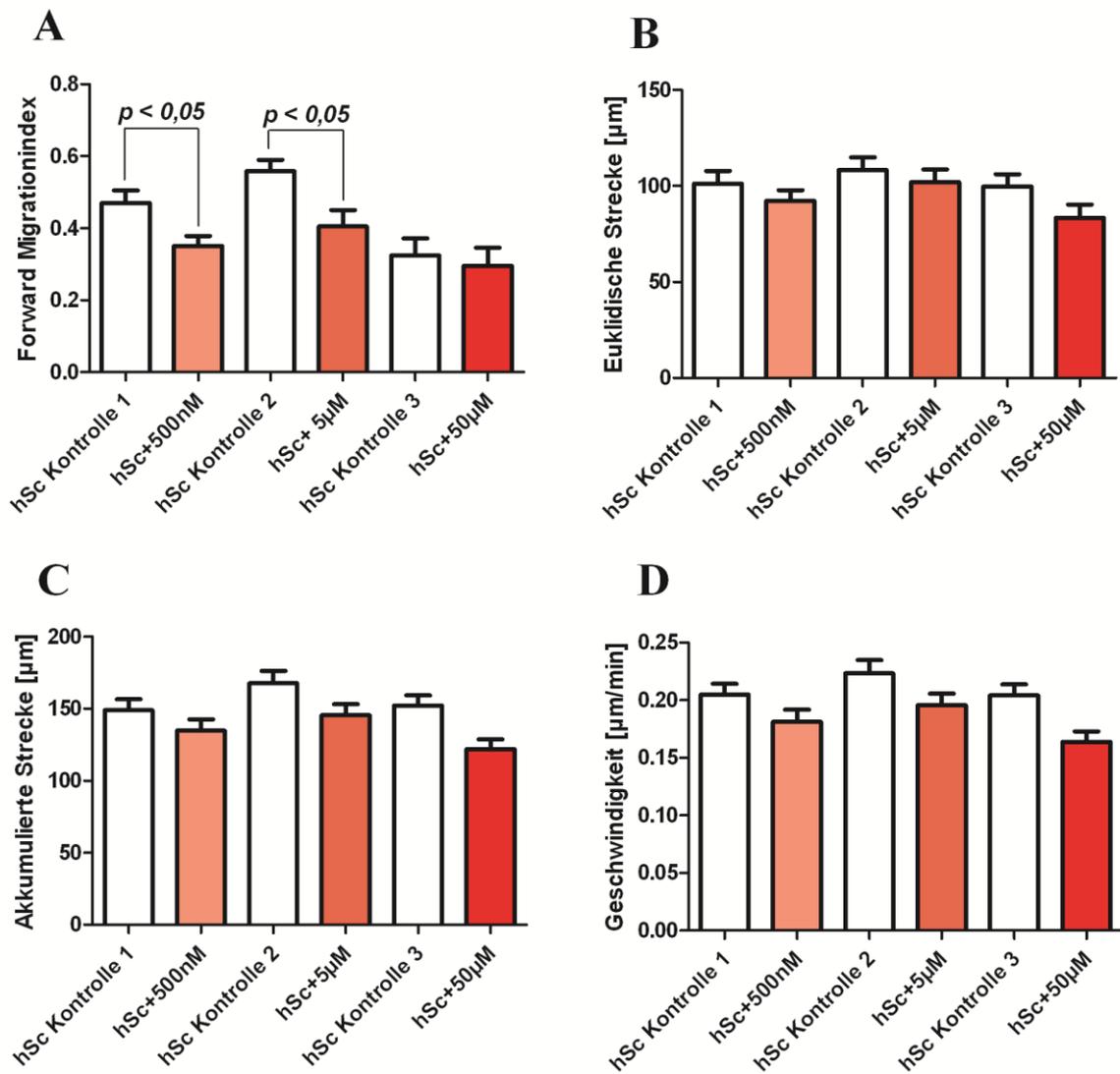


Abb. 24:

Darstellung des 3-D Migrationsassays zur Untersuchung des chemotaktischen Potenzials des Chemokins NGF und seines Rezeptors p75 und seine Auswirkung auf die Migration der Schwannschen Zellen in Richtung T3M4 PCCs. Mittig befinden sich die PCCs flankiert von der Kontrollgruppe und der mit Inhibitor vorbehandelten hSc Gruppe.

Durch Inhibition des p75 Rezeptors ließ sich eine signifikante Reduktion der spezifischen Migration der Schwannschen Zellen Richtung PCCs bei den Konzentrationen 500 nM und 5 µM induzieren (Abb. 25, A: „hSc Kontrolle 1“: 0.09 ± 0.007 , „hSc 500nM“: 0.07 ± 0.006 , $p < 0,05$; „hSc Kontrolle 2“: 0.11 ± 0.006 , „hSc 5µM“: 0.08 ± 0.009 , $p < 0,05$; „hSc Kontrolle 3“: 0.06 ± 0.01 , „hSc 50µM“: 0.06 ± 0.01). Durch die Inhibition des p75 Rezeptors auf den Schwannschen Zellen kam es zu keine statistisch signifikanten Veränderung der direkten zurückgelegten Strecke (Abb. 25, B: „hSc Kontrolle 1“: 101.3 ± 6.7 , „hSc 500nM“: 92.3 ± 5.5 , „hSc Kontrolle 2“: 108.3 ± 6.6 , „hSc 5µM“: 101.9 ± 6.6 , „hSc Kontrolle 3“: 99.7 ± 6.5 , „hSc 5 µM“: 83.4 ± 6.9) und der akkumuliert zurückgelegten Strecke in Richtung PCCs (Abb. 25, C: „hSc Kontrolle 1“: 148.9 ± 7.7 , „hSc 500nM“: 135.0 ± 57.7 , „hSc Kontrolle 2“: 167.7 ± 8.8 , „hSc 5µM“: 145.7 ± 7.6 , „hSc Kontrolle 3“: 152.2 ± 7.1 , „hSc 50µM“: 122.1 ± 6.6). Auf die Geschwindigkeit der Migration hatte die Inhibition des p75 Rezeptors keine signifikante Auswirkung (Abb. 25, D: „hSc Kontrolle 1“: 0.2 ± 0.009 , „hSc 500nM“: 0.18 ± 0.01 , „hSc Kontrolle 2“: 0.22 ± 0.01 , „hSc 5µM“: 0.2 ± 0.01 , „hSc Kontrolle 3“: 0.2 ± 0.01 , „hSc 50µM“: 0.16 ± 0.009).

