



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
**Fakultät für Medizin**  
**Pankreas-Forschungslabor**  
**Chirurgische Klinik und Poliklinik**  
**Klinikum rechts der Isar**

**Vergleichende Analyse des Tumorstromas beim pankreatischen  
duktalen Adenokarzinom beim Menschen und bei genetisch  
modifizierten Mausmodellen**

**Laura Kathrin Wanner**

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Mert Erkan
2. Prof. Dr. Helmut Friess

Die Dissertation wurde am 21.02.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.01.2020 angenommen.

*Meinen Eltern.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>5</b>
<b>1 ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
2.1 Epidemiologie und Klinik des Pankreaskarzinoms .....	10
2.2 Pankreaskarzinogenese .....	16
2.3 Pankreatische Sternzellen und Tumormikroumgebung.....	17
2.4 Genetisch modifizierte Mausmodelle (GEMM).....	21
2.5 Therapie .....	23
2.6 Zielsetzung.....	29
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
3.1 MATERIALIEN .....	31
3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	31
3.1.2. Verwendete Protein- Leiter.....	33
3.1.3. Verwendete Puffer, Lösungen und Medien .....	33
3.1.4. Verwendete Medien und Zusätze.....	34
3.1.5 Verwendete Geräte .....	35
3.1.6. Verbrauchsmaterialien .....	36
3.1.7 Verwendete Antikörper.....	37
3.1.7.1 Westernblot .....	37
3.1.7.2 Immunfluoreszenz .....	38
3.1.7.3 Immunhistochemie (humanes und murines Gewebe) .....	38
3.1.8 Verwendete Kits.....	39
3.1.9 Verwendete Software.....	39
3.1.10 Biologische Materialien .....	39
3.2 METHODEN.....	40
3.2.1 Humane Pankreas-Gewebeproben und klinische Daten .....	40
3.2.2 Humane Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	41
3.2.3 Primäre humane pankreatische Sternzellen - Isolation und Kultur.....	41
3.2.4 Ex-vivo Mausmodelle .....	42
3.2.5 Immunhistochemie (IHC).....	43
3.2.6 Quantitative Bildanalyse.....	46

---

3.2.7	Bestimmung der Proliferationsraten .....	47
3.2.8	Protein-Isolation und Westernblot (WB) .....	48
3.2.9	Immunfluoreszenz (IF) .....	49
3.2.10	Tumorzellproliferation unter Nährstoff-Entzug .....	50
3.2.11	Densitometrie .....	51
3.2.12	Statistik .....	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
4.1	Humanes Gewebe.....	52
4.1.1	Immunhistochemische Analyse .....	52
4.1.2	Proliferationsmuster von pankreatischen Tumor- und Sternzellen.....	54
4.1.3	Korrelation von PSC-Proliferation und $\alpha$ SMA-Expression in kultivierten primären humanen pankreatischen Sternzellen.....	58
4.1.4	Korrelation von Tumor- und Sternzellproliferation mit klinisch-pathologischen Parametern .....	60
4.1.5	Korrelation der klinischen und pathologischen Parameter mit dem Überleben der Patienten: .....	63
4.1.6	Einfluss der verschiedenen ESPI-Fractionen auf das Überleben.....	65
4.2	Murines Gewebe .....	70
4.2.1	Immunhistochemische Analyse .....	70
4.2.2	Proliferationsmuster von pankreatischen Tumor- und Sternzellen bei verschiedenen GEMMs .....	73
4.2.3	Korrelation der pathologischen Parameter mit dem Überleben von ck- und ckp-Mäusen .....	78
4.3	Vergleich von humanem und murinem Gewebe hinsichtlich Zellproliferation und Fibrose .....	80
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>103</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>131</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>132</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	Alpha smooth muscle actin
Ab	Antikörper
ABC	Avidin-biotin complex
ASI	Activated Stroma Index
BCA	Bicinchoninsäure
BRCA 1/2	Breast Cancer Gene 1/2
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
CCL2	Chemical Chemokine 2
CD40	Cluster of differentiation molecule 40
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
c-MET	Tyrosine-protein kinase Met
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSC	Tumorstammzelle(n)
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMBA	Dimethylbenzoanthracen
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	Dots per inch
ECL	Enhanced chemoilluminescence
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
EDTA	Ethylenediamintetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESPI	Epithelial Stromal Proliferation Index
FAP	Fibroblast Activation Protein
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEMM	Genetisch modifizierte Mausmodelle

---

h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER-2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HIF 1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish peroxidase
IB	Immuno-blotting
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LB-Medium	Lysogeny broth (Medium)
LDH-A	Laktatdehydrogenase A
LDS	Lithium dodecyl sulfat
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
nM	Nanomol
OD	Optical density
OSF-2	Osteoblast-Specific Factor 2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie

---

PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCC	Pankreatische Tumorzelle(n)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDX	Patient-derived Xenograft
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSC	Pankreatische Sternzelle(n)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
RtU	Ready to use
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SEM	Standard error of the mean
SM	Standard medium
TBS	Tris-gepufferte Lösung (Tris-buffered saline)
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Units
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot

---

## 1 ABSTRACT

**Hintergrund und Zielsetzung:** Neuere experimentelle und klinische Daten widersprechen der gemeinhin anerkannten Tumor-supportiven Rolle des Stromas des pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC). In unserer Studie wurde der Einfluss der Proliferation Stroma-produzierender pankreatischer Sternzellen (PSC) auf die Tumorbilogie beim Menschen sowie bei genetisch modifizierten Mausmodellen (GEMM) untersucht.

**Methoden:** Das Gewebe von 72 PDAC-Patienten sowie von  $K\text{-ras}^{+/LSL\text{-G12D}} Ptf1a^{+/Cre-}$  (n=20) und von  $K\text{-ras}^{+/LSL\text{-G12D}} p53^{fl} Ptf1a^{+/Cre-}$  (n=41) Mäusen wurde hinsichtlich Tumor- und Sternzell-Proliferation,  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression sowie Kollagenablagerung analysiert. Primäre humane pankreatische Sternzellen wurden verwendet, um die Korrelation von Sternzellproliferation und  $\alpha$ SMA-Expression ex vivo zu verifizieren. Der Epithelial Stromal Proliferation Index (ESPI) wurde als das Verhältnis der Ki67-Expression von Tumorzellen zur Ki67-Expression von pankreatischen Sternzellen definiert. Für die Überlebenszeitanalysen wurde die Kaplan-Meier Methode verwendet. Ergebnisse wurden mit dem Log-Rank Test verglichen. Prognostische Faktoren wurden in einer multivariablen Analyse mittels Cox-Regressionsanalyse ermittelt.

**Ergebnisse:** Die Proliferationsrate der Sternzellen spiegelt sowohl in humanem Gewebe als auch bei den Mausmodellen die der Tumorzellen wider. Beim Menschen weist die Proliferationsrate der PSCs eine signifikant inverse Korrelation mit ihrer  $\alpha$ SMA-Expression auf. Bei Patienten mit einem  $ESPI \leq 2$  (28%) zeigt sich eine deutlich geringere  $\alpha$ SMA-Expression und Kollagen-Ablagerung als bei Patienten mit einem  $ESPI > 2$ . Die Patienten sind älter; sie weisen seltener Metastasen und häufiger gut differenzierte Tumoren auf, verbunden mit einem dreifach längeren Überleben (40

---

Monate vs 13 Monate,  $p=0.025$ ). Mehr als 85% der  $K\text{-ras}^{+/LSL\text{-G12D}}$   $p53^{\text{fl}}$   $Ptf1a^{+/Cre-}$  Mäuse haben einen ESPI  $\leq 2$ ; GEMMs weisen weniger proliferative Tumoren mit geringerer  $\alpha\text{SMA}$ - und Periostin-Expression und höherer Kollagenablagerung auf.

**Schlussfolgerungen:** Die Beschaffenheit des Tumorstromas beim humanen PDAC ist nicht einheitlich. Bestimmte Ausprägungen können einen protektiven Effekt haben; eine antifibrotische Therapie wäre bei diesen Patienten somit kontraproduktiv. Bei Patienten, bei denen die Sternzellproliferation nicht mit der der Tumorzellen mithalten kann, sinkt das Überleben signifikant ab. Ein ESPI  $\leq 2$  ist ein neuer unabhängiger prognostischer Faktor beim PDAC. Zwischen humanem und murinem Stroma bestehen signifikante Unterschiede. Humane Tumore haben höhere Proliferationsraten und höhere ESPI als murine Tumoren. In Bezug auf das Tumorstroma beim PDAC können Ergebnisse an GEMMs somit nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen werden.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Epidemiologie und Klinik des Pankreaskarzinoms

Bauchspeicheldrüsenkrebs ist eine der verheerendsten Diagnosen, die einem Patienten derzeit gestellt werden können. Insgesamt tritt die Erkrankung eher selten auf: Laut Zahlen des Robert-Koch Institutes erkranken in der Bundesrepublik Deutschland jährlich etwa 13 von 100.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom (Robert-Koch Institut 2016). Dabei stieg die Inzidenzrate im Laufe der letzten zehn Jahre langsam an (Siegel, Miller et al. 2015).

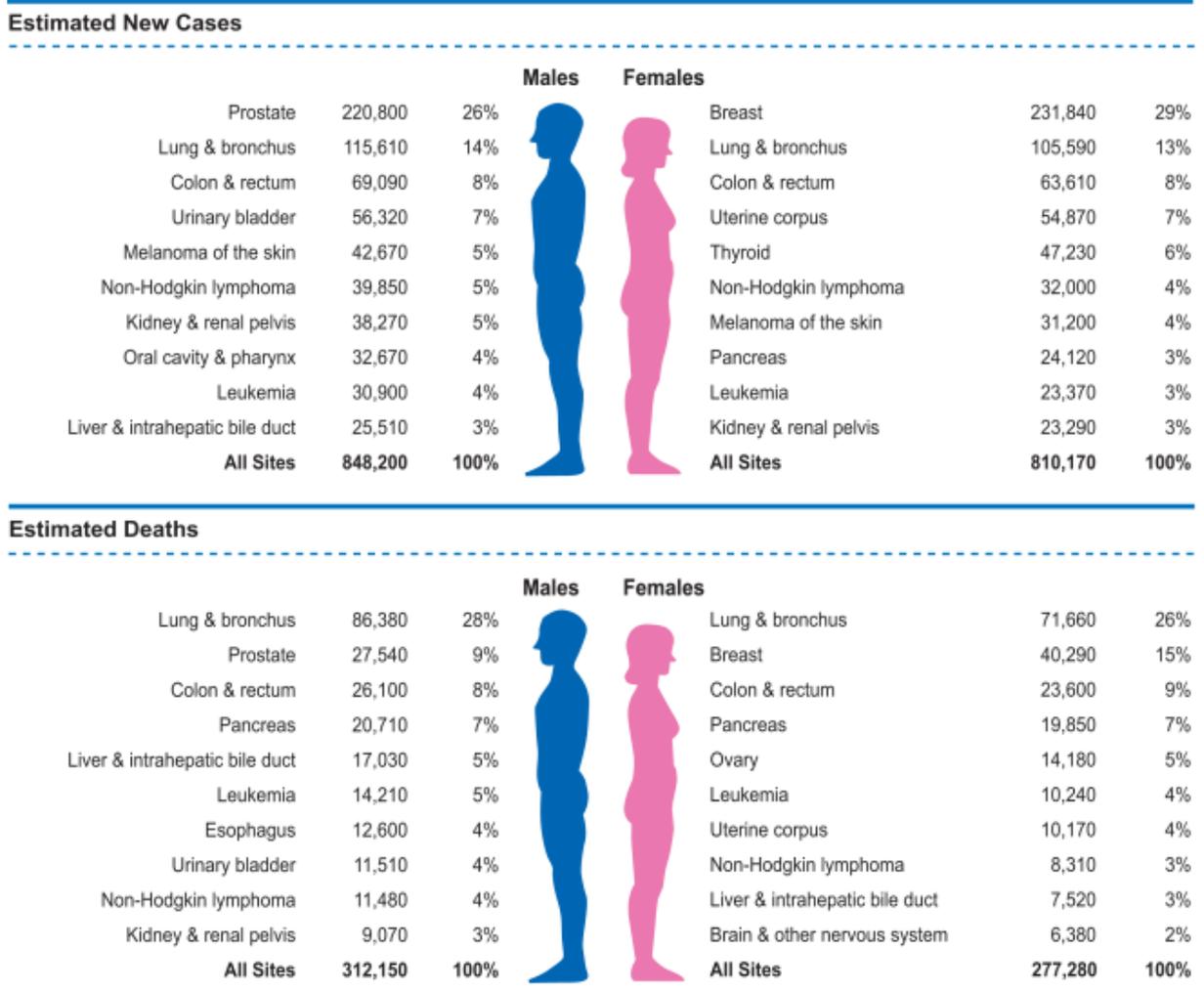
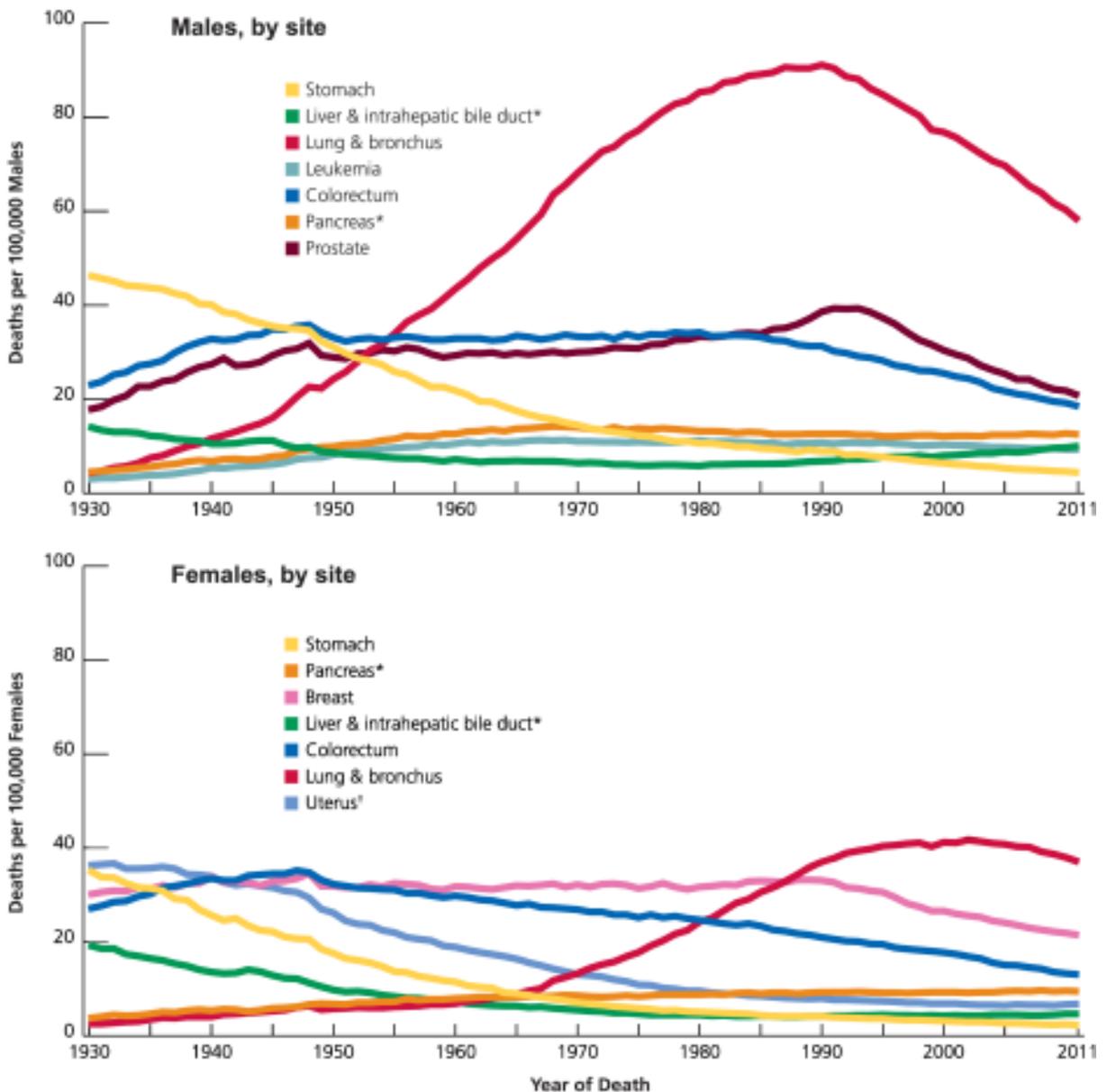


Abbildung 1 Die zehn häufigsten Malignomentitäten bezüglich Inzidenz und Todesfällen, nach Geschlechtern unterteilt, USA, 2015. Aus: Cancer Statistics, 2015 (Siegel et al. 2015).

---

Die Betroffenen haben nach Diagnosestellung eine sehr niedrige Lebenserwartung. Das mediane Gesamtüberleben liegt bei etwa 4-8 Monaten (Kleeff, Beckhove et al. 2007, Giuliani, Piacentini et al. 2015). Dabei entspricht die Sterberate des Pankreaskarzinoms nahezu der Inzidenzrate (Bray, Ferlay et al. 2018). **Abbildung 1** veranschaulicht diesen Zusammenhang: In den USA liegt Bauchspeicheldrüsenkrebs bei Frauen auf Platz 8 der neu diagnostizierten Karzinome. Bei Männern liegt die Erkrankung derzeit auf Platz 11. Gleichzeitig ist das Pankreaskarzinom jedoch mit 7% aller Krebstodesfälle sowohl bei Frauen als auch bei Männern die vierthäufigste Krebstodesursache (Siegel, Miller et al. 2015). Dabei nahmen die Todesfälle durch Bauchspeicheldrüsenkrebs in den letzten Jahrzehnten stetig zu (**Abbildung 2**). Von 2009 bis 2015 stieg die Rate bei Männern um 4%, bei Frauen um 5% an (Malvezzi, Bertuccio et al. 2015). Prognosen gehen von einer weiteren deutlichen Zunahme der durch Bauchspeicheldrüsenkrebs bedingten Todesfälle aus: Es wird angenommen, dass das Pankreaskarzinom noch vor 2030 zur zweithäufigsten Krebstodesursache aufsteigen wird (Rahib, Smith et al. 2014). Die Überlebensrate hat sich in den letzten 40 Jahren im Gegensatz zu vielen anderen Krebserkrankungen, deren Prognose sich z.B. durch bessere Therapieoptionen oder gezielte Früherkennungsmaßnahmen besserte, nur leicht verbessert (Ferlay, Partensky et al. 2016, Bray, Ferlay et al. 2018). Seit 1975 stieg das 5-Jahres-Überleben von 3% auf 5-7% (Bosetti, Bertuccio et al. 2012, Siegel, Miller et al. 2015, Siegel, Miller et al. 2018).



**Abbildung 2** Todesfälle durch maligne Erkrankungen in den USA im Verlauf von 1930 bis 2011. Aus: Cancer Statistics, 2015 (Siegel et al. 2015).

Das Pankreaskarzinom ist charakterisiert durch seinen schnellen Progress, aggressive Invasion von umgebendem Gewebe und früher Metastasierung. Die Diagnose in frühen Stadien ist extrem schwierig. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben bereits 52% aller Patienten Fernmetastasen; in 29% bestehen regionale Lymphknotenmetastasen; nur in <10% der Fälle handelt es sich um eine lokalisierte Erkrankung (American Cancer Society 2015, Siegel, Miller et al. 2015).

---

Eine Ursache hierfür sind die sehr unspezifischen oder auch das gänzliche Fehlen von Symptomen in den initialen Stadien des Pankreaskarzinoms. Neuere Studien zeigen, dass das Neuauftreten eines Diabetes mellitus („New-onset“ Diabetes mellitus) eine frühe Manifestationsform des Pankreaskarzinoms darstellen kann (Chari, Leibson et al. 2008, Pannala, Leirness et al. 2008, Andersen, Korc et al. 2017). So wird bei etwa einem Prozent der Patienten mit New-onset Diabetes mellitus nach dem 50. Lebensjahr innerhalb von drei Jahren ein Pankreaskarzinom diagnostiziert (Sharma, Kandlakunta et al. 2018). Bislang wird die Erkrankung jedoch meist erst in fortgeschritteneren Stadien durch das Auftreten von klinischen Symptomen primär durch den raumfordernden Effekt bei steigender Tumorlast erkannt. Da die meisten Pankreaskarzinome im Pankreaskopf auftreten (ca. 75%), ist ein charakteristischer Hinweis auf die Erkrankung ein schmerzloser Ikterus durch Obstruktion der abführenden Gallengänge. Die betroffenen Patienten bemerken typischerweise eine Dunkelfärbung des Urins, Entfärbung des Stuhls, Juckreiz und eine veränderte Pigmentierung der Haut. Auch Gewichtsverlust ist eine typische Erscheinung bei Bauchspeicheldrüsenkrebs. Dieser kann dabei durch ein tumorbedingtes Anorexie-Kachexie-Syndrom oder durch eine Malabsorption aufgrund der beeinträchtigten exokrinen Funktion des Pankreas entstehen, wobei typischerweise eine Steatorrhoe auftritt. Auch epigastrische Schmerzen sind ein klassisches Symptom des Pankreaskarzinoms, wobei die Spanne von leichtem dumpfen Schmerz bis hin zu stärksten Schmerzen reicht. Die Ausstrahlung des Schmerzes in den Rücken weist dabei auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Invasion des retroperitonealen Nervenplexus hin.