**Abb. 25:**

Quantitative Analyse der Inhibition des NGF Rezeptors p75 und die Auswirkungen auf die Migration der Schwannschen Zellen in Richtung PCCs im Vergleich zu Kontrollgruppen. Analyse der spezifischen Migration (A), direkte zurückgelegte Distanz (B), akkumuliert zurückgelegte Distanz (C) und die Geschwindigkeit der Migration (D) der Schwannschen Zellen in Richtung T3M4 PCCs.

5. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit zeigt erstmalig die initiale Phase der neuralen Invasion in einem dreidimensionalen in-vitro Modell auf, wodurch die spezifische Neuroaffinität der Pankreaskarzinomzellen dargestellt werden konnte. Jedoch zeigt diese Arbeit, dass an der Entstehung der neuralen Invasion nicht nur die Pankreaskarzinomzellen einen aktiven Beitrag leisten, sondern auch die die Nerven umgebenden Gliazellen, die Schwannschen Zellen. Ein wichtige Rolle in der Entstehung dieser spezifischen Migration, von sowohl Pankreaskarzinomzellen als auch Schwannschen Zellen, scheint NGF und seine Rezeptoren p75 und TrkA zu spielen. Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass die neuralen Strukturen eine bisher unbekannt, jedoch wichtige Rolle einnehmen in der Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom. Weiterhin wird ein neuartiges, dreidimensionales in-vitro Modell aufgezeigt, welches in der Zukunft zum Verständnis von molekularen und funktionalen Aspekten der Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom beitragen kann.

Obwohl der Pathomechanismus der neuralen Invasion kontrovers diskutiert wird, wurde bis dato angenommen, dass die Karzinomzellen einen „Weg des geringsten Widerstandes“ nehmen und es dadurch zu der Karzinomzell-Nerv-Interaktion kommt. 1905 wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, dass sich die Karzinomzellen entlang von Lymphbahnen oder Blutbahnen, welche sich perineural und intraneural befinden sollen, ausbreiten. Später wurde mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Analysen im Prostatakarzinom nachgewiesen, dass sich keine Lymphbahnen innerhalb der Nerven befinden (Wang, et al., 2009, pp. 828-829). Daraufhin wurde die Hypothese verworfen, dass sich die Karzinomzellen entlang von Lymph- oder Blutgefäßen innerhalb der Nerven ausbreiten. Später stellten Zhu et al. 1999 die Hypothese auf, dass die Tumorzellmigration innerhalb des Perineuralraumes zustande kommt, da dies der Raum mit dem geringsten Widerstand ist und die Zellen einem Gesetz des geringsten Widerstandes folgen (Hassan & Maksem, 1980, p. 143). Jedoch zeigte sich einige Jahre später, dass sich die Karzinomzellen im Pankreaskarzinom nicht nur innerhalb des Perineuralraumes ausbreiten. Ganz im Gegenteil: die Karzinomzellen invadieren nicht nur das Perineurium, sondern migrieren ebenfalls in das Endoneurium und kommen in engen Kontakt mit den Schwannschen Zellen und Axonen (Z. Zhu, et al., 1999, p. 2419). Wie dieser enge

Kontakt zwischen Karzinomzellen und nervalen Strukturen entsteht und welche molekularen Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Pankreaskarzinomzellen *in vitro* aktiv und zielgerichtet zu den Neuronen migrieren, um mit diesen zu interagieren. Diese nervengerichtete Migration der Pankreaskarzinomzellen wird auch als Neurotropismus bezeichnet. Diese Eigenschaft ist eher spezifisch für das Pankreaskarzinom, da dieses Phänomen bei anderen Tumoren aus dem gastrointestinalen Bereich zum Beispiel dem Kolonkarzinom nur ansatzweise beobachtet werden konnte (Liebl, et al., 2013, pp. 55-56). Die Migration der Pankreaskarzinomzellen in Richtung Schwannscher Zellen ließ jedoch keine Spezifität erkennen. Weiterhin konnten Faktoren identifiziert werden, insbesondere NGF und sein Rezeptor p75, welche maßgeblich an dem Entstehungsprozess der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom mitverantwortlich sind (Demir IE*, 2013) neu Publikation einfügen.

In der vorgelegten Arbeit wurde zum ersten Mal die initiale Phase der neuralen Invasion in einem neuartigen *in-vitro* Modell dynamisch nachgestellt. Hierfür wurde ein neues Verfahren etabliert, welches es ermöglicht, die Migration von Zellen aufzuzeichnen und das Migrationsverhalten quantitativ zu erfassen. Dabei wurden nicht nur die Pankreaskarzinomzellen und Neurone, sondern auch die Rolle der peripheren Glia bei der Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom untersucht. Diese Arbeit zeigt nicht nur neuartige Erkenntnisse zur neuralen Invasion beim Pankreaskarzinom, sondern stellt auch den direkten Vergleich zu anderen gastrointestinalen Tumoren dar.