Histologisch wird das Pankreaskarzinom in verschiedene Formen unterteilt, von denen das pankreatische duktales Adenokarzinom (PDAC) mit über 85% die mit Abstand häufigste Entität darstellt. Zu den selteneren epithelialen Neoplasien des exokrinen

---

Pankreas zählen unter anderem Azinuszellkarzinome, muzinöse oder seröse Zystadenokarzinome und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN). Endokrine Pankreastumore sind sehr selten und machen nur 1-2% der Fälle aus. Am häufigsten sind Männer zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr von der Erkrankung betroffen, wobei das Risiko mit zunehmendem Alter ansteigt.

Über die Ätiologie der Krankheit ist bislang wenig bekannt. Der wichtigste bisher identifizierte Risikofaktor ist das Rauchen, das für ca. 30% der Fälle verantwortlich gemacht wird (Fuchs, Colditz et al. 1996, Bosetti, Bertuccio et al. 2012, Seufferlein, Porzner et al. 2013, Malvezzi, Bertuccio et al. 2015). Bei bis zu 10% der Patienten besteht eine positive Familienanamnese für Bauchspeicheldrüsenkrebs (Tersmette, Petersen et al. 2001). Adipositas (Michaud, Giovannucci et al. 2001), Diabetes (Everhart and Wright 1995, Li 2012), seltene erbliche Tumorsyndrome (Lynch and Fusaro 1991, Petersen, de Andrade et al. 2006, Greer, Whitcomb et al. 2007, Groen, Roos et al. 2008) und chronische Pankreatitis (Lowenfels, Maisonneuve et al. 1993, Lowenfels and Maisonneuve 2002, Malka, Hammel et al. 2002) sind weitere bekannte Risikofaktoren.

Das Pankreaskarzinom wird nach TNM-Klassifikation eingeteilt (vgl. **Tabelle 1**). Therapie der Wahl ist die operative Resektion in Kombination mit Chemotherapie. Die Resektion ist aufgrund der häufig lokal fortgeschrittenen Befunde jedoch nur in 15-20% der Fälle möglich ist (Li, Xie et al. 2004, Wagner, Redaelli et al. 2004). Bei einer Resektion im Gesunden (R0) besteht für den Patienten die größte Chance auf ein Langzeitüberleben (Wagner, Redaelli et al. 2004, Fusai, Warnaar et al. 2008, Hartwig, Hackert et al. 2011).

**Tabelle 1: TNM-Staging des Pankreaskarzinoms.** Aus TNM-Klassifikation maligner Tumoren (Wittekind 2010).

T1	Tumor auf das Pankreas begrenzt, < 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor auf das Pankreas begrenzt, > 2 cm in größter Ausdehnung
T3	Ausbreitung jenseits des Pankreas, jedoch ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der A. mesenterica superior
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior
N0	Kein regionärer Lymphknotenbefall
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen (Lymphknoten peripankreatisch, pankreatikoduodenal, pylorisch, am Milzhilus, proximal mesenterial und zöliakal)
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen (Leber, Lunge, Knochen, Gehirn)

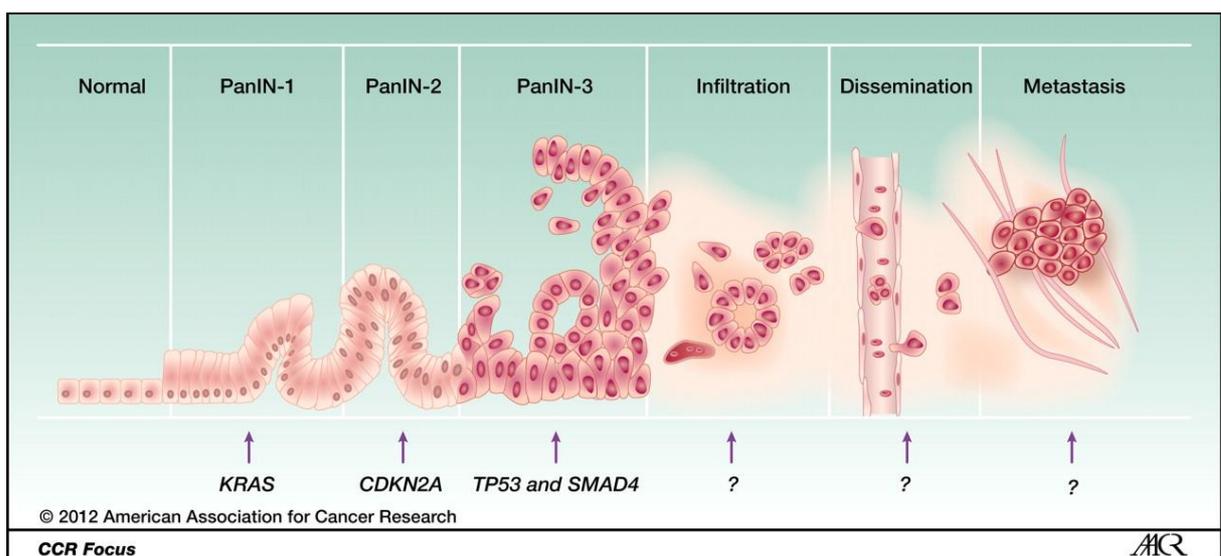
Das PDAC ist die einzige Tumorentität, bei der ein T3- von einem T4- Karzinom nicht durch die Infiltration in benachbarte Organe, sondern ausschließlich durch die Infiltration der großen arteriellen Gefäße (A. mesenterica superior und Truncus coeliacus) differenziert wird. Die Resektabilität, d. h. die Indikation zur chirurgischen Therapie und damit die Möglichkeit für eine signifikante Überlebensverbesserung, wird somit ausschließlich vom Gefäßbezug abhängig gemacht.

Das mediane Überleben nach Operation wird derzeit jedoch ebenfalls nur mit 20 bis 27 Monaten angegeben (Salem, Alfi et al. 2015, Yamamoto, Yagi et al. 2015). In über 40% der Fälle tritt ein Lokalrezidiv mit oder ohne Nachweis einer Fernmetastasierung auf; in weiteren ca. 50% der Fälle werden Fernmetastasen detektiert (Oettle, Post et al. 2007). In palliativen Situationen werden Chemotherapie und vor allem in den USA auch Strahlentherapie eingesetzt, mit häufig jedoch nur geringem Therapieansprechen (Verslype, Van Cutsem et al. 2007). In den letzten Jahren wurden neue Kombinationstherapien entwickelt, beispielsweise FOLFIRINOX, eine Kombination aus 5-Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (Conroy, Desseigne et al. 2011, Gourgou-Bourgade, Bascoul-Mollevi et al. 2013). Diese Kombinationstherapien zeigten eine leichte Verbesserung des Überlebens, jedoch weiterhin mit 1-Jahres-Überlebensraten von unter 60% (Vaccaro, Sperduti et al. 2015, de Jesus, Camandaroba et al. 2018).

---

## 2.2 Pankreaskarzinogenese

Analog zum Adenom-Karzinom-Modell des kolorektalen Karzinoms nach Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990) wird heute angenommen, dass die Entwicklung des Pankreaskarzinoms das Ergebnis einer schrittweisen Akkumulation von Genmutationen darstellt und über prämaligne Vorstufen verläuft (Cubilla and Fitzgerald 1976, Hruban, Goggins et al. 2000, Hidalgo 2010). Die mit in 74 - 100% am häufigsten vorkommende Mutation in PDACs ist die Aktivierung des Onkogens K-ras (Hruban, van Mansfeld et al. 1993, Dergham, Dugan et al. 1997). Häufig zeigen sich auch eine Inaktivierung der Tumorsuppressoren p16 (Hu, Watanabe et al. 1997), TP53 (Li, Bhuiyan et al. 1998, Dong, Dong et al. 2007) und SMAD4 (Hua, Zhang et al. 2003) sowie eine Aktivierung von HER-2/neu (Dugan, Dergham et al. 1997, Safran, Steinhoff et al. 2001). Diese Mutationen in den Protoonko- und Tumorsuppressorgenen scheinen das regulatorische Gleichgewicht des Zellwachstums zu stören und somit maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt zu sein. Im Jahr 2001 wurde vom National Cancer Institute (NCI) der Terminus „Pankreatische intraepitheliale Neoplasie“ (PanIN) für die prämaligen Vorstufen im duktalem Epithel des Pankreas eingeführt. PanIN-Läsionen werden in die Grade 1 - 3 unterteilt, wobei PanIN 1 als Epithelläsionen ohne oder mit minimalen Atypien und PanIN 2 als Läsionen mit moderaten Atypien definiert werden. PanIN 3 Läsionen weisen bereits histopathologische Kriterien eines Carcinoma-in-situ mit nukleären Atypien, Verlust der Zellpolarität und gesteigerter Mitose auf (Kern, Hruban et al. 2001, Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012). Die Basalmembran ist hier jedoch noch erhalten (**Abbildung 3**). In 30 – 50% der Fälle eines invasiven duktalem Pankreaskarzinoms sind PanIN 3 Läsionen nachweisbar (Hruban, Adsay et al. 2001, Hruban, Takaori et al. 2004).



**Abbildung 3 Progressionsmodell für die Entstehung des Pankreaskarzinoms.** Progression über eine schrittweise Akkumulation von Genmutationen von gesunden Zellen bis hin zu metastasierten Karzinomzellen. Bei PanIN 3 Läsionen ist die Basalmembran noch erhalten. Aus: Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing (Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012), basierend auf einer Illustration von Bona Kim.

### 2.3 Pankreatische Sternzellen und Tumormikroumgebung

Pankreatische Stern- oder Stellatumzellen sind Vitamin A- speichernde Zellen mit langen zytoplasmatischen Ausläufern, die sich im normalen Pankreas hauptsächlich in den periazinären Arealen befinden und in nicht aktiviertem Zustand etwa 4% der Gesamtpopulation aller Pankreaszellen ausmachen. PSCs ähneln den hepatischen Sternzellen zellmorphologisch und funktionell und es wird angenommen, dass diese Zellen eine gemeinsame Vorläuferzelle haben (Erkan, Weis et al. 2010). Pankreatische Sternzellen stellen eine wichtige Komponente der Tumormikroumgebung beim Pankreaskarzinom dar. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen als Folge einer Schädigung des Pankreas führt zu einem Verlust der charakteristischen Vitamin A enthaltenden Fetteinschlüsse im

---

Zytoplasma sowie zu einer Transformation der PSCs zu sogenannten Myofibroblasten, welche durch die Expression von  $\alpha$ SMA, Migration und die Synthese von Extrazellulärmatrix-Proteinen (u.a. Kollagen Typ 1, Kollagen Typ 3, Fibronectin und Hyaluronsäure) gekennzeichnet sind (Apte, Haber et al. 1998, Bachem, Schneider et al. 1998). Während bei der akuten Pankreatitis nur eine transiente Aktivierung der PSCs stattfindet, werden diese Zellen bei chronisch entzündlichen Prozessen sowie beim pankreatischen duktalem Adenokarzinom dauerhaft aktiviert, wodurch es zu einer überschießenden Bindegewebsablagerung kommt. Durch diese Fibrosierung sowie durch die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen wird die Organfunktion insbesondere in den periazinären Bereichen deutlich gestört (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2009, Samkharadze, Erkan et al. 2011). Es kommt zu einer zunehmenden Hypovaskularisierung und Hypoxie des Gewebes (Koong, Mehta et al. 2000). Eine solche ausgeprägte desmoplastische Reaktion des umgebenden Pankreasstromas ist typisch für das PDAC. Das Stroma macht beim PDAC den größten Teil der Tumormasse aus und das PDAC ist somit eine der stromareichsten Karzinomentitäten. Frühere Studien zeigten bereits die wichtige Rolle der Tumor-Mikroumgebung hinsichtlich der klinischen Manifestation des Tumors bei anderen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom (Cheng, Bhowmick et al. 2005) und dem Prostatakarzinom (Tuxhorn, Ayala et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl von Zellen als auch von Proteinen der Extrazellulärmatrix ausgehende Signale einen Einfluss auf das Wachstum, die Invasion und die Angiogenese des Tumors haben. Ein solcher Zusammenhang wird auch beim Pankreaskarzinom angenommen: 2008 untersuchten Hwang et al. den Einfluss von humanen pankreatischen Sternzellen auf pankreatische Tumorzellen in vitro und in vivo bei einem orthotopen Mausmodell des Pankreaskarzinoms. In Abhängigkeit der Menge der applizierten Sternzellen erhöhten sich die primäre Tumorzinzidenz, Tumorgöße, -proliferation, -metastasierung sowie

---

auch die Chemoresistenz (Hwang, Moore et al. 2008). Umfangreiche Daten weiterer Studien im Sinne von ex vivo- Beobachtungen, in vitro- Experimenten und Untersuchungen genetisch modifizierter Mausmodelle (GEMM) unterstützen diese These einer Tumor-supportiven Rolle der pankreatischen Sternzellen – u.a. durch Sekretion diverser Wachstumsfaktoren und Zytokine wie Epidermal growth factor (EGF), Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Periostin, Kollagen Typ I und Platelet-derived growth factor (PDGF) - sowie der Extrazellulärmatrix (Omary, Lugea et al. 2007, Duner, Lopatko Lindman et al. 2010, Paron, Berchtold et al. 2011, Apte and Wilson 2012, Erkan, Hausmann et al. 2012, Kadaba, Birke et al. 2013, Mehner, Miller et al. 2014). Als ein weiterer wichtiger Mechanismus wird dabei die Beeinträchtigung der Blutversorgung des pankreatischen Gewebes durch mechanische Kompression der Gefäße durch die Anhäufung von ECM-Bestandteilen und Stromazellen angesehen (Gharibi, Adamian et al. 2016). Dies führt zum einen zu einem verminderten Anfluten von Chemotherapeutika im Tumorgewebe (Neesse, Michl et al. 2011). Zum anderen kommt es durch die verminderte Vaskularisierung zu einer Anpassung des Metabolismus der Karzinomzellen an den Nährstoffmangel, was ihre Chemoresistenz und auch ihre Resistenz auf Radiotherapie erhöht (Erkan, Kleeff et al. 2005, Hiraoka, Ino et al. 2010, Le, Rajeshkumar et al. 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein solcher Nährstoffmangel beziehungsweise eine Minderperfusion auch die invasive Kapazität von Tumorzellen erhöht, wobei die genauen molekularen Mechanismen unklar sind; so nimmt die Metastasierung von Tumoren zu, wenn Tumorzellverbände zu groß für die lokale Gefäßperfusion werden (Erkan, Kurtoglu et al. 2016) (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). Im Gegenzug scheinen Pankreaskarzinomzellen unter anderem durch die Produktion von Stroma-modulierenden Wachstumsfaktoren (u.a. Transforming growth factor-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), PDGF, Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Fibroblast growth factor- 2

---

(FGF-2)) die Entstehung einer solchen Tumor-supportiven Mikroumgebung zu fördern (Mueller and Fusenig 2004, Erkan, Kleeff et al. 2007, Vonlaufen, Joshi et al. 2008, Duner, Lopatko Lindman et al. 2010). Die Interaktionen zwischen pankreatischen Karzinom- und Sternzellen stellen somit einen komplexen Mechanismus dar, welcher das Fortschreiten des Tumors bedeutend beeinflusst (Mueller and Fusenig 2004, Omary, Lugea et al. 2007).

Viele Aspekte dieser Tumor-Stroma-Interaktion beim PDAC und ihre Auswirkungen auf das Tumorverhalten sind allerdings noch unklar. Einige, vor allem auch neuere Studien weisen darauf hin, dass das Stroma nicht in jedem Fall einen Tumor-supportiven Faktor darstellt, sondern sich im Gegenteil sogar protektiv auswirken kann (Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014). Ähnlich wie bei der Wundheilung entspricht die desmoplastische Reaktion beim PDAC einem Abwehrmechanismus des Körpers gegen das Karzinom; der Tumor wird abgekapselt, das lokale Wachstum wird gehemmt und das Karzinom somit besser resezierbar. Möglicherweise kann sogar die Konversion einer Vorläuferläsion zu einem invasiven Karzinom verhindert werden (Dvorak 1986, Bissell and Hines 2011, Lu, Weaver et al. 2012, Erkan 2013, Erkan 2013, Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014, Rhim, Oberstein et al. 2014).

Auf die bislang vorherrschende These des generell Tumor-supportiven Stromas zielen viele neue Therapieansätze ab (vgl. **Kapitel 2.5**), jedoch zum Teil mit trotz vielversprechender experimenteller Daten enttäuschenden Resultaten in klinischen Studien (Erkan 2013, Rhim, Oberstein et al. 2014, Bahrami, Khazaei et al. 2017). So musste beispielsweise die erste Phase-II-Studie, die einen Sonic Hedgehog- Inhibitor zur Reduktion des Stromas beim PDAC einsetzte, auf Grund von erhöhter Mortalität im Therapiearm abgebrochen werden (Amakye, Jagani et al. 2013). Auch aktuell laufen klinische Studien an, die eine antifibrotische Therapie mit Chemotherapie kombinieren (Bahrami, Khazaei et al. 2017, Saung and Zheng 2017). Die tatsächliche

---

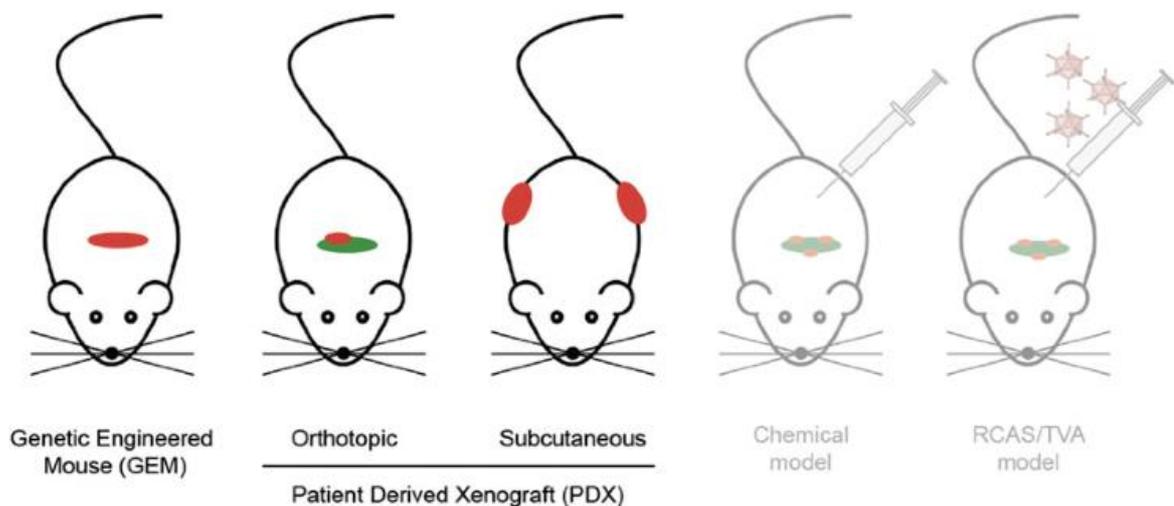
Rolle des Tumorstromas beim Pankreaskarzinom muss also dringend geklärt werden, damit Therapieansätze entsprechend angepasst werden können. Auch müssen die Ursachen für die diskrepanten Ergebnisse zwischen experimentellen Daten und klinischen Untersuchungen weiter abgeklärt werden.

## 2.4 Genetisch modifizierte Mausmodelle (GEMM)

Obwohl die genetischen und molekularen Mechanismen beim Pankreaskarzinom immer besser verstanden werden, hat sich das Überlebens-Outcome bei den betroffenen Patienten bislang nur wenig verbessert. Diese Situation liegt zum Teil auch darin begründet, dass die Methoden, das PDAC präklinisch im Labor zu simulieren, nicht ausreichend mit den realen Gegebenheiten übereinstimmen. In den letzten Jahren wurden einige Tiermodelle für das Pankreaskarzinom entwickelt, welche sowohl die genetischen als auch die morphologischen Veränderungen aufweisen, die zur Entwicklung eines PDAC führen (Mazur, Herner et al. 2015). Diese Modelle werden zunehmend dazu verwendet, die Krankheitsentstehung zu untersuchen, und um diagnostische und therapeutische Ansätze zu charakterisieren und zu validieren (Mazur, Herner et al. 2015). Als State-of-the-art werden dabei aktuell genetisch modifizierte Mausmodelle (GEMM) und Patient-derived Xenograft (PDX)- Modelle angesehen, welche einige Aspekte der Erkrankung am besten rekapitulieren (**Abbildung 4**).

Bei den genetisch modifizierten Mausmodellen (GEMM) wurde initial eine einfache transgene Expression von Onkogenen angewendet. Neuere Modelle verwenden unter anderem die Cre-Lox Technologie, um gewebsspezifische Knockout-Mäuse mit Compound-Mutationen zu erzeugen. Dabei können Pankreas-spezifisch bestimmte Gene, die mit dem humanen PDAC assoziiert werden, aktiviert oder inaktiviert werden.

Die meisten GEMMs basieren auf der Aktivierung des K-ras- Onkogens, das in über 95% der humanen PDACs nachgewiesen werden kann (Tuveson, Shaw et al. 2004, Mazur, Herner et al. 2015). Zwischenzeitlich wurde ein Spektrum verschiedener Gene untersucht, die modifiziert werden können, um verschiedene Aspekte des humanen PDAC nachzuahmen. Dabei wird versucht, durch Modifizieren von Latenz, Aggressivität, Progression und anderen Faktoren spezifische Formen des Pankreaskarzinoms wie undifferenzierte und differenzierte PDACs oder PanIN-Läsionen nachzuempfinden. Therapeutische und präventive Ansätze können so in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung untersucht werden (Guerra and Barbacid 2013, Gopinathan, Morton et al. 2015).



**Abbildung 4 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms.** Genetisch modifizierte Mausmodelle und Xenograft Modelle sind derzeit State-of-the-art und scheinen das humane PDAC am besten zu rekapitulieren. Die in grau dargestellten Modelle werden seltener verwendet (Mazur, Herner et al. 2015). Aus: Mouse Models of Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1267 (Robert Eferl and Emilio Casanova (eds.) 2015).

---

Bei Xenograft-Modellen werden meistens kultivierte humane Pankreaskrebszellen typischerweise heterotop (in den meisten Fällen subcutan) in immundefiziente Mäuse implantiert („indirektes Xenograft-Modell“). Dabei können isolierte genetische Entwicklungen in vivo dargestellt werden, die gesamte Komplexität der Tumoren und ihrer Mikroumgebung wird jedoch nicht erfasst. Um dies besser nachzuempfinden, können Tumorzellen orthotop in das murine Pankreas implantiert werden. Dennoch sagen indirekte Xenograft-Modelle die Wirksamkeit von neuen Therapeutika beim PDAC inkonsistent voraus (Voskoglou-Nomikos, Pater et al. 2003, Van Cutsem, van de Velde et al. 2004). Bei Patient-derived Xenograft (PDX)- Modellen wird humanes Tumorgewebe direkt von Patienten orthotop oder heterotop in immundefiziente Mäuse implantiert. Das Vorliegen von humanem PDAC ist dabei ein wichtiger Vorteil der Methode. Ein großer Nachteil ist jedoch das Fehlen einer Immunreaktion bei den immunsupprimierten Mäusen und somit die fehlende Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen mit dem daraus resultierenden Einfluss auf die Tumorentwicklung.

Bei der chemisch induzierten Kanzerogenese in Tiermodellen werden Substanzen wie z.B. Dimethylbenzoanthracen (DMBA) eingesetzt, um PDAC zu induzieren. Beim RCAS-TVA- Modell wird aviäre retrovirale Transduktion angewendet, um eine somatische Aktivierung der Onkogenexpression im Pankreas zu erzielen (Lewis, Klimstra et al. 2003, Seidler, Schmidt et al. 2008). Die beiden letztgenannten Verfahren (siehe **Abbildung 4** in grau) werden weniger häufig angewendet.

## 2.5 Therapie

Beim PDAC handelt es sich bei Diagnosestellung in etwa 15 - 20% der Fälle um eine in kurativer Intention operable Erkrankung (Neoptolemos, Stocken et al. 2004, Gong, Tuli et al. 2016), wobei die chirurgische Resektion in Kombination mit Chemotherapie

---

dabei auch die einzig mögliche kurative Therapie darstellt. Die Standardverfahren sind die Pankreatikoduodenektomie (Whipple-Verfahren) mit Lymphonodektomie und die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie bei Tumoren des Pankreaskopfes beziehungsweise des Pankreaskörpers oder –schwanzes (Evans, Farnell et al. 2009, Hidalgo 2010, Ryan, Hong et al. 2014). Weitere Verfahren sind die totale Pankreatektomie, die bei Hauptgang- IPMN erfolgen kann, und die Enukeation, die gewöhnlich bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas angewendet wird. Alle diese Operationsverfahren können entweder als offener Eingriff oder mittels laparoskopischer bzw. Roboter-assistierter minimal-invasiver Technik durchgeführt werden.

Die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie erhöht die Überlebensraten im Vergleich zu einer alleinigen Operation bei mikroskopisch tumorfreiem Resektionsrand (R0- Resektion) signifikant – im Schnitt um 7 Monate (Herman, Swartz et al. 2008, Oettle, Neuhaus et al. 2013). Bei R1- Resektion ist dieser Effekt deutlich weniger ausgeprägt (Boeck, Ankerst et al. 2007, Ren, Xu et al. 2012, Liao, Chien et al. 2013, Yu, Zhong et al. 2015).

Die hauptsächlich zum Einsatz kommenden konventionellen Chemotherapeutika sowohl im neoadjuvanten und im adjuvanten Setting sowie auch in fortgeschrittenen Stadien sind Gemcitabin, 5-Fluoruracil, Cisplatin, Capecitabin, Oxaliplatin und Irinotecan (Tempero, Malafa et al. 2017). Die Gemcitabin-Monotherapie stellte mit vergleichsweise geringen Nebenwirkungen lange die Therapie der Wahl in der adjuvanten Situation dar (Burris, Moore et al. 1997). 2016 zeigten die Daten der ESPAC-4-Studie, einer internationalen Multicenterstudie, einen signifikanten Überlebensvorteil bei adjuvanter Kombinationstherapie von Gemcitabin mit Capecitabin im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin (28,0 vs. 25,5 Monate) (Neoptolemos, Palmer et al. 2017).

---

Die Ansprechraten auf diese Therapeutika sind allerdings gering; so zeigte sich in den meisten großen klinischen Studien in fortgeschrittenen Tumorstadien ein Gesamtansprechen nach RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) auf eine Gemcitabin-Monotherapie von unter 12% (Moore, Goldstein et al. 2007, Katz, Fleming et al. 2012, Von Hoff, Ervin et al. 2013, Dalgleish, Stebbing et al. 2016, Barati Bagherabad, Afzaljavan et al. 2017). Eine Studie, die den klinischen Benefit von Gemcitabin untersuchte, zeigte bei nur 23,8% der Patienten eine Verbesserung im Bereich der Parameter Schmerzen, Karnofsky- Index oder Körpergewicht (Burriss, Moore et al. 1997). Als Ursache für das geringe Ansprechen wird hauptsächlich das dichte Stroma angesehen, welches den Tumor abkapselt und so die Medikamentenpenetration zu den Tumorzellen hemmt (Malekigorji 2014, Gkretsi, Zacharia et al. 2017, Li, Hong et al. 2017, Manzur, Oluwasanmi et al. 2017).

Bei Borderline-resektablen, aber auch bei resektablen Befunden mit zusätzlichen Risikofaktoren ist eine neoadjuvante Chemotherapie oder Radiochemotherapie in Betracht zu ziehen (Tempero, Malafa et al. 2017). Beim lokal fortgeschrittenen PDAC wird derzeit zunehmend FOLFIRINOX, ein Regime, das eigentlich in der palliativen Situation angewendet wird, als neoadjuvante Therapie eingesetzt (Schneider, Spath et al. 2017). Bei der Radiochemotherapie stellt die Kombination eines Regimes mit Gemcitabin oder mit Fluoropyrimidin plus Radiatio eine erfolgversprechende neoadjuvante Therapie dar, da Gemcitabin bzw. Fluoropyrimidin eine signifikante Sensibilisierung der Tumorzellen für die Strahlentherapie erzielen kann (Paulson, Tran Cao et al. 2013, Prasanna, Ahmed et al. 2014, Kang, Demaria et al. 2016). Auch hier profitiert jedoch nur ein kleiner Teil des Patientenkollektivs, wobei keine Vorhersage über das Ansprechen getroffen werden kann (Xu, Xue et al. 2014, Cid-Arregui and Juarez 2015).

---

Weniger eindeutig ist die Rolle der adjuvanten Radiochemotherapie (Gong, Tuli et al. 2016): Mehrere Studien zeigten keinen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur alleinigen Operation beziehungsweise zur adjuvanten Chemotherapie bei gleichzeitig höherer Toxizität (Liao, Chien et al. 2013). In Deutschland wird eine adjuvante Radiochemotherapie derzeit laut S3- Leitlinie außerhalb von kontrollierten, randomisierten Studien nicht empfohlen (Seufferlein, Porzner et al. 2013). Bei Patienten mit R1- Resektion scheint jedoch ein geringer Überlebensvorteil zu bestehen (Ren, Xu et al. 2012, Liao, Chien et al. 2013, Morganti, Falconi et al. 2014, Gong, Tuli et al. 2016).

Im palliativen Stadium werden bei Patienten mit gutem Performance Status häufig Kombinationstherapien eingesetzt, die im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie einen marginalen Benefit im Gesamtüberleben zeigen, jedoch auch eine signifikant höhere Toxizität aufweisen (Sun, Ansari et al. 2012, Ciliberto, Botta et al. 2013, Chlamma, Cook et al. 2016). Die Erstlinien-Therapie der Wahl besteht derzeit aus FOLFIRINOX oder aus der Kombination Gemcitabin plus nab-Paclitaxel (Abraxane®) (Kim, Signorovitch et al. 2018).

Nab-Paclitaxel entspricht einer an Albumin gebundenen Nanopartikel-Formulierung von Paclitaxel, wobei Albumin ein effektives Transportprotein für lipophile Moleküle darstellt (Kim, Seo et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von nab-Paclitaxel mit Gemcitabin die intratumorale Gemcitabin-Konzentration erhöht (Von Hoff, Ramanathan et al. 2011, Frese, Neesse et al. 2012). In einer groß angelegten randomisierten Phase-III-Studie kam es gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie zu einer Erhöhung der Ansprechrate von 7 auf 23% sowie zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit im Median um 1,8 Monate (Von Hoff, Ervin et al. 2013). Auch weitere Studien zeigten einen statistisch und klinisch signifikanten Überlebensvorteil und eine signifikante Verbesserung aller sekundären Endpunkte

---

(Vaccaro, Sperduti et al. 2015). Abraxane® wurde 2013 von der Food and Drug Administration zur Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms zugelassen und ist derzeit die einzige nanotechnologische Therapieform zur Behandlung des Pankreaskarzinoms, die Marktreife erlangt hat.

Der einzige bislang zugelassene molekularbiologische Therapieansatz zur Behandlung des Pankreaskarzinoms ist Erlotinib, ein selektiver Tyrosinkinase-Inhibitor des EGF-Rezeptors, in Kombination mit Gemcitabin; bei unselektierten Patienten ergab sich jedoch nur ein minimaler Überlebensvorteil (Kleespies, Jauch et al. 2006, Moore, Goldstein et al. 2007, Barati Bagherabad, Afzaljavan et al. 2017).

Eine Vielzahl weiterer unterschiedlichster neuer gezielter Therapieansätze (Targeted therapy) sind Gegenstand der Forschung.

Viele solcher Ansätze zielen in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika angewendet auf die Beeinträchtigung des Tumorstromas beim Pankreaskarzinom ab (Bahrami, Khazaei et al. 2017, Kanat and Ertas 2018). Ansatzpunkte sind dabei beispielsweise wie bei Erlotinib pro-fibrotische Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , PDGF, EGFR, IGF-1 etc.) (Bhowmick, Chytil et al. 2004, Blaine, Ray et al. 2009, Takikita, Altekruze et al. 2009, Schultheis, Reuter et al. 2017), Matrix-Metalloproteinasen (Moore, Hamm et al. 2003), das Fibroblast Activation Protein (FAP) (Mersmann, Schmidt et al. 2001, Loeffler, Kruger et al. 2006), der Sonic Hedgehog- Signalweg (Olive, Jacobetz et al. 2009, Rhim, Oberstein et al. 2014), der Interleukin-17 Signalweg (McAllister, Bailey et al. 2014), das Renin-Angiotensin System (Kuno, Yamada et al. 2003, Tsang, Cheng et al. 2004, Tsang, Ip et al. 2004, Ulmasov, Xu et al. 2009, Sakurai, Kudo et al. 2011), CD40 als ein immunmodulatorischer Angriffspunkt (Beatty, Torigian et al. 2013) oder der enzymatische Abbau von Hyaluronsäure (PEGPH20) (Provenzano, Cuevas et al. 2012, Strimpakos and Saif 2013, Rucki and Zheng 2014).

---

Weitere aktuelle Ansätze sind beispielsweise der Einsatz von PARP-Inhibitoren bei Patienten mit BRCA 1/2- Mutation (Kaufman, Shapira-Frommer et al. 2015, Bao, Cao et al. 2016, Tempero, Malafa et al. 2017), die Hemmung der Neoangiogenese (Kindler, Ioka et al. 2011, Kindler, Wroblewski et al. 2012, Rougier, Riess et al. 2013, Chiorean, Schneider et al. 2014), die Hemmung der PSC-Aktivität beispielsweise über Inhibition des MAPK-Signalwegs (Kim, Yoo et al. 2009, Masamune and Shimosegawa 2009, Erkan, Adler et al. 2012), der Einsatz von Tocopherolen (Vitamin E) (Rickmann, Vaquero et al. 2007, Li, Lu et al. 2011) und pflanzlichen Polyphenolen wie Ellagsäure (Masamune, Satoh et al. 2005, Suzuki, Masamune et al. 2009), die Hemmung von mit Tumorstammzellen (CSCs) assoziierten Markern wie beispielsweise c-Met (Avan, Quint et al. 2013, Li, Kong et al. 2013) oder der Einsatz von Laktatdehydrogenase A (LDH-A)- Inhibitoren zur Verminderung der Resistenz durch Hypoxie (Maftouh, Avan et al. 2014). Auch das Potential von onkolytischen Adenoviren (Li, Hong et al. 2017), von nanotechnologischen Hilfsmitteln wie Small interfering RNA (siRNA) (Ishiwatari, Sato et al. 2013), und von neuen Taxan-Nanopartikel-Verbindungen wie beispielsweise Cellax-Docetaxel, das im Vergleich zu nab-Paclitaxel zu einer längerfristigen Reduktion der Stroma-Dichte führt (Ernsting, Hoang et al. 2015), ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

Trotz umfangreicher intensiver Forschung und zum Teil auch vielversprechender Ergebnisse in präklinischen Studien ließ sich die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms bislang jedoch nicht wesentlich verbessern (Barati Bagherabad, Afzaljavan et al. 2017, Saung and Zheng 2017).

---

## 2.6 Zielsetzung

Unsere Studie beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Frage, wie es zu dieser Diskrepanz zwischen beeindruckenden Ergebnissen in vitro und in Tierversuchen und der enttäuschenden klinischen Realität kommen kann.

Eine mögliche Ursache hierfür ist der unselektive Einsatz antifibrotisch wirkender Therapeutika, obwohl die Rolle des Tumorstromas als rein Tumor-supportiver Faktor umstritten ist, und das Stroma bei manchen Patienten möglicherweise eine protektive Wirkung aufweist.

Weitere mögliche Ursachen sind ungeeignete Marker zur Erfassung der Veränderungen im Tumorstroma sowie ineffiziente Experimentalsysteme, die die Tumormikroumgebung nicht vergleichbar widerspiegeln.

Das Tumorstroma in humanem PDAC wurde hinsichtlich Tumor- und Sternzell-Proliferation,  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression sowie Kollagenbildung analysiert und der Einfluss auf das Outcome wurde evaluiert. Das Verhältnis von Tumor- zu Sternzell-Proliferation stellt einen neuen unabhängigen prognostischen Faktor beim humanen PDAC dar.

Bei zwei standardmäßig eingesetzten genetisch modifizierten Mausmodellen wurde ebenfalls die Stromaproliferation und deren Einfluss auf die Tumorbilogie analysiert und die Vergleichbarkeit mit humanem Gewebe wurde untersucht.

Primäre humane pankreatische Sternzellen wurden untersucht, um den Zusammenhang zwischen  $\alpha$ SMA-Expression und Sternzell-Proliferation zu evaluieren.

Ein besseres Verständnis der Rolle des Tumorstromas in humanem PDAC ist wesentlich, um neue Therapieansätze entsprechend anzupassen zu können; der Einsatz von Mausmodellen und Markern für die Stromaproliferation kann in Kenntnis

---

der Unterschiede zur in vivo- Situation entsprechend weiterentwickelt und angepasst werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 MATERIALIEN

#### 3.1.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
10% Tris-HCl gels	Bio-Rad
2-Propanol	Roth
50% Ethanol	Hauseigene Apotheke
70% Ethanol	Hauseigene Apotheke
Aceton	Merck
Agar Agar, Kobe I	Roth
Agarose	Roth
Amphotericin	PAA
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Sigma
B27 serum-free supplement	Invitrogen
Bromphenolblau	Sigma
BSA Albumin	Roth
Cell dissociation solution (1x)	Sigma
Citronensäure	Roth
Crystal Violet	Merck
DAB+Chromogen (50x)	DAKO
Dichlormethylenediphosphonic acid disodium salt (Clodronat)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
EDTA	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol 100%	Merck
Ethidiumbromid	Sigma

Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma
Fluoreszenz mounting medium	DAKO
Gemcitabine hydrochlorid	TOCRIS bioscience
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hämatoxylin	Merck
Ham's F12 medium	Invitrogen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
HRP Substrat Buffer	DAKO
Isopropanol (vergällt)	Roth
LB- Medium	Roth
Leupeptin	Sigma
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Mounting Medium	DAKO
Mycoplasma-OFF	Minerva Biolabs
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma
Na-deoxicholat	Sigma
NaF	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natronlauge	Hauseigene Apotheke
NP-40	Sigma
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen
Okadaic acid	Santa Cruz
Paprotrain	AdipoGen
Paraformaldehyd	Roth
Paraformaldehyd (8%)	Hauseigene Apotheke
PBS pH 7.4	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma
Pepstatin A	Sigma
PMSF	Sigma

cOmplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablet	Roche
RNase AWAY	Molecular Biolabs
RNase freies Wasser	Qiagen
Roticlear	Roth
Salzsäure	Hauseigene Apotheke
SDS ultrapure	Roth
Taxol (Paclitaxel)	Sigma
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid	Sigma
Toluidinblau	Merck
Tris Base	Merck
Triton X100	Roth
Trizma Base	Sigma
Trypan Blue Stain 0,4%	GIBCO
Trypsin EDTA solution (1x)	Sigma
Tunicamycin	Sigma
Tween 20	Roth

### 3.1.2. Verwendete Protein- Leiter

Name	Firma
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

### 3.1.3. Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Puffer	Zusammensetzung
10x Tris buffered saline (TBS)	12,1g TrisBase, 85g NaCl, ad 1000ml H <sub>2</sub> O, ph 7,4
1x TBS/ 0.1% BSA	100ml 10x TBS, 1g BSA, ad 1000ml H <sub>2</sub> O
1x TBS/ 0.1% BSA/ 0.05% Tween 20	1000ml 1x TBS/ 0.1% BSA, 500 µl Tween 20
1x TBS/ 5% BSA	100ml 1x TBS, 5g BSA

1x TBE Puffer (Agarosegel)	0,1M Tris/HCl, 89mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8,5
1x TBST	100ml 10x TBS, 0,5ml Tween20, ad 1000ml H <sub>2</sub> O
Peroxidase Block	900 µl Methanol, 100 µl Wasserstoffperoxid
Lysepuffer	0.5ml 1M Tris-HCl (pH=7.5), 0.3ml 5M NaCl, 40µl 0.5M EDTA (pH=8), 500µl 20% SDS, ad 9ml H <sub>2</sub> O, 1 Tablette Proteinaseinhibitor
Ladepuffer	100µl 1.25M Tris-HCl, 50µl 10% SDS, 95µl 87% Glycerol, 25µl Mercaptoethanol, 5µl Bromphenolblau
Laufpuffer (Westernblot)	30.25g Tris, 144g Glycin, 50ml 1% SDS, ad 1000ml H <sub>2</sub> O
Transferpuffer (Westernblot)	3.03g Tris, 14.4g Glycin, 3ml 10% SDS, ad 800ml H <sub>2</sub> O, 200ml Methanol
Stripping Puffer	15g Glycin, ad 1000ml H <sub>2</sub> O, pH 2.5 durch 5M HCl
4x Lower Tris	1,5M Tris/HCl, 0,4% w/v SDS, pH 8,8
4x Upper Tris	0,5M Tris/HCl, 0,4% w/v SDS, pH 6,8
Citratpuffer	42g Zitronensäure, ad 1000ml H <sub>2</sub> O, pH 6,0

### 3.1.4. Verwendete Medien und Zusätze

Medium	Firma
DMEM (high glucose)	PAA
Keratinocyten Medium	GIBCO
OPTI-MEM I	GIBCO
RPMI1640	PAA
Supplements for Keratinocyte serum free medium	GIBCO

Die Medien der Firma PAA wurden für die weitere Verwendung in der Zellkultur mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung sowie 10% Fetalem Kälberserum versetzt.