Die Etablierung der quantitativen Analyse verschiedener Zellarten in einem 3-D *in-vitro* Modell der neuralen Invasion stellt den methodischen Grundstein der vorgelegten Arbeit dar. Hierzu wurden Pankreaskarzinomzelllinien mit Spinalganglien von neugeborenen Ratten kokultiviert und die Morphologie der Migration der Krebszellen in einem Zeitraum von 120h dokumentiert. Dieses Modell besitzt seine Stärke darin, dass es von Anfang an eine dreidimensionale räumliche Trennung zwischen den Pankreaskarzinomzellen und den Nerven vorgibt, welche die Karzinomzellen überwinden müssen. Diese räumliche Trennung ist analog zu den *in-vivo* Bedingungen der Pankreaskarzinomzellen. Bereits bei Einführung dieses Systems ohne die quantitative Erfassung der Migration zeigte sich, dass Pankreaskarzinomzellen in Gegenwart von Neuronen eine Konformationsänderung erfahren

und sogenannte „Spikes“ (Lamellopodia) bilden, um in Richtung der Nerven zu migrieren (Skaper, 2012, p. 1). Mit diesem System konnten aber nicht mehrere Zellarten simultan untersucht und ihr Migrationsverhalten quantifiziert werden. Dieser Aspekt wurde in der dargelegten Arbeit sehr stark ausgearbeitet und das System mit der Etablierung der digitalen Time-Lapse Mikroskopie im Rahmen dieses 3-D Migrationsassays entscheidend methodisch erweitert. Somit kann nun nicht nur eine deskriptive Aussage zum Migrationsverhalten der Karzinomzellen getroffen werden sondern auch quantitative Analysen zu Einzelzellmigrationen durchgeführt werden. Dieses System ermöglicht es, das Migrationsverhalten verschiedenster Zellarten über einen bestimmten Zeitraum gezielt zu studieren. Mit der im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eingeführten Methode können nun die verschiedenen Zellarten, welche bei der initialen Phase der neuralen Invasion beteiligt sind, in-vitro dynamisch untersucht werden.

Die Chemoattraktion von Pankreaskarzinomzellen zu Nerven („Neurotropismus“) wurde in vielen in-vitro Modellen beobachtet und wird heute als Hauptursache der Entstehung der neuralen Invasion angesehen (Ceyhan, et al., 2008, pp. 444-445). Bis dato wurde angenommen, dass es neben den Pankreaskarzinomzellen die neuralen Strukturen der Nerven sind, die die Hauptakteure in der Entstehung der neuralen Invasion darstellen. Kayahara et al. stellten erstmals die Hypothese auf, dass die Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom auf der Vielzahl intrapankreatischer Nervengeflechte und der enge anatomische Lage des Pankreas zu extrapankreatischen Nerven beruht. Sie konnten zeigen, dass es zu einer kontinuierlichen Ausbreitung der Karzinomzellen entlang der Nerven kommt (Dai, et al., 2007, p. 299). Jedoch beruht die Entstehung der neuralen Invasion nicht nur auf der engen anatomischen Lage der Karzinomzellen zu den Nerven. Ganz im Gegenteil: Die Karzinomzellen führen eine aktive Migration in Richtung Nerven aus, um sich entlang dieser auszubreiten. In den letzten Jahren wurde versucht, die potentiellen chemischen Mediatoren zu identifizieren, welche einen Einfluss auf diese Anziehung haben könnten. Es stellte sich heraus, dass neben NGF und seinen Rezeptoren p75 und TrkA zahlreiche weitere Faktoren eine Rolle spielen, unter anderem Artemin, GDNF und Fraktalkin (Kayahara, et al., 1991, pp. 107-111).

Insbesondere für NGF und p75 konnte in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass sie auf Pankreaskarzinomzellen und Schwannsche Zellen eine chemoattraktive Wirkung

ausüben. Ebenfalls zeigen intrapancreatische Nerven im Pankreaskarzinom eine bis zu 10-fach höhere Konzentration an NGF, GAP-43 und Artemin. Im Vergleich dazu zeigen sich im Kolonkarzinom, in welchem keine signifikante neurale Invasion nachweisbar ist, kaum nachweisbare Konzentrationen an NGF und Artemin und deutlich reduzierte Konzentrationen an GAP-43 innerhalb der Nerven (Demir, et al., 2010, p. 1520). Es zeigt sich also das Fehlen von neurotrophen, chemoattraktiven Molekülen im Kolonkarzinom im Vergleich zum Pankreaskarzinom. Die kaum vorhandene chemotaktische Wirkung der Nerven auf Karzinomzellen im Kolonkarzinom könnte für die recht seltene neurale Invasion in diesem Tumor eine Erklärung darstellen.

Untersuchungen zu NGF und seinem Rezeptor p75 von Wang et al. konnten nachweisen, dass der Rezeptor p75 sowohl in Nerven normaler Pankreata, als auch im Pankreaskarzinom vorhanden ist. Die Menge an p75-Rezeptoren im Pankreaskarzinom korrelierte positiv mit dem Auftreten neuraler Invasion. Ebenfalls konnte durch dieselbe Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass Pankreaskarzinomzellen, welche mit einem p75-Vektor transfiziert wurden, eine deutlich höhere chemotaktische Migration in Richtung NGF aufwiesen als ihre Negativkontrolle (Liebl, et al., 2013, p. 58). Weiterhin war die NGF-Expression im humanen Pankreaskarzinomgewebe mit vermehrter neuraler Invasion signifikant erhöht (Wang, et al., 2009, pp. 828-830).

Der neurotrophe Faktor NGF und seine Rezeptoren spielen nachweislich eine bedeutende Rolle in der Entstehung der neuralen Invasion. Zhu et al. konnten bereits 1999 zeigen, dass NGF in Pankreaskarzinomzellen hochreguliert ist. Dahingegen war dessen Rezeptor TrkA im Perineurium von Nerven, nicht aber in Karzinomzellen nachweisbar (Z. Zhu, et al., 1999, p. 2426). Dies konnte auch durch weitere Untersuchungen belegt werden, in welchen gezeigt wurde, dass im 3-D Migrationsassay mit T3M4 Pankreaskarzinomzellen und DRGs die Konzentration von NGF auf mRNA Ebene in den Karzinomzellen in einem Zeitraum von 0 bis 120h kontinuierlich anstieg (Z. Zhu, et al., 1999, p. 2426). Weiterhin steigert NGF die Proliferation und Invasivität pankreatischer Karzinomzellen in-vitro (Ceyhan, et al., 2008, p. 446). Der Rezeptor p75 ist außerdem zusammen mit NGF teilweise verantwortlich für die Migration Schwannscher Zellen (Z. Zhu, et al., 2002; Z. W. Zhu, et al., 2001, pp. 138; 108-109).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind analog zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, denn die Blockade sowohl von TrkA als auch des p75 Rezeptors auf den

Pankreaskarzinomzellen führte zu einem signifikanten Verlust der spezifischen Migration dieser Zellen. Die pharmakologische Blockade dieses Rezeptors auf Schwannschen Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der zielgerichteten Migration dieser Zellen in Richtung Pankreaskarzinom.