### 3.1.5 Verwendete Geräte

Name	Firma
Axiocam MRm MRc5 System	ZEISS
Centrifuge 5424	Eppendorf
Comfort No-Frost Kühl-und Gefrierschrank Kombi	Liebherr
Compact XS/S und Compact M Gelelektrophorese Kammern	Biometra
Cop 30 Kühlplatte	Medite Medizintechnik
Electrophoresis power supply ST606	GIBCO
Feinwaage	Sartorius analytic
Hera cell 150 Inkubator	Thermo Scientific
Hera freeze	Thermo Scientific
Hera safe Cellhood	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
IKA R4 basic KT/C safety control	IKA
Innova 43 Incubator Shaker series	New Brunswick Scientific
Leica RM2255 Microtom	Leica
LightCycler480	Roche
Mikroskop Axio Imager M2	ZEISS
Mikroskop Axiovert 40CFL	ZEISS
Mikrowelle	Sharp
Milli-Q Advantage Millipore-Anlage	Millipore
Mini Protean Tetra System (Gelelektrophorese-Kammer und Blotting-Kammer)	BioRad
Mini-Rocker MR-1	Peqlab
Multipipette Plus	Eppendorf

Multiskan EX	Thermo Scientific
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Nikon Coolscan V	Nikon
PCR Maschine	VWR
pH-Meter WTW Series	Inolab
Pipetboy Akku IBS	IBS Integra Bioscience
Scanner CanonScan 9900F	Canon
Standard Power Pack P25	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Titramax 100	Heidolph
Vortexer IKA MS3 basic	IKA Works
Wasserbad 1052	GFL

### 3.1.6. Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl Filter Tips, Tip One	Star Lab
5ml, 10ml, 25ml, 50ml cellstar serological pipettes	Greiner bio-one
6-well cell culture plate	Greiner bio-one
8er Deckelkette	Sarstedt
96-well cell culture Plate	Greiner bio-one
BD Bio Coat™Matrigel™Invasion Chamber	BD Biosciences
BD Micro Fine+ Insulin syringes with sterile interior 1ml	Becton Dickinson
C-Chip Disposable Hemocytometer	Peqlab
Cell culture dishes 100x20mm	Greiner bio-one
Cell culture Flasks 25cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one
Cell culture Flasks 75cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one
Cell Scraper 16cm	Sarstedt
Cell Star Tubes 15ml, 50ml	Greiner bio-oneC
Combitips plus 0,5ml, 2,5ml, 5ml	Eppendorf
Cryo Tube Vials	Thermo Scientific

Cryo-Safe Cooler -1°C Freeze Control	Bel-Art Product
DAKO Pen	DAKO
Deckgläser 24x50mm	Menzel Gläser
High Performance chemiluminescence film	GE Healthcare
Multiply-Strip 0,2ml Kette	Sarstedt
24-Multiwell Insert System	BD
Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman
Parafilm	Roth
Pipetten P1000N, P200N, P20N, P10N, P2N	Gilson
Reagiergefäß 1,5ml, 2ml	Sarstedt
Schottflasche 50ml, 500ml, 1000ml	Schott
Superfrost Ultra Plus Objektträger	Thermo Scientific
Teflon-beschichtete Slides	Erie Scientific Co
Tissue culture plate 24-well	Becton Dickinson
Wägeschale und Wägepapier	Machery-Nagel

### 3.1.7 Verwendete Antikörper

#### 3.1.7.1 Westernblot

Primäre Antikörper:

PCNA (Cells signaling, Nr. 2586); Verdünnung 1:20000

Alpha-SMA (Dako, Nr. M0851); Verdünnung 1:20000

Alpha-Tubulin (Abcam, Nr. ab11304); Verdünnung 1:20000

Sekundäre Antikörper:

Anti-mouse IgG HRP Conjugated (Promega, Nr. W4021); Verdünnung 1:20000

---

### 3.1.7.2 Immunfluoreszenz

Primäre Antikörper:

Alpha-SMA (Dako, Nr. M0851); Verdünnung 1:500

Ki67 (Novus Biologicals, Nr. NBP1-06530); Verdünnung 1:100

Sekundäre Antikörper:

Alexa Fluor 594 chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Antibody (Invitrogen, Nr. A21442);

Verdünnung 1:200

Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) Antibody (Invitrogen, Nr. A21202);

Verdünnung 1:200

### 3.1.7.3 Immunhistochemie (humanes und murines Gewebe)

Anilin (Sigma Aldrich, Nr. HT15-1KT): Inkubationszeit 20 Minuten

Primäre Antikörper:

Ki67 (Novus Biologicals, Nr. NBP1-06530); Verdünnung 1:500; mit Vectastan ABC Kit

(Nr. PK-6101); DAB- Reaktionszeit 10 Sekunden

Alpha-SMA (Dako, Nr. M0851); Verdünnung 1:1000; DAB- Reaktionszeit 25 Sekunden

Periostin (humanes Gewebe) (BioVendor, Nr. RD1811045050); Verdünnung 1:2000;

DAB- Reaktionszeit 10 Sekunden

Periostin (murines Gewebe) (Acris, Nr. AP08724 AF-N); Verdünnung 1:500; DAB-

Reaktionszeit 30 Sekunden

Sekundäre Antikörper:

EnVision + System-HRP labeled Polymer anti-mouse (Dako); Verdünnung laut

Herstellerangaben

EnVision + System-HRP labeled Polymer anti-rabbit (Dako); Verdünnung laut Herstellerangaben

### 3.1.8 Verwendete Kits

Kits	Firma
ECL Kit	Invitrogen
InnoCyte Invasion Assay Kit	Merck
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Trichrome Stain (Masson) Kit HT15-1KT	Sigma

### 3.1.9 Verwendete Software

Name	Firma
Ascent Software Version 2.6	Thermo Scientific
AxioVision	ZEISS
GraphPad Prism 6	GraphPad
ImageJ	NIH
Photoshop CS5 12.0	Adobe Systems
SPSS Statistics 22	IBM

### 3.1.10 Biologische Materialien

Die Gewinnung und Verwendung von biologischen Materialien sind in den entsprechenden Abschnitten im Methodik-Teil aufgeführt.

---

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 Humane Pankreas-Gewebeproben und klinische Daten

Alle Patienten, deren Gewebeproben untersucht wurden, wurden bei Verdacht auf PDAC in einem tertiären Referenzzentrum für hepatobiliäre Chirurgie operiert. In allen Fällen wurde bei der pathologischen Analyse der Gewebeproben die Diagnose bestätigt. Acht Patienten mit lediglich minimaler Metastasierung der Erkrankung, welche präoperativ nicht bekannt war, wurden in kurativer Intention im Rahmen der PaMeViTum-Studie operiert (Erweiterte versus Standardresektion bei zwei Patientenkohorten mit pankreatischem Adenokarzinom: Minimal metastasierte Erkrankung oder venöse Infiltration – eine randomisierte Studie, <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00855634>).

Demographische, operative und pathologische Daten aus einer prospektiv geführten Datenbank wurden retrospektiv analysiert. Die Gewebegewinnung und –aufbereitung wurde wie folgt durchgeführt:

Die frisch resezierten Gewebeproben wurden in 4%iger Paraformaldehydlösung für 12 bis 24 Stunden fixiert und dann für die histologische Analyse in Paraffin eingebettet. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben direkt nach der chirurgischen Resektion in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80°C für die Proteinextraktion gelagert.

Das oben erwähnte Studienprotokoll und die Verwendung und Analyse von humanem Material wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München, Deutschland, befürwortet (TUM 5510/12). Das informierte Einverständnis aller Patienten wurde schriftlich dokumentiert. Das Follow-up der Patienten wurde regelmäßig durch den Studienkoordinator oder durch die Study nurses durchgeführt.

---

### **3.2.2 Humane Pankreaskarzinom-Zelllinien**

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1 und Su86.86 wurden verwendet. Die Zellen wurden von ATCC (Rockville, MD, USA) erworben. Die Zellen wurden routinemäßig in Vollmedium (RPMI 1640 ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.2.3 Primäre humane pankreatische Sternzellen - Isolation und Kultur**

Die Isolation und Kultur humaner PSCs wurde durchgeführt wie von Bachem et al. beschrieben (Bachem, Schneider et al. 1998), in Kürze nach dem folgenden Protokoll: Pankreatisches Gewebe wurde während der operativen Resektion des Pankreas von Patienten mit PDAC gewonnen. Zur Isolation der PSCs wurden histologisch fibrotische Areale des Pankreas verwendet. Kleine Gewebeblöcke (0.5-1 mm<sup>3</sup>) wurden mit Hilfe einer Rasierklinge entfernt und unter Hinzugabe von 20% FCS in eine 1:1 (vol/vol) Mischung von Dulbecco's modified Eagle Medium mit Ham's F12 Medium, Penicillin 1%, Streptomycin 1% und Amphotericin 1% (Standard medium-20%, SM-20%) in 10 cm<sup>2</sup> große unbeschichtete Petrischalen gegeben. Die Gewebeproben wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinisieren subkultiviert. Für die zweite Passage erfolgte eine 1:2 Aufteilung dieser Zellen in zwei neue T75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Bei Erreichen von Konfluenz der Passage 2- Zellen wurden diese aliquotiert und eingefroren. Für die Experimente wurden die PSC-Aliquote anschließend in SM aufgetaut und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Zellpopulationen zwischen Passage 3 und 6 wurden für die Experimente verwendet.

### 3.2.4 Ex-vivo Mausmodelle

Durch Paaren von Ptf1a<sup>+Cre</sup> Knock-in Mäusen (Nakhai, Siveke et al. 2008) mit K-ras<sup>+LSL-G12D</sup>- Tieren konnten Mäuse mit Pankreas-spezifischer Aktivierung von onkogenem K-ras gewonnen werden (im Folgenden ck-Mäuse, n=20) (Hingorani, Petricoin et al. 2003). Dieses Modell wurde gewählt, da die Mäuse das Pankreaskarzinom über einen langen Zeitraum entwickeln (im Median in dieser Kohorte in 400 Tagen). Dabei wird auch die typische Reaktion des Pankreasstromas deutlich sichtbar.

Als zweites Modell wurden ckp-Mäuse (K-ras<sup>+LSL-G12D</sup> p53<sup>fl</sup> Ptf1a<sup>+Cre</sup>) mit einem beschleunigten Krankheitsverlauf und reichlich vorhandenem Stroma gewählt. Bei diesem Modell weisen ckp<sup>KO</sup> (Knock-out)-Mäuse mit homozygoter p53- Deletion (n=20) ein signifikant kürzeres Überleben als ckp<sup>het</sup>-Mäuse mit heterozygoter p53- Deletion (n=21) auf (in der untersuchten Kohorte im Median 56 versus 149 Tage, p≤0.0001). Die genannten genetisch modifizierten Mausmodelle (GEMM) wurden bereits früher charakterisiert und in präklinischen Therapiestudien verwendet (Bardeesy, Aguirre et al. 2006, Ardito, Gruner et al. 2012).

Bei allen Modellen wurde das spontane Überleben bestimmt und die Tiere im terminalen Stadium euthanasiert. Die Organe wurden entnommen und für die weitere Analyse in Formalin fixiert. Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Office of Laboratory Animal Welfare und dem Deutschen Bundestierschutzgesetz durchgeführt und durch das institutionelle Animal Care and Use Committee der Technischen Universität München, Deutschland, genehmigt.

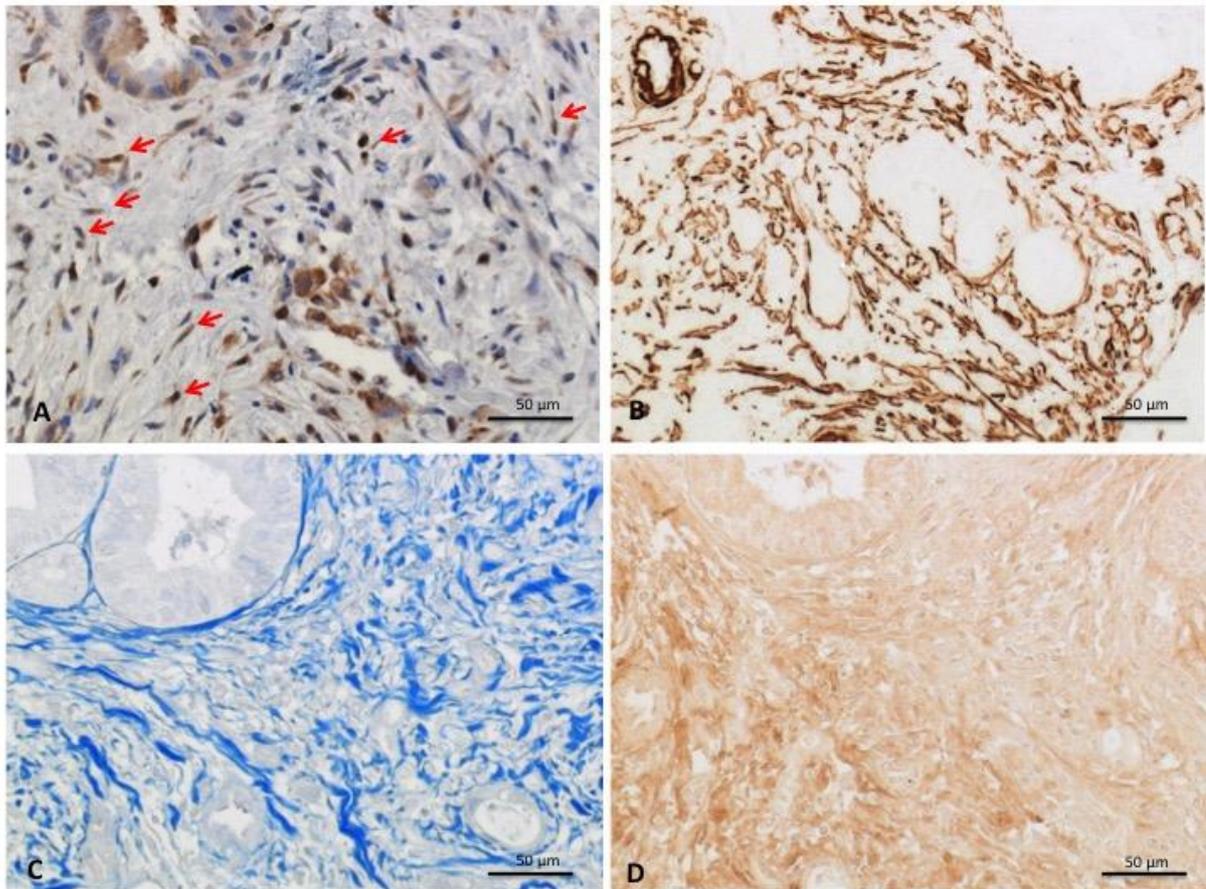
---

### 3.2.5 Immunhistochemie (IHC)

In Paraffin eingebettete Gewebelöcke von 80 Patienten mit histologisch gesichertem PDAC, die zwischen Juli 2007 und Dezember 2012 in der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München, operiert wurden, wurden untersucht. Acht Patienten wurden entweder auf Grund von schlechter Qualität des gewonnenen Gewebes (n=6) oder auf Grund von frühem postoperativen Tod, der nicht in Zusammenhang mit der primären Erkrankung stand (n=2), nicht in die endgültige Analyse eingeschlossen. In den verbliebenen 72 Gewebeproben wurden eine immunhistochemische Analyse der Ki67-Expression und der stromalen Marker  $\alpha$ SMA und Periostin durchgeführt. Diese wurden entsprechend dem folgenden Protokoll durchgeführt (exemplarisch ist hier das Vorgehen für die Ki67-Immunhistochemie genannt): Zwei konsekutive, 3 $\mu$ m dicke Schnitte der formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebelöcke wurden jeweils auf einen Objektträger platziert und schrittweise deparaffinisiert und rehydriert. Dazu wurden die Slides für 3x10 Minuten in Roticlear (Roth, Karlsruhe, Germany) gegeben, anschließend für 3x10 Minuten in 100%iges Ethanol, 5 Minuten in 96%iges Ethanol, 5 Minuten in 70%iges Ethanol, 5 Minuten in 50%iges Ethanol und 5 Minuten in Aqua dest. Anschließend erfolgte der Peroxidase-Block mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten; danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in Aqua dest. getaucht. Für das Antigen-Retrieval wurden die Slides zwei Mal für 10 Minuten in 10mM Citratpuffer gekocht. Nach Abkühlen und Spülen für 5 Minuten in PBS + Triton X 0.4% + 1% Goat serum (PBS/ T/ G) wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mittels TBS/ 5% BSA geblockt. Ein Schnitt auf dem Objektträger wurde jeweils für die Analyse verwendet, während der andere als Negativkontrolle diente. Der primäre Antikörper sowie die jeweilige Negativkontrolle wurden entsprechend mit TBS/ 5% BSA Serum verdünnt (für die

---

jeweiligen Verdünnungen siehe **Tabelle 2**). Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Slides für 3x10 Minuten mit PBS/ T/ G gespült. Der entsprechende sekundäre Antikörper (Vectastan ABC kit (PK-6101)) wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Es folgte ein erneutes dreimaliges Spülen für jeweils 10 Minuten mit PBS/ T/ G. Anschließend wurde das Vectastan ABC Reagent für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben und diese wiederum für 3x10 Minuten in PBS/ T/ G gespült. Die Farbreaktion wurde mittels Inkubation für 10 Sekunden in flüssigem DAB-Chromogen+Substrat durchgeführt und die Reaktion dann in Aqua dest. gestoppt. Bei der Ki67- Färbung erfolgte eine Gegenfärbung mit Mayer's hematoxylin Lösung. Anschließendes Dehydrieren (3 Minuten in 70%igem Ethanol, 3 Minuten in 96%igem Ethanol, 3x3 Minuten in 100%igem Ethanol, 3x5 Minuten Roticlear) und Fixierung mit Mounting medium. Zur Mikrofotografie wurde ein Zeiss AxioCam MRm MRc5 System verwendet. Die verschiedenen Antikörper mit den entsprechenden Konzentrationen, den sekundären Antikörpern und der jeweiligen Farbreaktions-Zeit sind in **Kapitel 3.1.7.3** aufgeführt; die Konzentrationen sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Bei der  $\alpha$ SMA- und Periostin-Immunhistochemie erfolgte keine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, um die Schnitte mittels quantitativer Bildanalyse (siehe unten) auswerten zu können. Es wurde außerdem auf konsekutiven Schnitten eine Anilin-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeschnitte nach Deparaffinierung und Rehydrierung für 15 Minuten in auf 56°C erwärmte Bouin- Lösung gegeben und anschließend entsprechend den Herstellerangaben mit Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäurelösung, Anilinblau und Essigsäure behandelt und wieder dehydriert. Dabei erfolgte ebenfalls keine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **Abbildung 5** zeigt ein Beispiel für die Ki67-,  $\alpha$ SMA- und Periostin-Immunhistochemie sowie die Anilin-Färbung bei konsekutiven Schnitten.



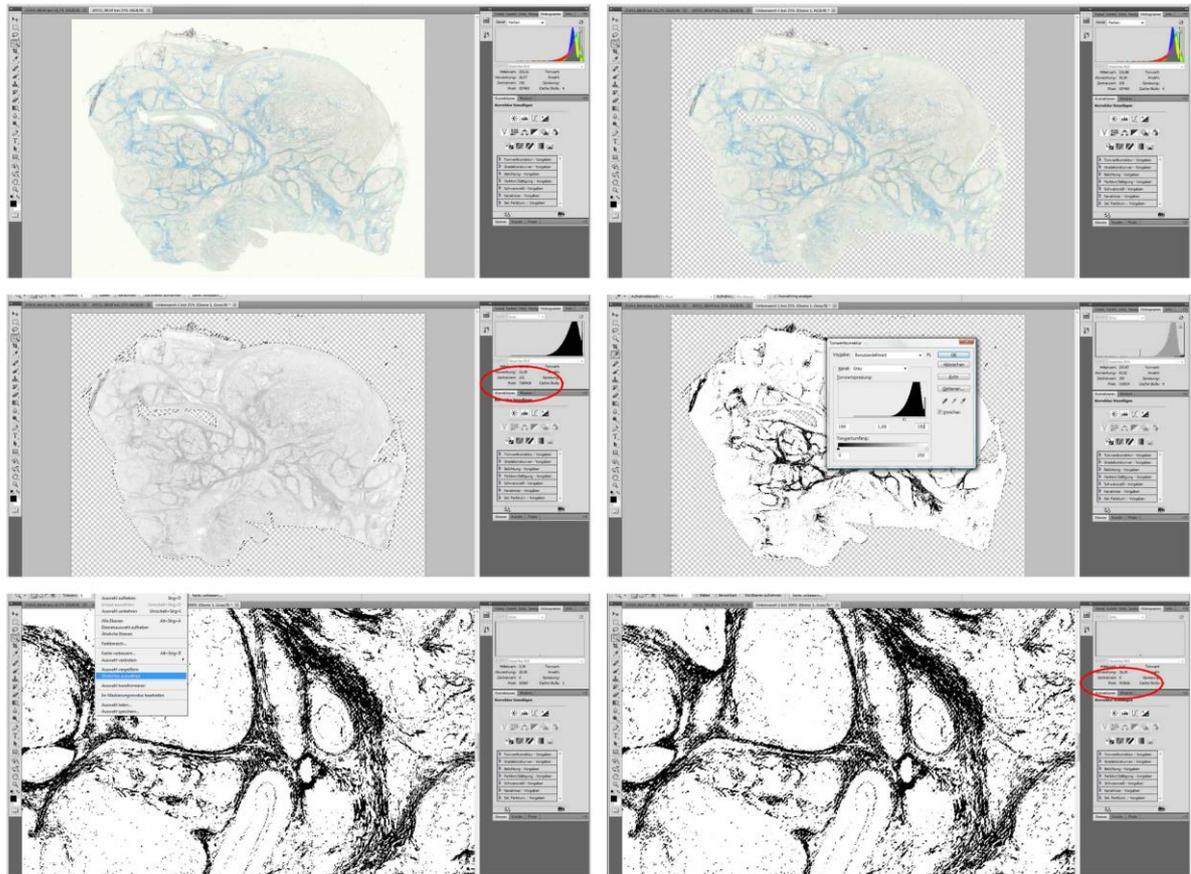
**Abbildung 5 Ex vivo Analyse der Interaktionen von pankreatischen Karzinom- und Sternzellen:** Immunhistochemische Analysen von humanem PDAC Gewebe in konsekutiven Schnitten. Es wurden Antikörper gegen Ki67 (A, mit Hämatoxylin-Gegenfärbung) und  $\alpha$ SMA (B), eine Anilinfärbung (C), sowie Antikörper gegen Periostin (D) verwendet.

Bei den Gewebeproben der verschiedenen Mausmodelle (20 ck-Mäuse, 21 ckp<sup>het</sup>- und 20 ckp<sup>KO</sup>-Mäuse, siehe oben) wurden in analoger Weise immunhistochemische Analysen mit Antikörpern gegen Ki67,  $\alpha$ SMA und Periostin, sowie die Anilinfärbung durchgeführt. Die jeweiligen primären und sekundären Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen und der Farbreaktions-Zeiten sind ebenfalls in **Kapitel 3.1.7.3** aufgeführt.

---

### 3.2.6 Quantitative Bildanalyse

Bei den  $\alpha$ SMA-, Periostin- und Anilin-Färbungen wurden die Slides mit Hilfe eines Nikon Coolscan V- Scanners (Nikon Corp) mit 4000 dpi digitalisiert. Um die automatisierte quantitative Analyse des jeweils spezifisch angefärbten Gewebeanteils zu ermöglichen, wurden diese Färbungen ohne Hämatoxylin-Gegenfärbung durchgeführt. Für die Bildanalyse wurde Adobe Photoshop CS5 12.0 (Adobe Systems) verwendet. Zuerst wurden die geeigneten Gewebeanteile ausgewählt; Stellen mit Artefakten oder Unregelmäßigkeiten wurden manuell entfernt. Die Schnitte wurden monochrom (Graustufen) dargestellt und die Pixelanzahl der Gesamtgewebefläche wurde jeweils bestimmt. Anschließend wurde für  $\alpha$ SMA, Periostin und Anilin jeweils ein geeigneter Schwellenwert bestimmt, um ein Schwarzweiß-Bild ohne Graustufen zu erhalten. Die beste Detektionssensitivität wurde erreicht, wenn der Schwellenwert mit dem Scheitelpunkt des initialen exponentiellen Anstiegs der Histogrammkurve übereinstimmte. Somit konnte die Pixelanzahl der jeweils spezifisch angefärbten Gewebeanteile bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil der angefärbten Areale an der Gesamtfläche angegeben (Erkan, Michalski et al. 2008, Erkan, Reiser-Erkan et al. 2009). **Abbildung 6** zeigt exemplarisch die wichtigsten Arbeitsschritte bei der quantitativen Bildanalyse eines mittels Anilinfärbung angefärbten Schnittes.



**Abbildung 6** Quantitative Bildanalyse der  $\alpha$ SMA- und Periostin-Immunhistochemie sowie der Anilinfärbung: Zur Analyse wurde Adobe Photoshop CS5 12.0 (Adobe Systems) verwendet. Hier sind exemplarisch die wichtigsten Arbeitsschritte der Analyse eines Schnittes mit Anilinfärbung gezeigt (Vorgehen wie oben beschrieben).

### 3.2.7 Bestimmung der Proliferationsraten

Die Auswertung der Ki67-Expression in den Nuclei von pankreatischen Karzinom- bzw. Sternzellen wurde semi-quantitativ mit geringen Modifikationen eines etablierten Protokolls durchgeführt (Luttges, Schemm et al. 2000). In der Zusammenfassung wurden vier Hot-spots pro Gewebeprobe unter hoher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgewertet. In jedem Hot-spot wurden mindestens 100 pankreatische Tumorzellen und 100 Sternzellen ausgezählt und hinsichtlich ihrer Anfärbung beurteilt. In den konsekutiven Schnitten wurden die pankreatischen Sternzellen anhand der

$\alpha$ SMA- Expression lokalisiert. Der prozentuale Anteil der positiven Nuclei wurde eruiert und es wurde jedem Zelltyp ein entsprechender Ki67-Index zugewiesen.

### **3.2.8 Protein-Isolation und Westernblot (WB)**

Fünf verschiedene pankreatische Sternzell-Klone von verschiedenen Patienten wurden für die Untersuchungen verwendet. Bei allen Zellen handelte es sich um Passage 3- Zellen (Erkan, Weis et al. 2010). Die Zellen wurden auf 6- Well Zellkulturplatten kultiviert. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellkultur-Monolayer wurden homogenisiert und mit 0.1 ml Puffer lysiert, welcher Tris-HCl (pH: 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% SDS und eine Tablette cComplete™ Mini EDTA-freien Protease-Inhibitor-Cocktail (pro 10 ml Puffer) enthielt. Die Zellen wurden von der Platte geschabt und die Zellextrakte durch zehnmaliges Passieren durch eine Syringe G27 Nadel homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann bei 14.000 g in einer gekühlten Zentrifuge für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort in frische Röhrchen überführt und aliquotiert. Die Aliquote wurden entweder sofort verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay Kit bestimmt. Zellextrakt (5  $\mu$ l) der fünf Sternzell-Klone wurde nach Gebrauchsanweisung in 100  $\mu$ l BCA- Reagenz verdünnt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte wurde mit dem ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen und unter Berücksichtigung der BSA Standardkurve (0-2 mg/ml) als Referenzwerte berechnet. Für den Westernblot wurden Proben mit je 20  $\mu$ l des Zell- Extrakts mittels 10% SDS-PAGE hinsichtlich Molekülmasse fraktioniert. Anschließend erfolgte durch die Applikation von 30 Volt für 75 Minuten der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran. Die freien unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden

---

für 20 Minuten mit 20 ml TBS-T plus 5% fettfreier Milch geblockt und die Proben dann über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern inkubiert. Es wurden Antikörper gegen  $\alpha$ SMA, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Anschließend wurden die Membranen mit TBS-T gespült und mit den entsprechenden sekundären Antikörpern für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen mit TBS-T wurde die Antikörperdetektion mit Hilfe des Enhanced Chemoilluminescence (ECL) Reaction Systems durchgeführt. Anschließend wurden die Antikörper von den Membranen entfernt (Strippen) und es wurde eine Ladekontrolle mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Um sezernierte Proteine im Überstand zu detektieren wurden die Zellen auf 6-Well Zellkulturplatten kultiviert, bis 100% Konfluenz erreicht war. Danach wurden sie für 24 Stunden in Serum-freies Standardmedium gegeben. Nach Sammeln des Überstandes wurden die Zellen mit Hilfe von Trypanblau gezählt, um den Effekt einer erhöhten Zellzahl ( $\pm 10\%$ ) auf den Proteinspiegel des Überstands auszuschließen. 15  $\mu$ g Protein wurden mit Probenpuffer ohne Erhitzen nach Größe fraktioniert. In **Tabelle 2** sind die verwendeten Antikörper-Verdünnungen dargestellt.

### 3.2.9 Immunfluoreszenz (IF)

Für die Immunfluoreszenz wurden Passage 3- Zellen der fünf verwendeten pankreatischen Sternzell-Klone in einer Dichte von 5000/Well in 100  $\mu$ l SM-10% auf Teflon-beschichtete Objektträger (Erie Scientific Company) gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, mit 0.1% Triton X-100 permeabilisiert und mit den primären Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurden Antikörper gegen  $\alpha$ SMA und Ki67 verwendet. Die sekundären Antikörper und

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) wurden entsprechend angewendet. Die Antikörper mit den jeweiligen Verdünnungen sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

**Tabelle 2: Antikörper- Verdünnungen für die Westernblot-, Immunhistochemie- und Immunfluoreszenz-Analysen (humanes Gewebe).**

Antikörper	IHC		IF		WB	
	Primär	Sekundär	Primär	Sekundär	Primär	Sekundär
Ki67	1:500	RtU	1:100	1:200	-	-
$\alpha$ SMA	1:1000	RtU	1:500	1:200	1:20000	1:20000
Periostin	1:2000	RtU	-	-	-	-
PCNA	-	-	-	-	1:20000	1:20000
$\alpha$ Tubulin	-	-	-	-	1:20000	1:20000

IHC: Immunhistochemie, IF: Immunfluoreszenz, WB: Westernblot,  $\alpha$ SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin, PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen, RtU: gebrauchsfertig (ready to use).

### 3.2.10 Tumorzellproliferation unter Nährstoff-Entzug

Die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc1 und SU86.86 wurden mit verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum (0.1%, 1% und 10% FCS) kultiviert und die Tumorzellproliferation und –invasion nach 48 Stunden bestimmt. Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des 3-(4,5-dimethyltriazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium Bromidtests (MTT-Test) eruiert. Der Invasionstest wurde bei verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum durchgeführt, welche in den oberen und unteren Kammern des Invasionstest-Sets (8  $\mu$ m) jeweils gleich waren.

---

### 3.2.11 Densitometrie

Die Westernblots wurden mittels eines Canon 9900F- Scanners eingescannt. Für die densitometrischen Analysen wurde das Programm ImageJ des National Institutes of Health (NIH) verwendet. Die optischen Dichtewerte unabhängiger Experimente wurden bezüglich des individuellen Hintergrundrauschens und den entsprechenden Loading Densities (der Zell-Lysate) korrigiert.

### 3.2.12 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit SPSS Statistics 22 (IBM) durchgeführt. Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der Median als Cut-off Wert gewählt. Für die Überlebenszeitanalysen wurden Kaplan-Meier-Schätzer und Log-Rank Test verwendet. Die multivariablen Analysen wurden mittels Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Die Schätzungen der Hazard Ratio wurden mit 95% Konfidenzintervallen angegeben. Für den Vergleich von demographischen und klinisch-pathologischen Daten zwischen Gruppen wurde der Fisher's Exact- Test verwendet. Die Gauß-Verteilung wurde mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus- Normalitätstest beurteilt. Die Verteilung der kategorischen Daten auf die einzelnen Variablen wurde mittels Kruskal-Wallis One-way Varianzanalyse oder Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Kategorische Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standard error of the mean angegeben. Die Abhängigkeit der Variablen wurde mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt. Statistische Signifikanz wurde bei einem P-Wert  $< 0.05$  festgelegt. Die Software GraphPad Prism 6 (GraphPad) wurde für die Erstellung von Graphen verwendet.

---

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Humanes Gewebe

#### 4.1.1 Immunhistochemische Analyse

72 Patienten wurden in die Auswertung eingeschlossen. Das mittlere Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 65.4 Jahre, Median 66.5 Jahre. Das minimale Alter lag dabei bei 31.8, das maximale Alter bei 85.5 Jahren. 47% (34) der Patienten waren männlich, 53% (38) weiblich. Das mediane Überleben der Patienten betrug 14.4 Monate ab dem Zeitpunkt des operativen Eingriffs. Dabei verstarben 49 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums; 23 Patienten waren am Ende des Beobachtungszeitraums noch am Leben. In einem Fall handelte es sich hinsichtlich der Einteilung des Primärtumors um ein T1-Karzinom (1.4%), in drei Fällen um ein T2-Karzinom (4.2%), in 57 Fällen um ein T3-Karzinom (79.2%) und in 11 Fällen um ein T4-Karzinom (15.3%). Eine lymphogene Metastasierung lag in 52 Fällen vor (72.2%); bei den übrigen 20 Patienten waren keine Lymphknotenmetastasen nachweisbar (27.8%, N0). Bei 8 Patienten waren zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs Fernmetastasen nachweisbar (11.1%, M1-Status), bei 64 Patienten war dies nicht der Fall (88.9%, M0). Bezüglich Resektionsstatus erfolgte bei 33 Patienten eine R0-Resektion (45.8%), bei 26 Patienten eine R1-Resektion (36.1%). Bei 13 Patienten war der Resektionsrand histologisch nicht eindeutig beurteilbar (18.1%, Rx).

Bei der PC-gestützten quantitativen Auswertung der  $\alpha$ SMA-Färbung wie oben beschrieben wurde im Mittel eine Fläche von 40.2% angefärbt (Standardabweichung 16.4%, Median 42.9%,). Die prozentual durch Anilin angefärbte Fläche der Gewebeproben lag im Durchschnitt bei 34.5% (Standardabweichung 18.3%, Median

34.2%). Bei der Periostin-Immunhistochemie wurde im Schnitt 35.3% des Gewebes angefärbt (Standardabweichung 19.8%, Median 30.8%).

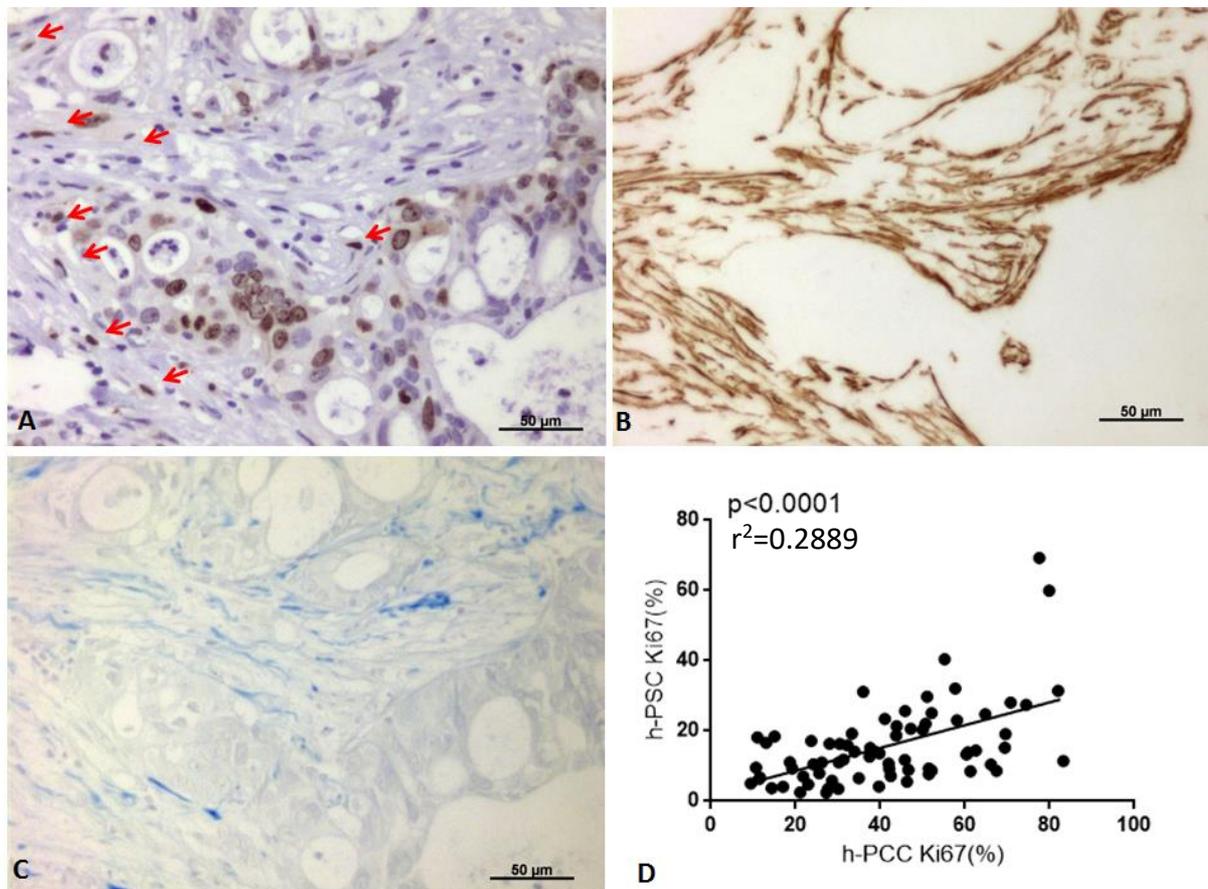
Die Ki67-Färbung wurde wie oben beschrieben semi-quantitativ ausgewertet. Dabei wurde jeweils für pankreatische Karzinomzellen (PCC) und für pankreatische Sternzellen (PSC) der Anteil an Zellen mit positiv gefärbten Nuclei an den Gesamt-PCCs bzw. PSCs ermittelt. Für die PCCs lag dieser Wert im Durchschnitt bei 41.4% (Standardabweichung 19.5%, Median 40.5%, zwischen 9.4 und 83.2%). Bei den Sternzellen lag der Anteil an positiv Ki67-gefärbten Nuclei zwischen 2.5 und 69.3%, Durchschnitt 15.6%, Standardabweichung 11.8%, Median 13.0%.

Anschließend wurde der Anteil der positiven pankreatischen Tumorzellen zum Anteil der positiven PSC ins Verhältnis gesetzt: der entsprechende Index  $PCC/PSC \cdot 100$  lag zwischen 60.5 und 1112.7, Durchschnittswert 358.7, Standardabweichung 235.6, Median 263.1. Entsprechend lag der Epithelial Stromal Proliferation Index (ESPI, Definition siehe unten **Kapitel 4.1.4**) zwischen 0.6 und 11.1, Durchschnitt 3.6, Standardabweichung 2.4, Median 2.6.

Der Activated Stroma Index (ASI, 2008 von Erkan M et al. etabliert) wurde bestimmt, indem der Anteil des bei der  $\alpha$ SMA-Färbung angefärbten Gewebes zum Anteil des bei der Anilin-Färbung angefärbten Gewebes ins Verhältnis gesetzt wurde. Der ASI lag bei dem untersuchten Kollektiv zwischen 11.9 und 1083.8, Durchschnittswert 183.7, Standardabweichung 194.7, Median 114.6. Entsprechend wurde für den PASI der  $\alpha$ SMA-positive Anteil zum Periostin-positiven Anteil ins Verhältnis gesetzt. Der PASI lag bei den untersuchten Patienten zwischen 10.7 und 4278.0, Durchschnittswert war 191.2, Standardabweichung 493.6, Median 114.5.

### 4.1.2 Proliferationsmuster von pankreatischen Tumor- und Sternzellen

Die Ki67-Färbung der Schnitte zeigte eine große Variabilität der Proliferation von pankreatischen Karzinom- und Sternzellen bei den verschiedenen Patienten. Im Bereich von Tumor-Hotspots waren die Proliferationsraten der PCCs dabei im Vergleich zu PSCs signifikant höher (Median 40.5% vs. 13.0%,  $p \leq 0.0001$ ). In den peritumoralen Arealen entsprachen die Proliferationsraten der PSCs annähernd denen der PCCs. Insgesamt ließ sich in der linearen Regressionsanalyse ein linearer Zusammenhang zwischen der Proliferation von PCCs und PSCs nachweisen ( $p \leq 0.0001$ , **Abbildung 7**).