Die Wichtigkeit der Schwannschen bei peripheren Nervenverletzungen und der Generation des neuropathischen Schmerzes war einer der Hauptgründe, weshalb die Rolle der Gliazellen bei der neuralen Invasion in dieser Arbeit untersucht wurde. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass die Pankreaskarzinomzellen spezifisch zu Nerven migrieren, was jedoch viel überraschender war, war die Erkenntnis, dass die Schwannschen Zellen ähnlich zu Reaktionen der Karzinomzellen auch Konformationsänderungen durchliefen. Sie nahmen eine spindelförmige Gestalt an und migrierten in Richtung Karzinomzellen. Diese erreichten sie noch bevor die Karzinomzellen die Nerven erreichen konnten. Durch diese Konformationsänderung erhielten die Schwannschen Zellen das Potential zur Migration und konnten somit die Matrixbrücke in Richtung Pankreaskarzinom überwinden und in engen Kontakt mit Karzinomzellen treten.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit die Fragestellung bearbeitet, ob die Migration der Schwannschen Zellen, die in Richtung Pankreaskarzinom beobachtet werden konnte, spezifisch ist oder ob die Anwesenheit anderer maligner Zellarten die Schwannschen Zellen ebenfalls zur Migration anregen. Analysen der Migration Schwannscher Zellen sowohl mit Pankreaskarzinomzellen, als auch mit Kolonkarzinomzellen konnten zeigen, dass sie sowohl von Pankreaskarzinomzellen, als auch von Kolonkarzinomzellen angezogen werden. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die zielgerichtete Migration als auch die dadurch zurückgelegte direkte Strecke der Schwannschen Zellen signifikant länger war in Richtung der Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu Kolonkarzinomzellen. Diese Ergebnisse korrelieren mit in-vivo Ergebnissen von humanem Gewebe und Mausmodellen. Sowohl in humanen Pankreaskarzinomgeweben als auch in murinen Geweben des Pankreaskarzinoms fanden sich Schwannsche Zellen in enger Korrelation mit neoplastischen Läsionen. Im Gegensatz dazu, fanden sich in humanen und murinen Kolonkarzinomen Schwannsche Zellen nur vereinzelt um Karzinomzellverbände (Anton, Weskamp, Reichardt, & Matthew, 1994, p. 2798).

Welche Faktoren sind nun aber verantwortlich für die Konformationsänderung und das Migrationspotential der Schwannschen Zellen? Der Rezeptor p75 ist an der Interaktion

zwischen Axonen und Schwannschen Zellen und weiterhin bei der Migration von Schwannschen Zellen beteiligt. Dies konnte mit Hilfe von p75-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden, welche verminderte axonale Sprossung und ebenfalls verminderte Migration Schwannscher Zellen während der Entwicklung demonstrierten (Demir, Boldis, 2014, pp. 4-6).

Adulte Schwannsche Zellen produzieren im nicht aktivierten Zustand kaum NGF. Hingegen wird bei Aktivierung der Schwannschen Zellen vermehrt NGF exprimiert und sezerniert und gleichzeitig die Expression des p75 Rezeptors gesteigert. Diese Kombination aus einer vermehrter Expression von NGF und einer gleichzeitigen Überexpression des p75-Rezeptors führt zu einer Proliferation und Migration Schwannscher Zellen. Weiterhin kommt es zur Aussprossung von Axonen und axonaler Regeneration durch Bindung von NGF an NGF-Rezeptoren im Perineurium (Bentley & Lee, 2000, pp. 7706,7711). In unseren Untersuchungen konnten ebenfalls gezeigt werden, dass NGF in Schwannschen Zellen in der unmittelbaren Anwesenheit von Karzinomzellen hochreguliert wird und es somit zu einer Initiierung der Migration Schwannscher Zellen in Richtung Karzinomzellen resultiert.

Unter Berücksichtigung aller neuen Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Verletzung intrapankreatischer Nerven durch Pankreaskarzinomzellen während der neuralen Invasion, zu einer Hochregulation von NGF in peripheren Neuronen führt und dadurch periphere Glia aktiviert wird. Diese Aktivierung wiederum könnte in den Schwannschen Zellen selbst zu einer Hochregulation von NGF führen. NGF könnte wiederum über die Bindung an den p75-Rezeptor, als auch den TrkA-Rezeptor, die Schwannschen Zellen zur Migration in Richtung Pankreaskarzinomzellen veranlassen. In-vitro wurde bereits die axonale Aussprossung peripherer Nerven in Richtung Karzinom beobachtet (Terenghi, 1999, pp. 4-5). Da periphere Axone in-vivo Schwannsche Zellen als Leitstrukturen nach Nervenverletzungen zum Wiederaussprossen benutzen, könnte die beobachtete Aussprossung in-vitro ebenfalls durch die Schwannschen Zellen induziert werden. Desweiteren wurde eine Invasion der Karzinomzellen entlang der Axone in-vitro beobachtet. (Dai, et al., 2007, p. 299). Pankreaskarzinomzellen besitzen sowohl TrkA als auch p75 Rezeptoren. Das von Schwannschen Zellen sezernierte NGF könnte daher zu einer Wachstumsförderung der Karzinomzellen führen und über parakrine Mechanismen die Invasion der Karzinomzellen entlang der Axone induzieren. Somit entsteht sowohl eine auto- als auch parakrine Stimulation beider Interaktionspartner. Dies könnte zu der engen Interaktion zwischen Nerven

und Pankreaskarzinomzellen führen, die man aus fast 100% aller histopathologischen Schnitten des duktales Adenokarzinoms des Pankreas kennt. Die neurale Invasion wäre somit ein enges Zusammenspiel aus Karzinomzellen und Nerven, wobei sich beide Partner gegenseitig aktivieren, zueinander migrieren und auf Grund dessen eine enge Interaktion miteinander eingehen.