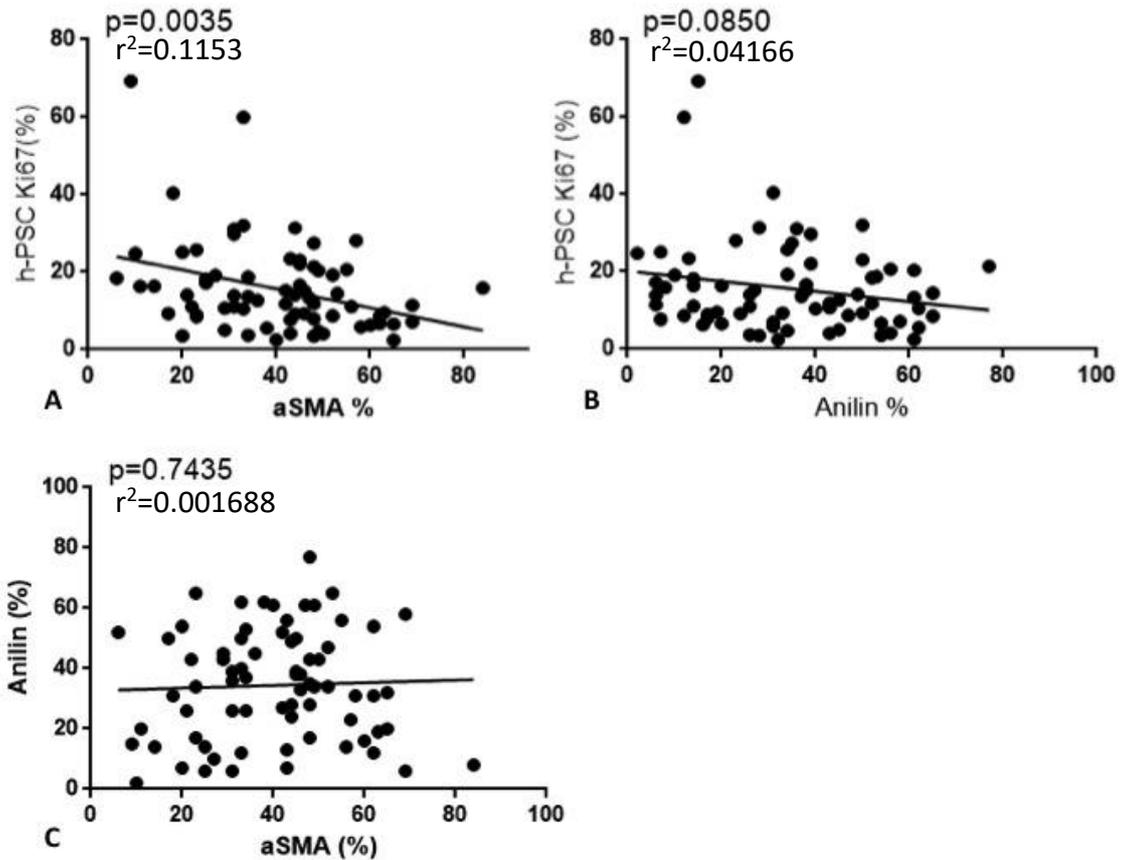


**Abbildung 7** Analyse der Interaktionen von pankreatischen Karzinom- und Sternzellen ex vivo. Immunhistochemische Analyse von humanem PDAC- Gewebe in konsekutiven Schnitten. Hier gezeigt

---

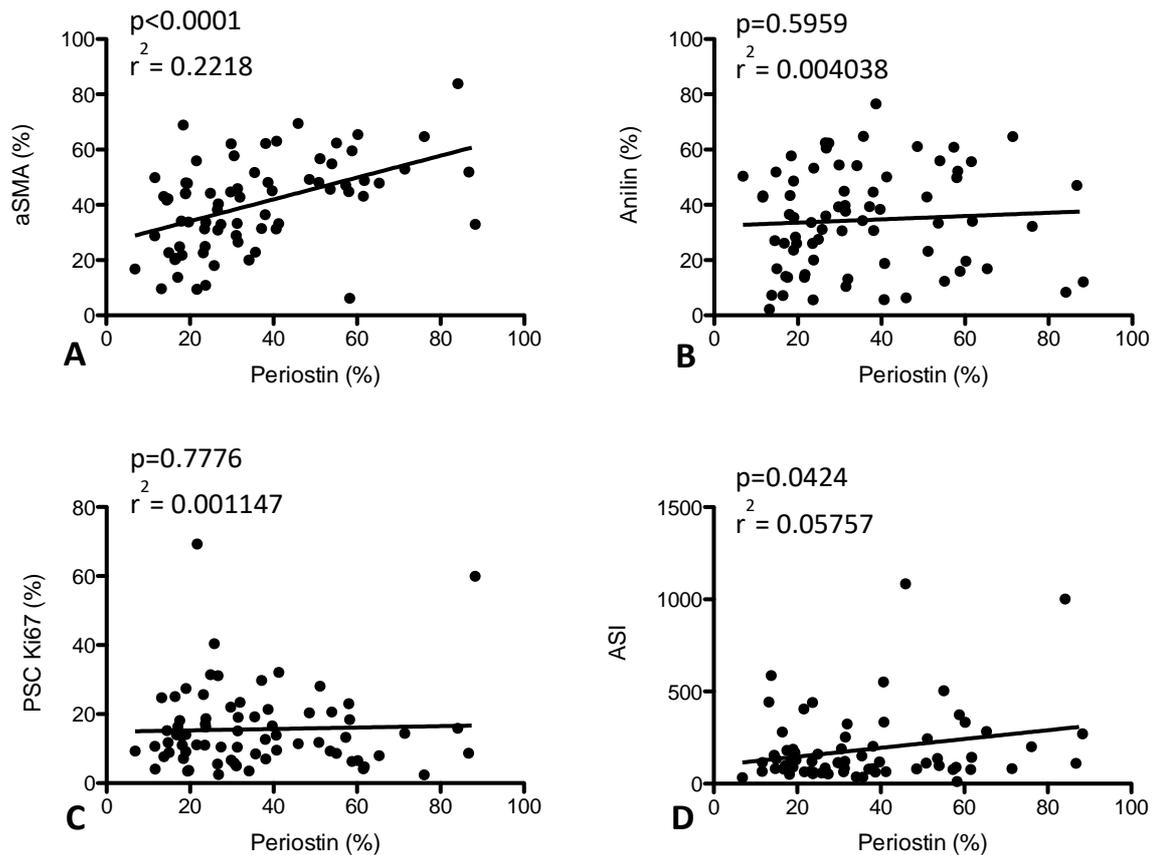
sind die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Ki67 (A, mit HE-Gegenfärbung), die  $\alpha$ SMA-Immunhistochemie (B) sowie die Anilinfärbung (C). Die Auswertung zeigt den Zusammenhang der Proliferation der beiden Zelltypen mit myofibroblastischer Transformation der PSCs und Kollagenablagerung in den peritumoralen Arealen.

Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen der PSC-Proliferation und der  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression sowie der Kollagenbildung untersucht. Hierzu wurden die  $\alpha$ SMA-, Anilin- und Periostin-Expression mit dem Ki67-Score der pankreatischen Sternzellen in konsekutiven Schnitten korreliert. Die lineare Regressionsanalyse zeigte einen signifikanten inversen Zusammenhang zwischen der  $\alpha$ SMA-Expression und der Proliferationsrate von PSCs ( $p=0.0035$ ). Es bestand ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression ( $p<0.0001$ ). Auch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Periostin-Expression und ASI ( $p=0.0424$ ). Zwischen Kollagenbildung und PSC-Proliferation oder  $\alpha$ SMA-Expression bestand keine signifikante Korrelation. Auch zwischen Anilin- und Periostin-Expression zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (**Abbildung 8** und **Abbildung 9**).



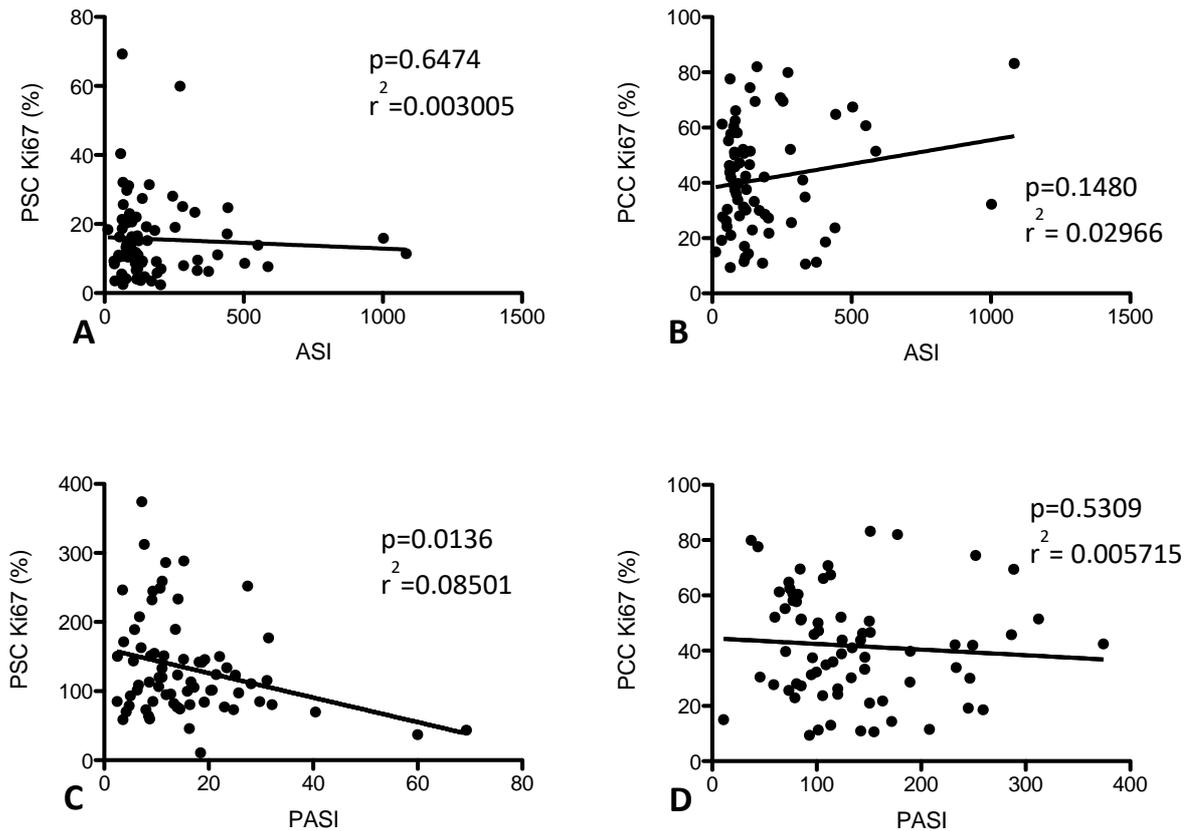
**Abbildung 8 Korrelation von PSC-Proliferation mit  $\alpha$ SMA-Expression und Kollagenablagerung:**

Die lineare Regressionsanalyse der durch semi-quantitative und quantitative Analyse der Immunhistochemie erhobenen Parameter zeigt eine signifikante inverse Korrelation zwischen PSC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression.



**Abbildung 9** Korrelation von Periostin-Expression mit  $\alpha$ SMA- und Anilin-Positivität sowie mit Sternzellproliferation und Activated Stroma Index (ASI): Die lineare Regressionsanalyse der Parameter zeigt eine signifikante Korrelation zwischen Periostin- und  $\alpha$ SMA-Expression ( $p < 0.0001$ , A). Auch zwischen Periostin-Expression und ASI besteht ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0.0424$ , D).

Auch der Zusammenhang zwischen Activated Stroma Index (Quotient des bei der  $\alpha$ SMA-Färbung angefärbten Gewebes zum Anteil des bei der Anilin-Färbung angefärbten Gewebes, wie oben beschrieben) bzw. PASI (Quotient  $\alpha$ SMA- zu Periostin-Positivität) und Tumor- bzw. Sternzellproliferation wurde untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen PASI und Sternzellproliferation ( $p = 0.0136$ ). Der ASI wies keine signifikante Korrelation mit PCC- oder PSC-Proliferation auf (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10** Korrelation von Activated Stroma Index (ASI) und PASI mit Tumor- bzw. Sternzellproliferation. Es zeigte sich ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen PASI und Sternzellproliferation ( $p=0.0136$ , C).

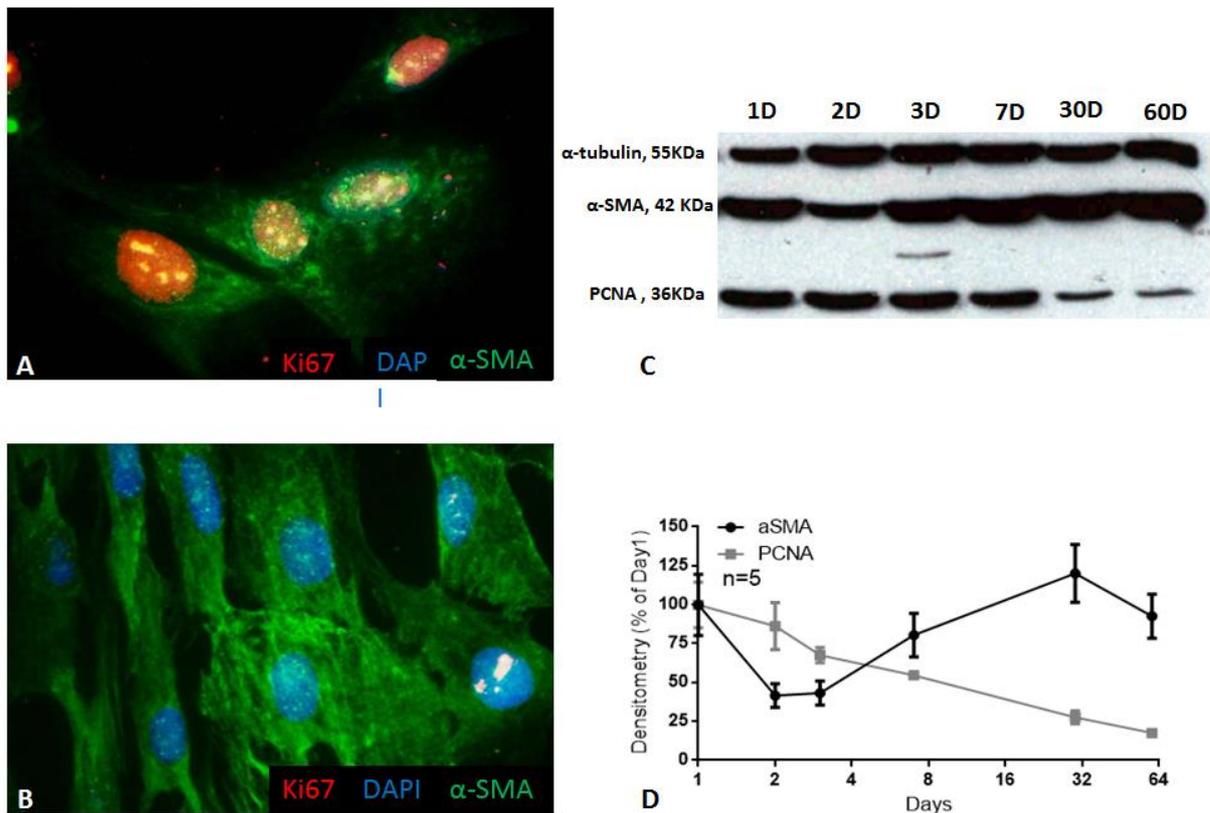
#### 4.1.3 Korrelation von PSC-Proliferation und $\alpha$ SMA-Expression in kultivierten primären humanen pankreatischen Sternzellen

Um die inverse Korrelation zwischen  $\alpha$ SMA-Expression und PSC-Proliferation in humanem Gewebe besser verstehen zu können, wurde eine Doppel-Immunfluoreszenz-Analyse bei kultivierten primären humanen PSCs durchgeführt. Neu kultivierte, aktiv proliferierende frühe PSC-Passagen hatten initial eine schwächere und granuläre  $\alpha$ SMA-Expression. Diese wurde im Verlauf kräftiger und bekam einen fibrillären Charakter. Wie erwartet waren viele dieser  $\alpha$ SMA-positiven

---

PSCs auch Ki67-positiv. Im zeitlichen Verlauf wurde die nukleäre Ki67-Anfärbung beim Erreichen von Konfluenz der PSCs schwächer, während die  $\alpha$ SMA-Expression ausgeprägter wurde (**Abbildung 11**). Anschließend wurden Proteine aus den PSCs extrahiert, die für verschiedene Zeitspannen zwischen einem Tag und zwei Monaten kultiviert wurden. Dabei wurden keine Subkulturen angelegt. Die Zell-Lysate wurden dann mit Antikörpern gegen Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und  $\alpha$ SMA untersucht. Übereinstimmend mit der Immunfluoreszenzanalyse hatten jüngere Zellen eine höhere PCNA-Positivität und ihre  $\alpha$ SMA-Expression nahm im zeitlichen Verlauf zu. Zu späteren Zeitpunkten nahm die PCNA-Expression der PSCs ab, während die  $\alpha$ SMA-Positivität erhalten blieb (**Abbildung 11**).

Es zeigte sich ein Abfall der  $\alpha$ SMA-Expression an Tag 2 bis auf 42% des ersten Tages. Diese initiale Reduktion ist methodisch durch zytoskelettale Reorganisation und Zersetzung des vorhandenen Proteins in den Zellen bedingt (Arora and McCulloch 1999).



**Abbildung 11 Korrelation von Proliferation und αSMA-Expression bei primären humanen pankreatischen Sternzellen:** Die Immunfluoreszenz-Analyse mit Antikörpern gegen Ki67 und αSMA zeigt die inverse Korrelation beider Proteine im frühen, nicht-konfluenten (A), sowie im späten, konfluenten (B) Stadium. Die Analyse des Zeitverlaufs der PSC-Proliferation und αSMA-Expression der PSCs ohne Subkultivierung bestätigte bei Untersuchung an mehreren Zeitpunkten die reziproken Veränderungen beider Proteine. Wir möchten hier auf den graduellen Rückgang des Proliferating Cell Nuclear Antigen hinweisen, während die αSMA-Positivität der Zellen erhalten bleibt (C). Abbildung 3D zeigt die densitometrische Analyse fünf verschiedener PSC-Klone, die aus dem Gewebe verschiedener Patienten gewonnen wurden. Die optischen Dichtewerte unabhängiger Experimente wurden auf Tag 1 normiert, das individuelle Hintergrundrauschen und die entsprechenden Loading Densities korrigiert (Erkan, Kleeff et al. 2007).

#### 4.1.4 Korrelation von Tumor- und Sternzellproliferation mit klinisch-pathologischen Parametern

Um den Einfluss der unterschiedlichen Proliferationsmuster von Tumor- und Sternzellen auf die klinisch-pathologischen Parameter zu analysieren, wurden die Patienten jeweils hinsichtlich Ki67-Score der PCCs und PSCs (höher bzw. niedriger

als der Median) sowie hinsichtlich des Quotienten dieser Werte stratifiziert. Der Epithelial Stromal Proliferation Index (ESPI) wurde als das Verhältnis des PCC Ki67-Scores geteilt durch den PSC Ki67-Score definiert und für jeden Patienten bestimmt. Als klinisch-pathologische Parameter wurden das Alter (Median, Durchschnitt) und das Geschlecht der Patienten, T-, N- und M-Status, sowie das Grading und der Resektionsstatus (R-Status) des Tumors betrachtet. Bei 13 der 72 Patienten konnte der R-Status durch den Pathologen nicht eindeutig bestimmt werden; diese wurden als „Rx“ bezeichnet. Bei der Verteilung dieser Parameter auf die entsprechenden Subgruppen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich jedoch ein positiver Trend zwischen einer niedrigen PCC-Proliferationsrate und einer höheren Lymphknoten-Positivität. Die demographischen und klinischen Daten sind in **Tabelle 3** dargestellt.

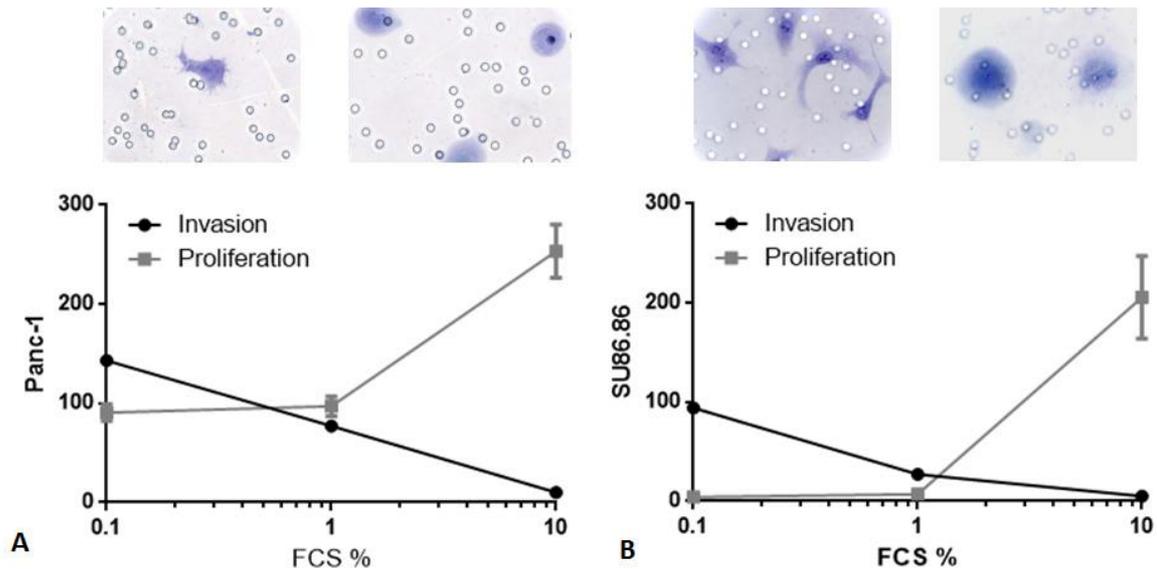
**Tabelle 3: Verteilung der klinischen Parameter auf die Subgruppen niedrige/ hohe PCC- bzw. PSC-Proliferation und niedriger/ hoher ESPI.**

n=72	PCC Ki67 niedrig	PCC Ki67 hoch	p- Wert	PSC Ki67 niedrig	PSC Ki67 hoch	p- Wert	ESPI Ki67 niedrig	ESPI Ki67 hoch	p- Wert
<b>Medianes, mittleres Alter (Spanne) in Jahren</b>	67.66 (32-83)	65.66 (39-86)	0.38	66.67 (32-83)	65.66 (39-86)	0.176	65.66 (32-83)	66.67 (46- 86)	0.09
<b>Geschlecht f/m</b>	18/18	20/16	0.81	15/21	23/13	0.098	23/13	17/19	0.24
<b>T- Status</b>			0.11			1.00			0.61
<b>T2</b>	0	4		2	2		1	3	
<b>T3 + T4</b>	36	32		34	34		35	33	
<b>N- Status</b>			<b>0.06</b>			0.43			1.00
<b>N0</b>	6	14		8	12		10	10	
<b>N1</b>	30	22		28	24		26	26	
<b>M- Status</b>			1.00			0.71			0.71

<b>M0</b>	32	32		31	33		33	31	
<b>M1</b>	4	4		5	3		3	5	
<b>Grading</b>			0.61			1.00			0.61
<b>G1</b>	3	1		2	2		3	1	
<b>G2 + G3</b>	33	35		34	34		33	35	
<b>R- Status*</b>			1.00			0.16			0.64
<b>R0</b>	16	17		13	20		18	15	
<b>Rx</b>	6	7		6	7		7	6	
<b>R1</b>	14	12		17	9		11	15	

T: Tumorgröße, N: Lymphknotenstatus, M: Fernmetastasierung, G: Grading des Tumors, R: Resektionsstatus (Rx: Resektionsstatus nicht eindeutig bestimmbar), PCC: Pankreatische Karzinomzellen, PSC: Pankreatische Sternzellen, ESPI: Epithelial-Stromal Proliferation Index. \*R0 vs. Rx und R1.

Um diesen Zusammenhang zwischen PCC-Proliferationsrate und Lymphknoten-Positivität näher zu untersuchen, kultivierten wir die Zelllinien Panc1 und SU86.86 unter verschiedenen Nährstoff- und Wachstumsfaktor-Konzentrationen. Dabei zeigte sich bei abnehmender Konzentration von fetalem Kälberserum eine Verlangsamung der Zellproliferation; es konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der Tumorzellinvasion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 12** dargestellt.



**Abbildung 12 Korrelation von pankreatischer Tumorzellproliferation und -invasion unter Serum-Entzug:** Die Zelllinien Panc1 (A) und SU86.86 (B) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum kultiviert. Die Zellproliferation wurde nach 48 Stunden mit Hilfe des 3-(4,5-dimethyltriazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium Bromidtests (MTT-Test) eruiert. Der Invasionsstest wurde bei verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum durchgeführt, welche in den oberen und unteren Kammern des Invasionsstest-Sets (8µm) jeweils gleich waren. Zu beachten ist das Mesenchym-artige Erscheinungsbild der Karzinomzellen unter niedrigen Serumkonzentrationen.

#### 4.1.5 Korrelation der klinischen und pathologischen Parameter mit dem Überleben der Patienten

Um den Einfluss der klinisch-pathologischen Parameter auf das Patientenüberleben zu analysieren, wurden Kaplan-Meier Analyse und Log-Rank Test für die folgenden Parameter durchgeführt: T-Status, N-Status, M-Status, R-Status, Grading des Tumors, Karzinom- und PSC-Proliferationsraten, ESPI,  $\alpha$ SMA-Expression der Sternzellen, Periostin-Expression und Kollagenbildung. T-Status ( $p=0.015$ ), N-Status ( $p=0.030$ ) und M-Status ( $p=0.018$ ) zeigten in der univariablen Analyse statistische Signifikanz. Bei 13 Patienten konnte der R-Status durch den Pathologen nicht eindeutig bestimmt werden (als „Rx“ bezeichnet). Wurden diese Patienten aus der Auswertung

ausgeschlossen, war auch der R-Status ein statistisch signifikanter Parameter ( $p=0.035$ ).

Keiner der Proliferations- oder Stroma-bezogenen Parameter erreichte in der univariablen Analyse statistische Signifikanz, der ESPI zeigte jedoch einen klaren Trend hinsichtlich eines besseren Überlebens von Patienten mit einem niedrigen Score (18 vs. 12 Monate,  $p=0.142$ ). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4** und in **Abbildung 14** aufgeführt.

**Tabelle 4: Ergebnisse der univariablen (UVA) und multivariablen (MVA) Analysen.**

Parameter	Medianes Überleben (Monate)	UVA	MVA	HR	95% Konfidenzintervall	
<b>T2</b>	16	<b>0.015</b>	0.076			
<b>T2/T3</b>	17		0.195	2.789	0.592	13.101
<b>T2/T4</b>	10		<b>0.034</b>	<b>7.063</b>	<b>1.155</b>	<b>43.198</b>
<b>N0/N1</b>	23 / 14	<b>0.030</b>	<b>0.052</b>	<b>2.370</b>	<b>0.993</b>	<b>5.655</b>
<b>M0/M1</b>	17 / 9	<b>0.018</b>	0.168	1.978	0.750	5.218
<b>G1</b>	23	0.160	0.187			
<b>G1/G2</b>	19		0.204	3.067	0.544	17.307
<b>G1/G3</b>	14		0.094	4.081	0.786	21.197
<b>R0</b>	18	0.085	0.082			
<b>R0/Rx</b>	18		0.154	0.453	0.153	1.345
<b>R0/R1</b>	11		0.315	1.443	0.706	2.950
<b>PCC-Ki67 niedrig/ hoch</b>	19 / 13	0.403	0.227	1.513	0.772	2.965
<b>PSC-Ki67 niedrig/ hoch</b>	16 / 16	0.621	0.194	1.744	0.753	4.038
<b>ESPI niedrig/ hoch</b>	18 / 12	0.142	<b>0.037</b>	<b>2.240</b>	<b>1.050</b>	<b>4.780</b>
<b><math>\alpha</math>SMA niedrig/ hoch</b>	18 / 15	0.994	0.814	1.085	0.551	2.138
<b>Anilin niedrig/ hoch</b>	16 / 17	0.928	0.373	0.735	0.373	1.448
<b>Periostin niedrig/ hoch</b>	15 / 17	0.533	0.470	0.761	0.362	1.598

Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der Median als Cut-off Wert verwendet. HR: Hazard Ratio, T: Tumorgröße, N: Lymphknoten-Status, M: Fernmetastasierung, G: Grading des Tumors, R: Resektionsstatus,  $\alpha$ SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin, PCC: Pankreatische Tumorzellen, PSC: Pankreatische Sternzellen, ESPI: Epithelial Stromal Proliferation Index.

Anschließend wurde eine multiple Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, um die Wechselbeziehungen der prognostischen Faktoren zu eruieren. Die multivariable Analyse zeigte, dass der T-Status (T2/T4,  $p=0.034$ ), der N-Status ( $p=0.052$ ) sowie auch der ESPI ( $p=0.037$ ) in der untersuchten Kohorte unabhängige prognostische Faktoren darstellten. Die Ergebnisse der uni- und multivariablen Analysen sind in **Tabelle 4** dargestellt.

#### 4.1.6 Einfluss der verschiedenen ESPI-Fraktionen auf das Überleben

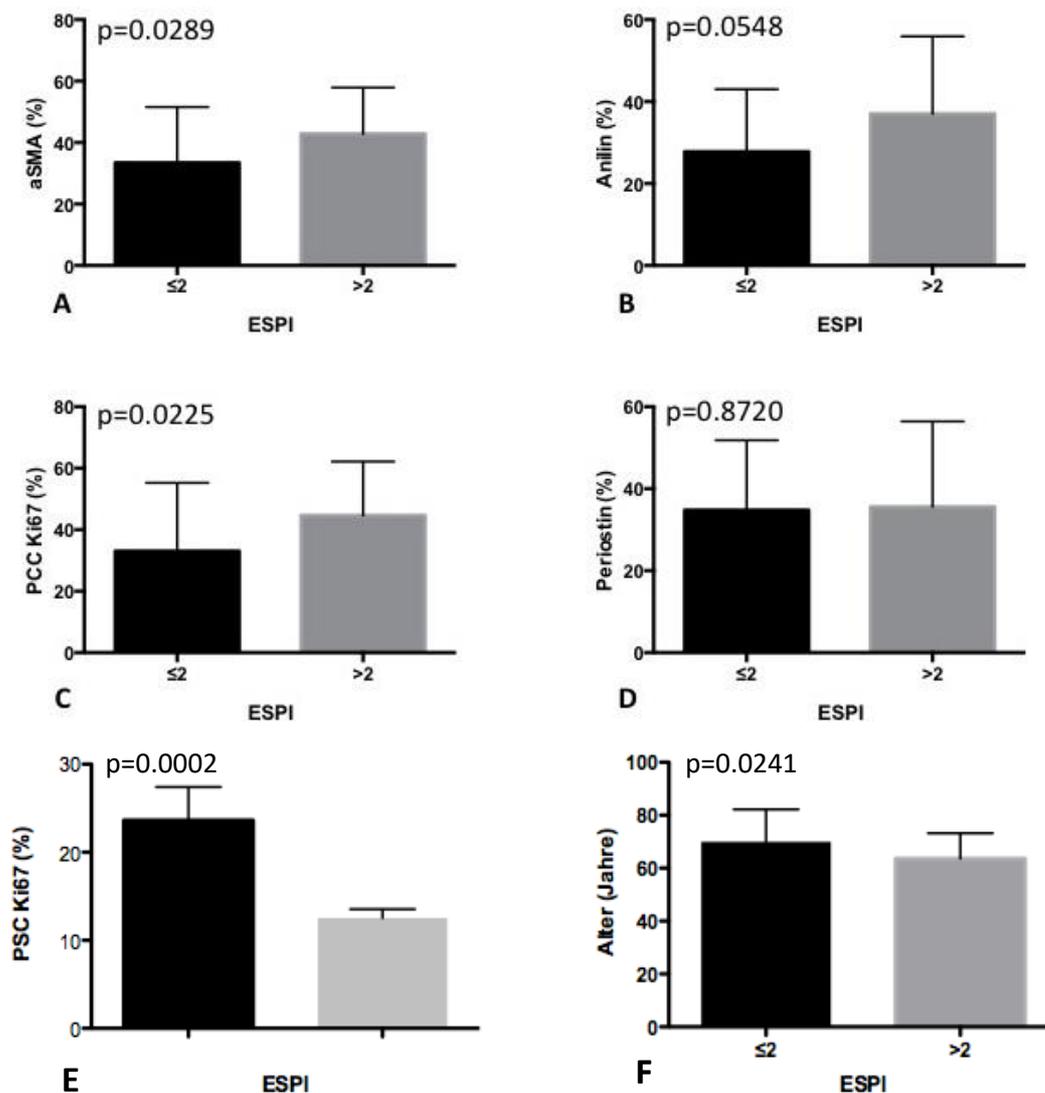
Um den Einfluss von verschiedenen Subgruppen des ESPI-Index auf das Überleben tiefergehend zu untersuchen, wurden die Patienten bezüglich ihres ESPI-Wertes stratifiziert (**Tabelle 5**).

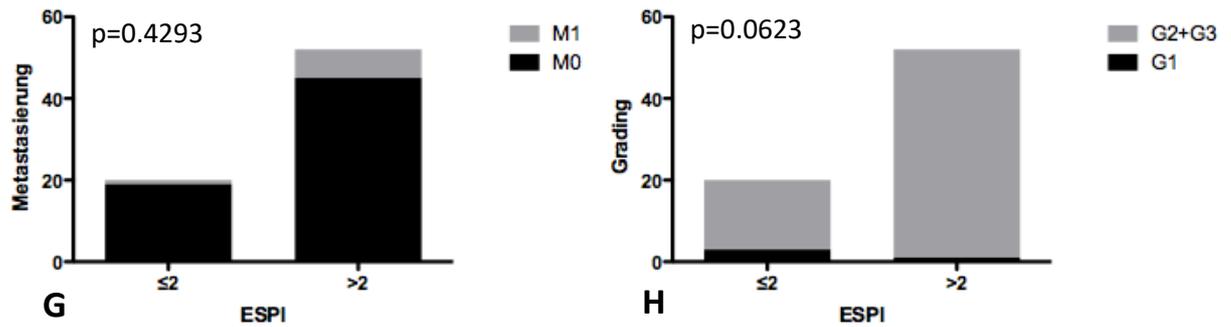
**Tabelle 5: Univariable Analyse der ESPI-Subgruppen.**

ESPI	n	Medianes Überleben (Monate)	95% CI		p- Wert
≤1 vs. übrige	3/69	19/16	9.4/12.2	28.6/19.8	0.764
<b>≤2 vs. übrige</b>	<b>20/52</b>	<b>40/13</b>	<b>15.6/9.1</b>	<b>64.4/16.9</b>	<b>0.025</b>
≤3 vs. übrige	42/30	18/10	15.0/6.9	21.0/13.1	0.151
≤4 vs. übrige	48/24	18/11	14.8/6.4	21.2/15.6	0.344
≤5 vs. übrige	56/16	17/12	14.0/7.0	20.0/17.0	0.699
≤6 vs. übrige	60/12	16/12	12.4/0.0	19.6/34.3	0.992
≤7 vs. übrige	63/9	16/12	12.3/6.7	19.7/12.3	0.740

ESPI: Epithelial Stromal Proliferation Index (Ki67-Index der Tumorzellen geteilt durch Ki67-Score der PSCs), CI: Konfidenzintervall.

Patienten mit einem ESPI  $\leq 2$  lebten signifikant länger (40 Monate vs. 13 Monate,  $p=0.025$ ) als alle anderen Subgruppen. In der multivariablen Analyse zeigte sich dabei eine noch höhere Signifikanz (**Tabelle 6**). Die weitere Analyse zeigte, dass Tumore mit einem ESPI  $\leq 2$  im Vergleich zu den anderen eine geringere  $\alpha$ SMA-Expression (31% vs. 44%,  $p=0.03$ ), eine geringere Kollagenbildung (28% vs. 37%,  $p=0.055$ ), eine niedrigere PCC-Proliferationsrate (33% vs. 45%,  $p=0.02$ ) sowie eine höhere PSC-Proliferationsrate (24% vs. 13%,  $p=0.0002$ ) aufwiesen. Patienten mit ESPI  $\leq 2$  waren auch älter (Median: 72 vs. 65 Jahre, Mittelwert: 70 vs. 64 Jahre,  $p=0.02$ ) und die Karzinome mit ESPI  $\leq 2$  waren öfter gut differenziert (18% vs. 2%,  $p=0.06$ ) (**Abbildung 13**).





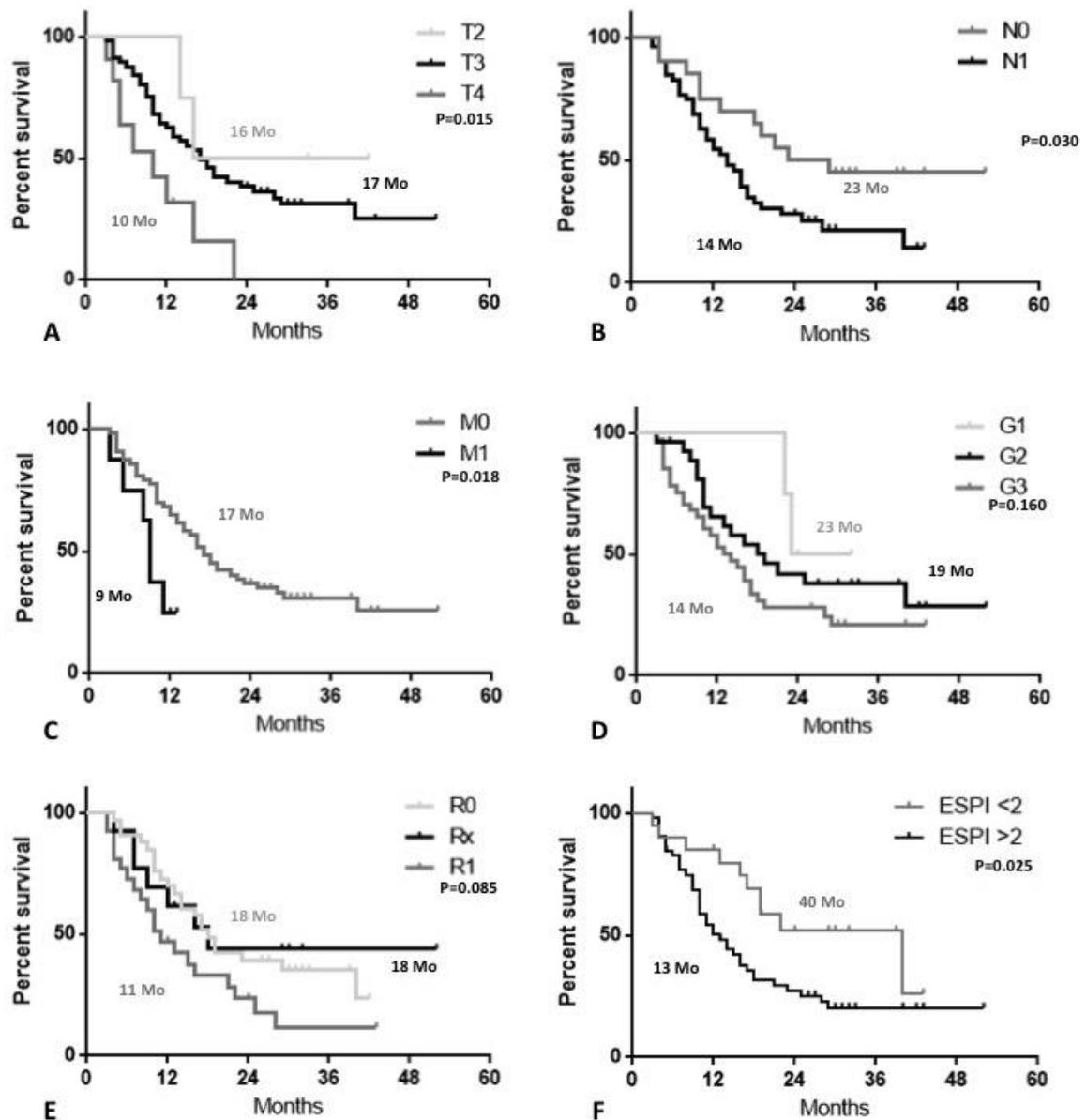
**Abbildung 13 Stratifizierung der Patienten in Subgruppen mit ESPI ≤2 und ESPI >2** Bei αSMA-Expression, der PCC Ki67-Positivität, PSC Ki67-Positivität und dem Patientenalter ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen; bei Anilin-Expression und dem Grading der Karzinome zeigten sich positive Trends (A–F: gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung).

Zu beachten ist, dass die Korrelation zwischen ESPI ≤2 und den analysierten Parametern in keinem Fall Reziprozität zeigte (z.B. wiesen Patienten mit einer geringen αSMA-Expression oder ältere Patienten nicht signifikant öfter einen ESPI ≤2 auf, Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 6: Ergebnisse der univariablen (UVA) und multivariablen (MVA) Analysen bei Stratifizierung ESPI  $\leq 2$  bzw.  $> 2$ .**

Parameter	Medianes Überleben (Monate)	UVA	MVA	HR	95% Konfidenzintervall	
<b>T2</b>	16	<b>0.015</b>	0.086			
<b>T2/T3</b>	17		0.193	2.781	0.596	12.974
<b>T2/T4</b>	10		<b>0.039</b>	<b>6.718</b>	<b>1.106</b>	<b>40.828</b>
<b>N0/N1</b>	23 / 14	<b>0.030</b>	<b>0.014</b>	<b>3.100</b>	<b>1.257</b>	<b>7.640</b>
<b>M0/M1</b>	17 / 9	<b>0.018</b>	0.238	1.804	0.677	4.804
<b>G1</b>	23	0.160	0.374			
<b>G1/G2</b>	19		0.285	2.649	0.445	15.771
<b>G1/G3</b>	14		0.184	3.159	0.579	17.224
<b>R0</b>	18	0.085	0.075			
<b>R0/Rx</b>	18		0.224	0.518	0.179	1.498
<b>R0/R1</b>	11		0.194	1.605	0.786	3.277
<b>PCC-Ki67 niedrig/ hoch</b>	19 / 13	0.403	0.507	1.264	0.632	2.527
<b>PSC-Ki67 niedrig/ hoch</b>	16 / 16	0.621	0.174	1.686	0.794	3.580
<b>ESPI <math>\leq 2</math> / <math>&gt; 2</math></b>	40 / 13	<b>0.025</b>	<b>0.008</b>	<b>3.335</b>	<b>1.362</b>	<b>8.165</b>
<b><math>\alpha</math>SMA niedrig/ hoch</b>	18 / 15	0.994	0.530	0.797	0.393	1.617
<b>Anilin niedrig/ hoch</b>	16 / 17	0.928	0.098	0.550	0.271	1.117
<b>Periostin niedrig/ hoch</b>	15 / 17	0.533	0.811	0.910	0.421	1.966

Außer für den ESPI wurde der Median als Cut-off Wert für den Vergleich zweier Gruppen verwendet. HR: Hazard Ratio, T: Tumorgröße, N: Lymphknoten- Status, M: Fernmetastasierung, G: Grading des Tumors, R: Resektionsstatus,  $\alpha$ SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin, PCC: Pankreatische Tumorzellen, PSC: Pankreatische Sternzellen, ESPI: Epithelial Stromal Proliferation Index.



**Abbildung 14 Univariable Analyse von Einflussfaktoren auf das Überleben:** Kaplan-Meier Analyse und Log-Rank Test wurden verwendet, um die Survival-Unterschiede zwischen den Gruppen zu eruieren.