Zumeist wurde angenommen, dass die Nerven, welche von Karzinomzellen befallen werden, passive Partner im Rahmen der neuralen Invasion darstellen. Aufgrund der dargelegten Untersuchungen sollte die Rolle der Nerven und insbesondere der glialen Strukturen der Nerven bei der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom neu überdacht werden. Durch die Ergebnisse in der vorgelegten Arbeit könnte Gliazellen diejenigen Zellen darstellen, welche den ersten Schritt in Richtung Karzinomzellen unternehmen und dadurch die neurale Invasion initiieren. Die spezifische Affinität der Schwannschen Zellen zu den Pankreaskarzinomzellen ist die wichtigste Erkenntnis aus der vorliegenden Dissertationsarbeit und bis dato für keine andere Tumorentität nachgewiesen. Eine ähnliche Affinität konnte nur für neuronale Stammzellen in Zusammenhang mit Glioblastomzellen in Hirntumorgewebe nachgewiesen werden (Gil, et al., 2010, pp. 111-112).

Doch zu welchem Zweck könnten die Schwannschen Zellen ihre Migration in Richtung Karzinom ausführen? Könnte dies einen Abwehrmechanismus darstellen, um die axonalen Strukturen der Nerven zu schützen? Um diese Frage beantworten zu können muss geklärt werden, welche Funktion die Migration Schwannscher Zellen in Richtung Karzinomzellen erfüllt. Nach Nervenschädigung könnten migrierende Schwannsche Zellen eine Hilfe bei der Aussprossung neuraler Axone in Richtung Karzinom sein. Jedoch scheint die Migration der Schwannschen Zellen nicht gänzlich von Nervenschäden abhängig zu sein, sondern vielmehr von der alleinigen Präsenz der Karzinomzellen. Es ist bekannt, dass maligne Zellen die sie umgebenden Zellen und auch das sie umgebende Stroma modifizieren können. Ein Beispiel ist die Aktivierung der Makrophagen, welche daraufhin Matrix-degradierende Enzyme sezernieren und so den Karzinomzellen Migration und Invasivität ermöglichen (Aboody, et al., 2000, p. 12846). Man könnte annehmen, dass maligne Zellen auch Schwannsche Zellen in ihrer Umgebung effektiver aktivieren und in ihrer Biologie beeinflussen als benigne Zellen. Weitere Studien sollten daher untersuchen, welche Veränderungen in Schwannschen Zellen erfolgen, wenn diese in Kontakt mit Pankreaskarzinomzellen kommen und welche Effekte

diese Interaktion auf die malignen Zellen ausübt. Genauere Kenntnisse über die Funktion und Hintergründe der Migration glialer Zellen im Rahmen der neuralen Invasion könnten zukünftige Ansatzpunkte zur Prävention des frühen Lokalrezidivs und weiterer Metastasierung im Pankreaskarzinom darstellen.

Der nächste Schritt wäre die Übertragung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in ein in-vivo Modell. Leider sind die derzeit zur Verfügung stehenden in-vivo Modelle, welche in den letzten Jahren etabliert wurden, um die neurale Invasion im Pankreaskarzinom zu studieren, enttäuschend ausgefallen. Das erste erfolgreiche in-vivo Modell zur Untersuchung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom wurde 2006 von Koide et al. etabliert. Hierbei wurden humane Nerven und humane Pankreaskarzinomzellen zusammen in immundefiziente Mäuse übertragen, um die neurale Invasion dieser Nerven durch die Karzinomzellen zu studieren. Die Nerveninvasion der Krebszellen wurde hierbei von einer ausgeprägten Entzündungsreaktion der Nerven begleitet, so dass keine Aussage zur neuralen Invasion der transplantierten humanen Nerven gemacht werden konnte. Daraufhin wurde die Invasion von subkutanen Nerven dieser immundefizienten Mäuse („Nacktmäuse“) durch die implantierten Pankreaskarzinomzellen studiert (Hanahan & Weinberg, 2011, p. 655). Dies lässt jedoch wenig Aussage über die reale Situation im Pankreaskarzinom zu, da die humanen Nerven im beschriebenen Modell einen anderen Ursprung haben als die autonomen Nerven im Pankreas. Ein in-vivo Modell unter realen Bedingungen konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt leider noch nicht etabliert werden. Um jedoch die Flut an Informationen, welche mit neu etablierten in-vitro Modellen generiert wird, weiterverarbeiten zu können, sollten diese in in-vivo Modellen weiter untersucht werden. Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Lage der Pankreata von Maus und Mensch stellt sich jedoch die Frage ob reale Bedingungen überhaupt in der Maus erschaffen werden können (Koide, et al., 2006, p. 2423). Möglicherweise müssen Tierversuche mit Tieren unternommen werden, in welchen das Pankreas dem menschlichen Organ in Lage, Größe, Form und Funktion ähnlicher ist, beispielsweise im Schwein.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das Phänomen der neuralen Invasion wurde bereits Mitte des 19. Jahrhunderts in der Literatur, in Zusammenhang mit Tumoren im Hals-Nase-Ohren-Bereich, beschrieben (Demir, et al., 2010, p. 1523). Später wurde das Auftreten der neuralen Invasion ebenfalls in anderen Tumorentitäten beobachtet, darunter auch im Pankreaskarzinom. Das Besondere an der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom ist, dass die Inzidenz in histopathologischen Schnitten bei nahezu 100 % liegt (Dai, et al., 2007, p. 299). Obwohl das Vorhandensein von Tumorzellen, die die Nerven infiltrieren, mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist und auch bereits vor einigen Jahren in die TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinoms aufgenommen wurde, ist dennoch erstaunlich wenig über die Entstehungsmechanismen der neuralen Invasion bekannt. Die vorliegende Arbeit betrachtet zum ersten Mal die initiale Phase der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom. Die experimentellen Untersuchungen, mit Hilfe eines 3-D in-vitro Migrationsassays und einem neu entwickelten Verfahren zur quantitativen Analyse der Migrationseigenschaften einzelner Zellen konnten zeigen, dass eine Komponente der Entstehung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom die spezifische Migration der Tumorzellen in Richtung Nerven darstellt. Dieses Phänomen war spezifisch für das Pankreaskarzinom und für andere Tumorentitäten aus dem gastrointestinalen Bereich nicht nachweisbar. Jedoch nehmen die die Nerven umhüllenden Gliazellen ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Entstehung der neuralen Invasion ein, indem sie ebenfalls eine aktive Migration in Richtung Tumor unternehmen. Hierbei vollführen die Schwannschen Zellen sogar den ersten Schritt in Richtung Karzinomzellen und die Migration dieser fällt noch spezifischer aus, als die der Pankreaskarzinomzellen in Richtung Nerven. Die Aktivierung der Schwannschen Zellen ist für andere Tumore des gastrointestinalen Traktes nur bedingt und für benigne Zellen nicht nachweisbar. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren wie NGF vor allem von Nerven und von Gliazellen sezerniert und seine Rezeptoren TrkA und p75 eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Nerv-Karzinomzell Interaktion spielen. Diese Untersuchungen decken eine komplett neue Sichtweise der Entstehung der neuralen Invasion auf. Es bleibt die Frage offen, ob die beobachtete Gliamigration einen Schutzmechanismus der Nerven gegenüber dem Tumor darstellt oder ob es möglicherweise durch die

Wechselwirkung mit den Karzinomzellen zur Beeinflussung dieser kommt. Eine solche Interaktionen kann gravierende Auswirkungen auf die Tumoraggressivität haben, weil die Gliazellen zur Migration der Karzinomzellen entlang der Nerven beitragen und somit einen entscheidende Rolle in der Karzinomausbreitung und Tumor-Resektabilität einnehmen würden.

7. Literaturverzeichnis

- Aboudy, K. S., Brown, A., Rainov, N. G., Bower, K. A., Liu, S., Yang, W., Small, J. E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P. M., Breakefield, X. O., & Snyder, E. Y. (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*, 12846-12851.
- Adler, G., Seufferlein, T., Bischoff, S. C., Brambs, H. J., Feuerbach, S., Grabenbauer, G., Hahn, S., Heinemann, V., Hohenberger, W., Langrehr, J. M., Lutz, M. P., Micke, O., Neuhaus, H., Neuhaus, P., Oettle, H., Schlag, P. M., Schmid, R., Schmiegel, W., Schlottmann, K., Werner, J., Wiedenmann, B., & Kopp, I. (2007). [Carcinoma of the pancreas: summary of guidelines 2007, issued jointly by 15 German specialist medical societies]. *Dtsch Med Wochenschr*, *132*, 1696-1700.
- Allen, S. J., Crown, S. E., & Handel, T. M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, *25*, 787-820.
- Anton, E. S., Weskamp, G., Reichardt, L. F., & Matthew, W. D. (1994). Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*, 2795-2799.
- Bansal, P., & Sonnenberg, A. (1995). Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *109*, 247-251.
- Bartsch, D. K., Kress, R., Sina-Frey, M., Grutzmann, R., Gerdes, B., Pilarsky, C., Heise, J. W., Schulte, K. M., Colombo-Benkmann, M., Schleicher, C., Witzigmann, H., Pridohl, O., Ghadimi, M. B., Horstmann, O., von Bernstorff, W., Jochimsen, L., Schmidt, J., Eisold, S., Estevez-Schwarz, L., Hahn, S. A., Schulmann, K., Bock, W., Gress, T. M., Zugel, N., Breitschaft, K., Prenzel, K., Messmann, H., Endlicher, E., Schneider, M., Ziegler, A., Schmiegel, W., Schafer, H., Rothmund, M., & Rieder, H. (2004). Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int J Cancer*, *110*, 902-906.
- Batsakis, J. G. (1985). Nerves and neurotropic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, *94*, 426-427.
- Bentley, C. A., & Lee, K. F. (2000). p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci*, *20*, 7706-7715.
- Bockman, D. E., Buchler, M., & Beger, H. G. (1994). Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology*, *107*, 219-230.
- Brand, R. E., Greer, J. B., Zolotarevsky, E., Brand, R., Du, H., Simeone, D., Zisman, A., Gorchow, A., Lee, S. Y., Roy, H. K., & Anderson, M. A. (2009). Pancreatic cancer patients who smoke and drink are diagnosed at younger ages. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *7*, 1007-1012.

- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., Muller, M. W., Giese, T., Buchler, M. W., Giese, N. A., & Friess, H. (2009). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, *136*, 177-186 e171.
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Muller, M. W., Giese, N. A., Friess, H., & Schafer, K. H. (2008). Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *374*, 442-447.
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., Friess, H., & Schafer, K. H. (2009). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, *104*, 2555-2565.
- Chari, S. T., Leibson, C. L., Rabe, K. G., Timmons, L. J., Ransom, J., de Andrade, M., & Petersen, G. M. (2008). Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology*, *134*, 95-101.
- Chen, E. L., & Prinz, R. A. (2007). Long-term survival after pancreatic cancer treatment. *The American Journal of Surgery*, *194*, S127-S130.
- Cui, Y., & Andersen, D. K. (2012). Diabetes and pancreatic cancer. *Endocr Relat Cancer*, *19*, F9-F26.
- Dai, H., Li, R., Wheeler, T., Ozen, M., Ittmann, M., Anderson, M., Wang, Y., Rowley, D., Younes, M., & Ayala, G. E. (2007). Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach. *Hum Pathol*, *38*, 299-307.
- de Leon-Casasola, O. (2011). New developments in the treatment algorithm for peripheral neuropathic pain. *Pain Med*, *12 Suppl 3*, S100-108.
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Liebl, F., D'Haese, J. G., Maak, M., & Friess, H. (2010). Neural Invasion in Pancreatic Cancer: The Past, Present and Future. *Cancers*, *2*, 1513-1527.
- Demir, I.E., Boldis, A., Brunner, E., Klose, N., Kehl, T., Maak, M., Lesina, M., Laschinger, M., Janssen, K.P., Algül, H., Friess, H., Ceyhan, G.O. (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst*, *106*, 1-12.
- di Mola, F. F., & di Sebastiano, P. (2008). Pain and pain generation in pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg*, *393*, 919-922.
- Doi, R., Imamura, M., Hosotani, R., Imaizumi, T., Hatori, T., Takasaki, K., Funakoshi, A., Wakasugi, H., Asano, T., Hishinuma, S., Ogata, Y., Sunamura, M., Yamaguchi, K., Tanaka, M., Takao, S., Aikou, T., Hirata, K., Maguchi, H., Aiura, K., Aoki, T., Kakita,

- A., Sasaki, M., Ozaki, M., Matsusue, S., Higashide, S., Noda, H., Ikeda, S., Maetani, S., & Yoshida, S. (2008). Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg Today*, *38*, 1021-1028.
- Dong, J., Jimi, E., Zeiss, C., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2010). Constitutively active NF-kappaB triggers systemic TNFalpha-dependent inflammation and localized TNFalpha-independent inflammatory disease. *Genes Dev*, *24*, 1709-1717.
- Edwards, B. K., Ward, E., Kohler, B. A., Ehemann, C., Zauber, A. G., Anderson, R. N., Jemal, A., Schymura, M. J., Lansdorp-Vogelaar, I., Seeff, L. C., van Ballegooijen, M., Goede, S. L., & Ries, L. A. (2010). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, *116*, 544-573.
- Farrow, B., & Evers, B. M. (2002). Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol*, *10*, 153-169.
- Freelove, R., & Walling, A. D. (2006). Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*, *73*, 485-492.
- Friess, H., Guo, X.-Z., Nan, B.-C., Kleeff, Ö., & Büchler, M. W. (1999). Growth Factors and Cytokines in Pancreatic Carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *880*, 110-121.
- Gil, Z., Cavel, O., Kelly, K., Brader, P., Rein, A., Gao, S. P., Carlson, D. L., Shah, J. P., Fong, Y., & Wong, R. J. (2010). Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J Natl Cancer Inst*, *102*, 107-118.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*, 646-674.
- Hassan, M. O., & Maksem, J. (1980). The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study. *Am J Surg Pathol*, *4*, 143-148.
- Henne-Bruns D. , K. B., Dürig M. (2008). Duale Reihe - Chirurgie. In (Vol. 3. Auflage). Stuttgart: Thieme Verlagsgruppe.
- Kayahara, M., Nagakawa, T., Konishi, I., Ueno, K., Ohta, T., & Miyazaki, I. (1991). Clinicopathological study of pancreatic carcinoma with particular reference to the invasion of the extrapancreatic neural plexus. *Int J Pancreatol*, *10*, 105-111.
- Kayahara, M., Nakagawara, H., Kitagawa, H., & Ohta, T. (2007). The nature of neural invasion by pancreatic cancer. *Pancreas*, *35*, 218-223.
- Koide, N., Yamada, T., Shibata, R., Mori, T., Fukuma, M., Yamazaki, K., Aiura, K., Shimazu, M., Hirohashi, S., Nimura, Y., & Sakamoto, M. (2006). Establishment of perineural invasion models and analysis of gene expression revealed an invariant chain

- (CD74) as a possible molecule involved in perineural invasion in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 2419-2426.
- Kundu, J. K., & Surh, Y.-J. (2008). Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659, 15-30.
- Kurihara, H., Shinohara, H., Yoshino, H., Takeda, K., & Shiba, H. (2003). Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues. *J Periodontol*, 74, 76-84.
- Kuvshinoff, B. W., & Bryer, M. P. (2000). Treatment of resectable and locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Control*, 7, 428-436.
- Li, D., Yeung, S. C., Hassan, M. M., Konopleva, M., & Abbruzzese, J. L. (2009). Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 137, 482-488.
- Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H., & Albo, D. (2009). Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*, 115, 3379-3391.
- Liebl, F., Demir, I. E., Rosenberg, R., Boldis, A., Yildiz, E., Kujundzic, K., Kehl, T., Dischl, D., Schuster, T., Maak, M., Becker, K., Langer, R., Laschinger, M., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2013). The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer. *Clin Cancer Res*, 19, 50-61.
- Liu, B., & Lu, K. Y. (2002). Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 1, 469-476.
- Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., DiMagno, E. P., Elitsur, Y., Gates, L. K., Jr., Perrault, J., & Whitcomb, D. C. (1997). Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 89, 442-446.
- Ma, J., Jiang, Y., Sun, Y., & Zhao, X. (2008). Expression of nerve growth factor and tyrosine kinase receptor A and correlation with perineural invasion in pancreatic cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23, 1852-1859.
- Marchesi, F., Piemonti, L., Mantovani, A., & Allavena, P. (2010). Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 77-82.
- Mazur, P. K., & Siveke, J. T. (2012). Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut*, 61, 1488-1500.
- McDade, T. P., Perugini, R. A., Vittimberga, F. J., Jr., Carrigan, R. C., & Callery, M. P. (1999). Salicylates inhibit NF-kappaB activation and enhance TNF-alpha-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Res*, 83, 56-61.

- Michaud, D. S., Giovannucci, E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., & Fuchs, C. S. (2001). Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA*, *286*, 921-929.
- Momi, N., Kaur, S., Krishn, S. R., & Batra, S. K. (2012). Discovering the route from inflammation to pancreatic cancer. *Minerva Gastroenterol Dietol*, *58*, 283-297.
- Niederhuber, J. E., Brennan, M. F., & Menck, H. R. (1995). The National Cancer Data Base report on pancreatic cancer. *Cancer*, *76*, 1671-1677.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., Gutberlet, K., Kettner, E., Schmalenberg, H., Weigang-Koehler, K., Bechstein, W. O., Niedergethmann, M., Schmidt-Wolf, I., Roll, L., Doerken, B., & Riess, H. (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, *297*, 267-277.
- Ozaki, H., Hiraoka, T., Mizumoto, R., Matsuno, S., Matsumoto, Y., Nakayama, T., Tsunoda, T., Suzuki, T., Monden, M., Saitoh, Y., Yamauchi, H., & Ogata, Y. (1999). The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection. *Surg Today*, *29*, 16-22.
- Rieder, H., & Bartsch, D. K. (2004). Familial pancreatic cancer. *Fam Cancer*, *3*, 69-74.
- Risch, H. A. (2003). Etiology of pancreatic cancer, with a hypothesis concerning the role of N-nitroso compounds and excess gastric acidity. *J Natl Cancer Inst*, *95*, 948-960.
- S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. In. (2013) *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF)* (Vol. Langversion 1.0).
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*, *10*, 1361-1368.
- Sharma, C., Eltawil, K. M., Renfrew, P. D., Walsh, M. J., & Molinari, M. (2011). Advances in diagnosis, treatment and palliation of pancreatic carcinoma: 1990-2010. *World J Gastroenterol*, *17*, 867-897.
- Shin, S. H., Kim, S. C., Hong, S. M., Kim, Y. H., Song, K. B., Park, K. M., & Lee, Y. J. (2013). Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival. *Pancreas*, *42*, 216-222.
- Siewert, J. R., Rothmud, M., Schumpelick, V. (2010). Praxis der Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie. In (Vol. 3. Auflage, pp. 918). Heidelberg: Springer Verlag.
- Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*, *846*, 1-12.

- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C., & International Union against Cancer. (2010). *TNM classification of malignant tumours* (7th ed.). Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Takahashi, T., Ishikura, H., Kato, H., Tanabe, T., & Yoshiki, T. (1992). Intra-pancreatic, extra-tumoral perineural invasion (nex). An indicator for the presence of retroperitoneal neural plexus invasion by pancreas carcinoma. *Acta Pathol Jpn*, 42, 99-103.
- Terenghi, G. (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*, 194 (Pt 1), 1-14.
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Buchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*, 91, 586-594.
- Wang, W., Zhao, H., Zhang, S., Kang, E., Chen, Y., Ni, C., & Zhu, M. (2009). Patterns of expression and function of the p75(NGFR) protein in pancreatic cancer cells and tumours. *Eur J Surg Oncol*, 35, 826-832.
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., & Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 17, 2419-2428.
- Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M. W., & Friess, H. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog*, 35, 138-147.
- Zhu, Z. W., Friess, H., Wang, L., Bogardus, T., Korc, M., Kleeff, J., & Buchler, M. W. (2001). Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 7, 105-112.

8. Danksagung

Über die Jahre, in welchen diese Arbeit entstanden ist, haben eine Vielzahl an Menschen mein Leben geprägt und mir nicht nur bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen, sondern auch mich verändert und mir geholfen zu dem Menschen zu werden der ich heute bin. Dafür möchte ich allen danken, auch denen, die möglicherweise nicht in der nachfolgenden Aufzählung erwähnt werden.

Zuallererst möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden. Durch Ihren Glauben an mich haben sie mich zu einer Person erzogen, die weiß, dass man alles erreichen kann wenn man genug Willen und Durchhaltevermögen mitbringt.

Mein Doktorvater Güralp Onur Ceyhan hat mich stets gefördert und unterstützt. Er hat meinen Forschergeist entflammt und ihm stets Antrieb gegeben. Er hat mich ermutigt auch in erfolglosen Phasen durchzuhalten und weiterzumachen. Einen besseren Mentor hätte ich mir in meiner Phase des wissenschaftlichen Arbeitens nicht vorstellen können. Sein uneingeschränkter Glaube an mich hat mich stets weiter angetrieben. Durch sein Mitwirken und seine Förderung hatte ich Möglichkeiten die mir in anderen Arbeitsgruppen sicherlich verwehrt geblieben wären. Doch er unterstütze mich nicht nur auf wissenschaftlicher Ebene, durch seine herzliche Art schaffte er es auch aus einer Laborgruppe eine Familie zu machen und gemeinsame Kongresse waren stets neben der vielen Arbeit geprägt von viel Spass und einem enormen Gemeinschaftsgefühl. Gerade deshalb hat mich diese Zeit enorm geprägt und ich bin Güralp sehr dankbar diesen Abschnitt meines Lebens mit Ihm und seiner Arbeitsgruppe verbracht zu haben.

Ekin Demir, mein Betreuer. Er hat mir das Bild eines Wissenschaftlers vorgelebt. Seine intrinsische Wissbegierigkeit Neues zu entdecken hat mich zutiefst beeindruckt. Sein Enthusiasmus für die Grundlagenforschung hat nicht nur mich sondern auch andere angesteckt. Die Idee dieser Arbeit ist ihm zu verdanken, denn er hört nie auf sich zu fragen

Danksagung

warum gewisse Dinge sind wie sie sind und den Beobachtungen auf den Grund zu gehen. Vielen Dank!

Unser biologischer Mitarbeiter Timo Kehl hat mir aufgezeigt, wie strukturiertes Arbeiten im wissenschaftlichen Labor aussieht. Insbesondere seine Motivation und seine Wissens zu methodischem Vorgehen haben meine Arbeit sehr bereichert.

Melanie Laschinger, die uns Ihr Labor zur Verfügung gestellt hat und uns somit die ersten Schritte zur Entwicklung einer neuen Methode ermöglichte. Doch nicht nur das, sie stand auch stets mit Rat und Tat an unserer Seite.

Unsere MTA Ulrike, die stets ein offenes Ohr für Probleme hatte und sich für das “drum herum“ gekümmert hat.

Meine Schwester. Einer der Personen die sich täglich meine Erzählungen aus dem Alltag des Laborlebens anhörte. Die mich stets ermutigte auch in Zeiten in denen kein Ende in Sicht war durchzuhalten.

Und zuletzt danke ich meinem Freund Thomas. Ihm gebührt ein besonderer Dank. Er hat mich während der Zeit des experimentellen Arbeitens stets unterstützt und mich stetig ermutigt weiterzumachen, auch wenn dadurch gemeinsame Stunden teilweise rar waren.