## 4.2 Murines Gewebe

### 4.2.1 Immunhistochemische Analyse

Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des PDAC Stromas bei Menschen und GEMMs (genetisch modifizierte Mausmodelle) zu verstehen, führten wir die selben Analysen mit dem Gewebe von ck-Mäusen ( $Ptf1a^{+/Cre}$   $K-ras^{+/LSL-G12D}$ ) sowie mit homozygoten und heterozygoten  $K-ras^{+/LSL-G12D}$   $p53^{fl}$   $Ptf1a^{+/Cre}$ -Mäusen durch (im Folgenden  $ckp^{het-}$  beziehungsweise  $ckp^{KO}$ -Mäuse).

Gewebe von 20 ck-Mäusen, 21  $ckp^{het-}$  und 20  $ckp^{KO}$ -Mäusen wurde untersucht. Das mittlere Überleben der ck-Mäuse betrug 397.7 Tage, Standardabweichung 108.5 Tage, Median 400 Tage. Bei den  $ckp^{het-}$ -Mäusen lag das mittlere Überleben bei 159.5 Tagen (Standardabweichung 70.9 Tage, Median 149 Tage); bei den  $ckp^{KO}$ -Mäusen bei 55.0 Tagen (Standardabweichung 9.6 Tage, Median 56 Tage).

Bei der PC-gestützten quantitativen Auswertung der  $\alpha$ SMA-Färbung wurde bei den ck-Mäusen im Mittel 10.7% der Fläche angefärbt (Standardabweichung 8.0%, Median 8.5%). Die prozentual durch Anilin angefärbte Fläche der Gewebeproben der ck-Mäuse lag im Durchschnitt bei 42.4% (Standardabweichung 14.7%, Median 42.7%). Bei der Periostin-Immunhistochemie wurde im Schnitt 7.7% des Gewebes der ck-Mäuse angefärbt (Standardabweichung 5.7%, Median 6.0%). Bei den  $ckp^{het-}$ -Mäusen färbte sich bei der  $\alpha$ SMA-Färbung im Mittel 10.1% der Gewebefläche (Standardabweichung 6.7%, Median 8.9%), bei der Anilin-Färbung 46.5% der Fläche (Standardabweichung 16.1%, Median 50.4%) sowie bei der Periostin-Färbung durchschnittlich 18.0% der Fläche (Standardabweichung 12.1%, Median 16.3%). Bei den  $ckp^{KO}$ -Mäusen lag die bei der  $\alpha$ SMA-Färbung angefärbte Fläche im Mittel bei 11.0% des Gewebes (Standardabweichung 7.8%, Median 9.3%). Die prozentual durch Anilin angefärbte Fläche betrug im Durchschnitt 45.6% (Standardabweichung 26.9%,

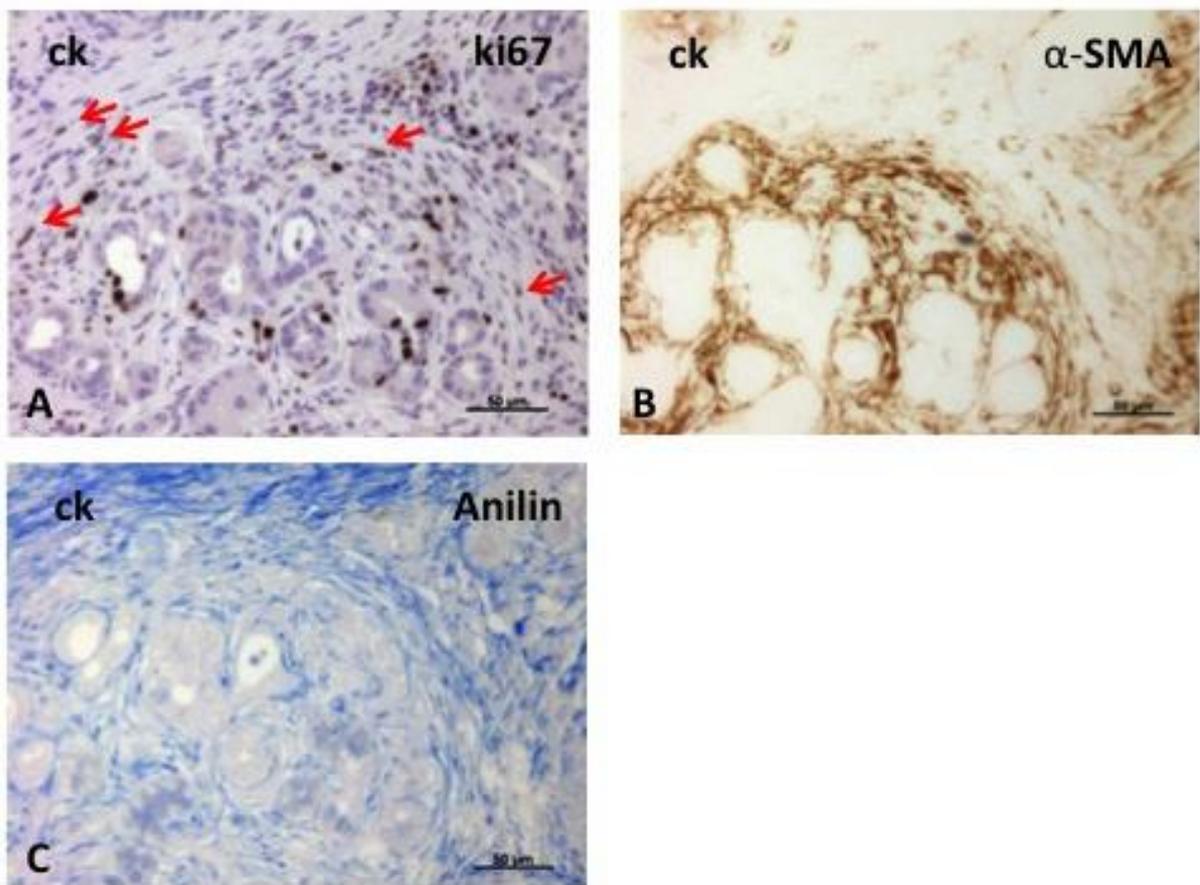
Median 52.9%), die bei der Periostin-Immunhistochemie angefärbte Fläche im Schnitt bei 24.9% (Standardabweichung 14.1%, Median 24.2%).

Bei den ck-Mäusen lag der Anteil der Zellen mit Ki67-positivem Nucleus an den Gesamt-PCCs im Durchschnitt bei 24.2% (Standardabweichung 13.3%, Median 23.3%). Bei den Sternzellen lag der Anteil an positiv Ki67-gefärbten Nuclei bei ck-Mäusen im Schnitt bei 11.9% (Standardabweichung 6.2%, Median 12.2%). Entsprechend lag der ESPI bei den ck-Mäusen im Durchschnitt bei 2.3; der Index Ki67-positive PCCs/ Ki67-positive PSCs \*100 zwischen 65.0 und 528.9, Durchschnitt 228.6, Standardabweichung 112.5, Median 191.2. Der ASI betrug für ck-Mäuse im Schnitt 35.3 (Standardabweichung 47.8, Median 19.2), der PASI im Schnitt 196.0 (Standardabweichung 130.4, Median 176.3).

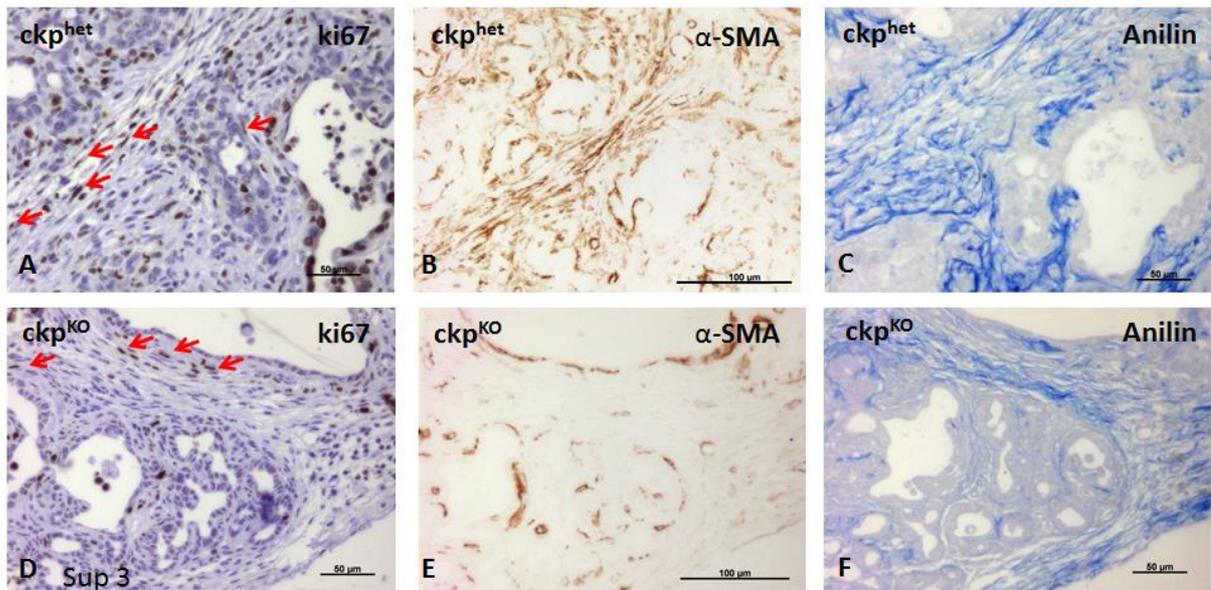
Bei den ckp<sup>het</sup>-Mäusen lag der Anteil der Zellen mit Ki67-positivem Nucleus an allen PCCs im Durchschnitt bei 12.8% (Standardabweichung 5.1%, Median 14.0%), der entsprechende Anteil bei den PSCs im Schnitt bei 10.1% (Standardabweichung 3.3%, Median 10.5%). Der ESPI lag dabei im Durchschnitt bei 1.3. Der Index Ki67-positive PCCs/ Ki67-positive PSCs \*100 lag entsprechend für ckp<sup>het</sup>-Mäuse zwischen 59.1 und 247.7 (Durchschnitt 129.1, Standardabweichung 50.1, Median 127.0), der ASI im Schnitt bei 27.4 (Standardabweichung 26.4, Median 20.6), der PASI im Durchschnitt bei 75.4 (Standardabweichung 50.5, Median 58.6).

Bei den ckp<sup>KO</sup>-Mäusen färbten sich im Schnitt 14.8% der Zellkerne aller PCCs durch Ki67 an (Standardabweichung 9.4%, Median 11.8%). Bei den pankreatischen Sternzellen lag der Anteil im Schnitt bei 13.4% (Standardabweichung 5.6%, Median 11.7%). Der ESPI lag im Durchschnitt bei 1.1. Der Index Ki67-positive PCCs/ Ki67-positive PSCs \*100 für ckp<sup>KO</sup>-Mäuse betrug somit im Durchschnitt 111.4 (zwischen 61.1 und 224.7, Standardabweichung 46.3, Median 99.6), der ASI im Schnitt 52.9

(Standardabweichung 83.4, Median 20.2), der PASI im Durchschnitt 54.9 (Standardabweichung 37.3, Median 47.7).



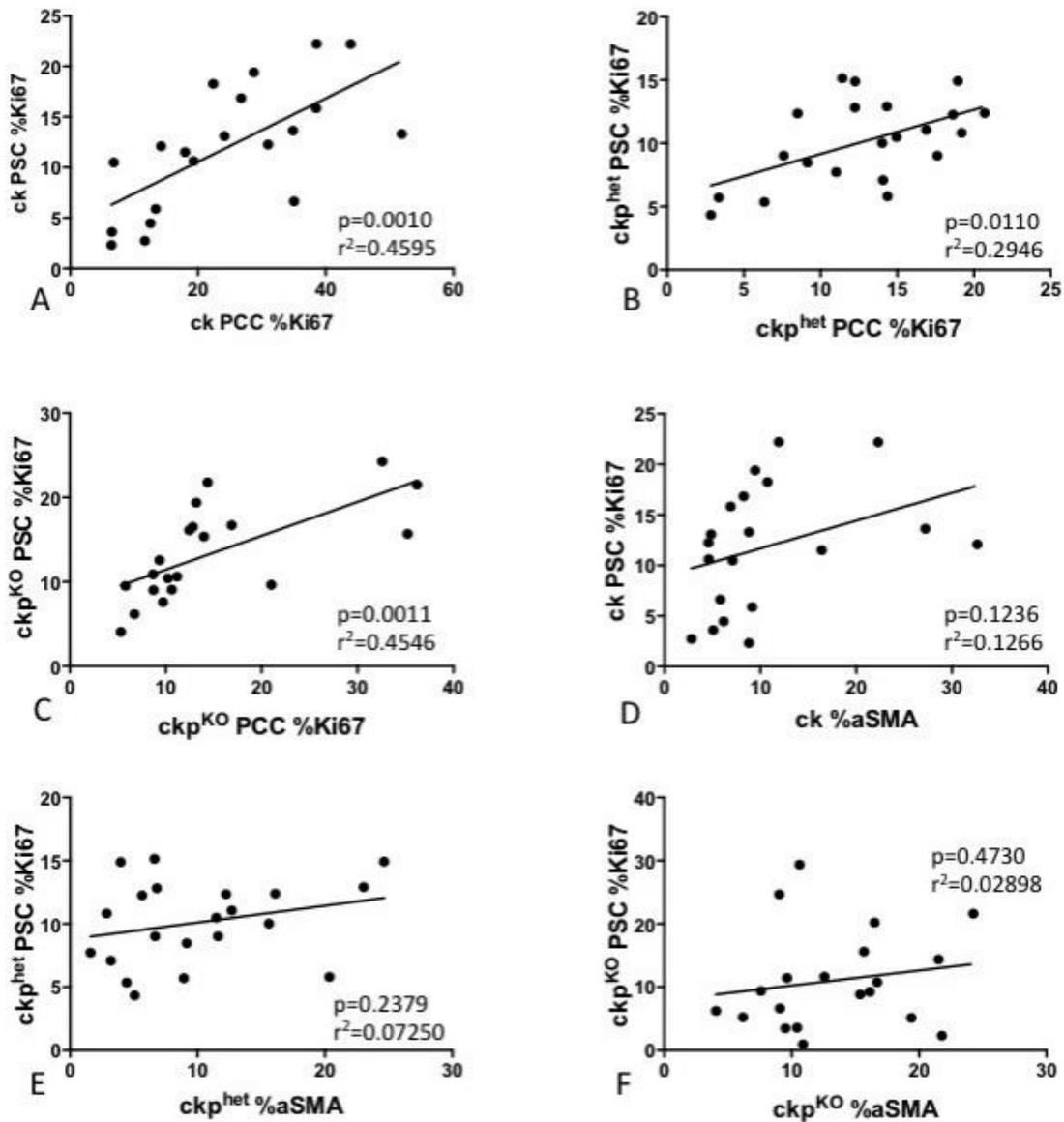
**Abbildung 15 Immunhistochemische Analyse des Gewebes von ck-Mäusen:** Die immunhistochemische Analyse von Ptf1a<sup>+Cre</sup> K-ras<sup>+LSL-G12D</sup> PDAC-Gewebe in konsekutiven Schnitten zeigt die Interrelation der Proliferation von pankreatischen Tumor- und Sternzellen, die myofibroblastische Transformation bei PSCs sowie die Kollagenablagerung in den peritumoralen Arealen. Hier gezeigt immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Ki67 (A) und  $\alpha$ SMA (B) sowie Anilinfärbung (C) in konsekutiven Schnitten.



**Abbildung 16 Immunhistochemische Analyse des Gewebes von ckp-Mäusen:** Immunhistochemische Analyse von murinem PDAC-Gewebe in konsekutiven Schnitten. Gewebe von heterozygoten (A – C) und homozygoten (D – F)  $K\text{-ras}^{+/LSL\text{-}G12D}$   $p53^{fl}$   $Ptf1a^{+/Cre}$  Mäusen wurde untersucht. Hier gezeigt sind immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Ki67 (A, D) und  $\alpha$ SMA (B, E) sowie die Anilinfärbung (C, F). Die Auswertung zeigt den Zusammenhang der Proliferation von pankreatischen Tumor- und Sternzellen mit myofibroblastischer Transformation der PSCs und Kollagenablagerung in den peritumoralen Arealen.

#### 4.2.2 Proliferationsmuster von pankreatischen Tumor- und Sternzellen bei verschiedenen GEMMs

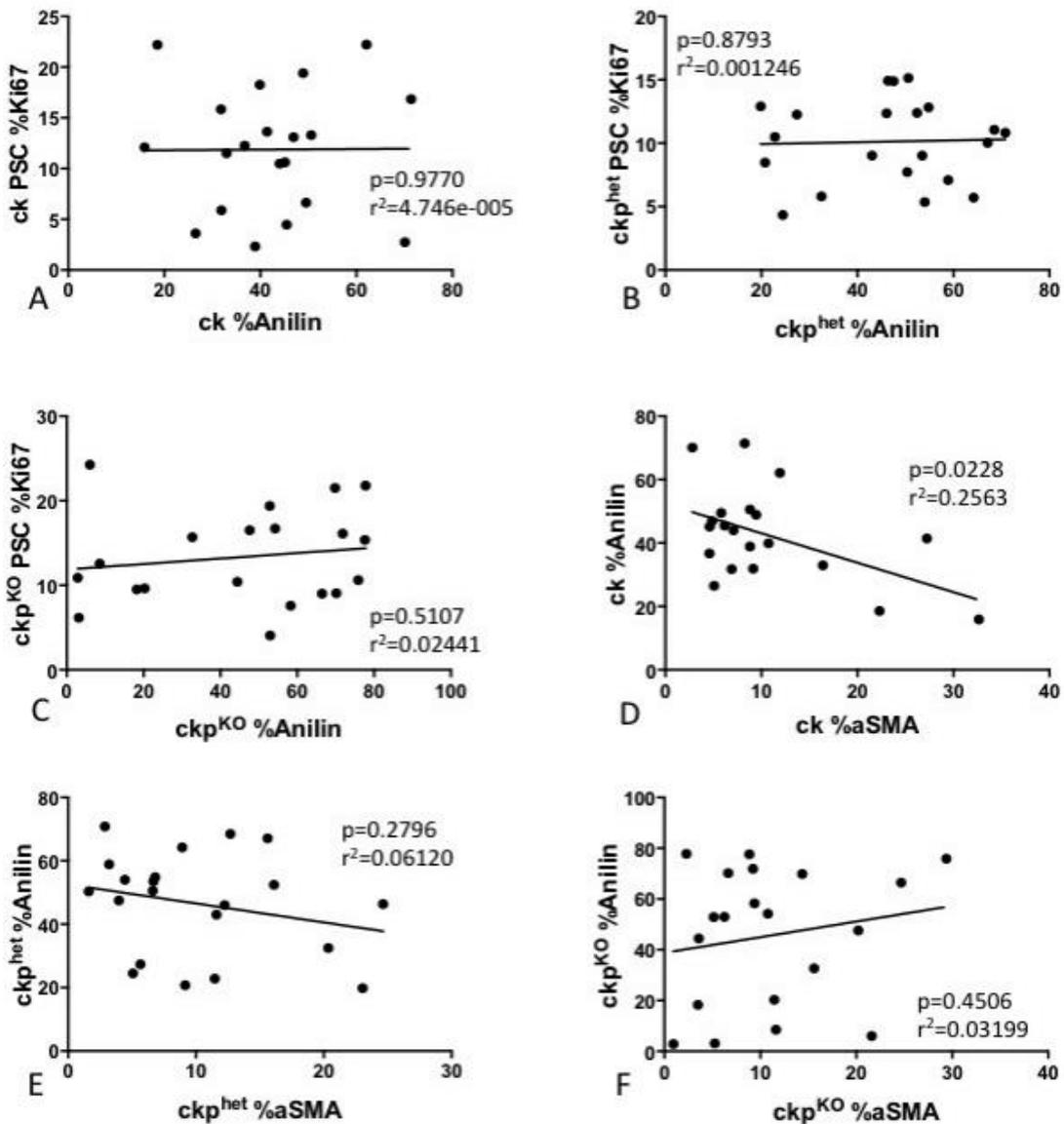
Wie bei humanem Gewebe zeigte die lineare Regressionsanalyse einen signifikanten Parallelismus zwischen den Krebs- und Sternzellproliferationsraten bei allen Mausmodellen (Abbildung 15, Abbildung 17).



**Abbildung 17** Korrelation der PSC-Proliferation mit PCC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression bei GEMMs: Die lineare Regressionsanalyse der Parameter, die durch semi-quantitative bzw. quantitative Analyse der Immunhistochemie erhoben wurden, zeigt eine signifikante Korrelation zwischen PSC- und PCC-Proliferation.

Es ließ sich jedoch bei keinem der Modelle eine signifikante Korrelation zwischen der PSC-Proliferation und der  $\alpha$ SMA-, Periostin-Expression oder der Kollagenbildung feststellen (**Abbildung 17**, **Abbildung 18**, **Abbildung 20**). Bei ck-Mäusen zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen der  $\alpha$ SMA-Expression und der

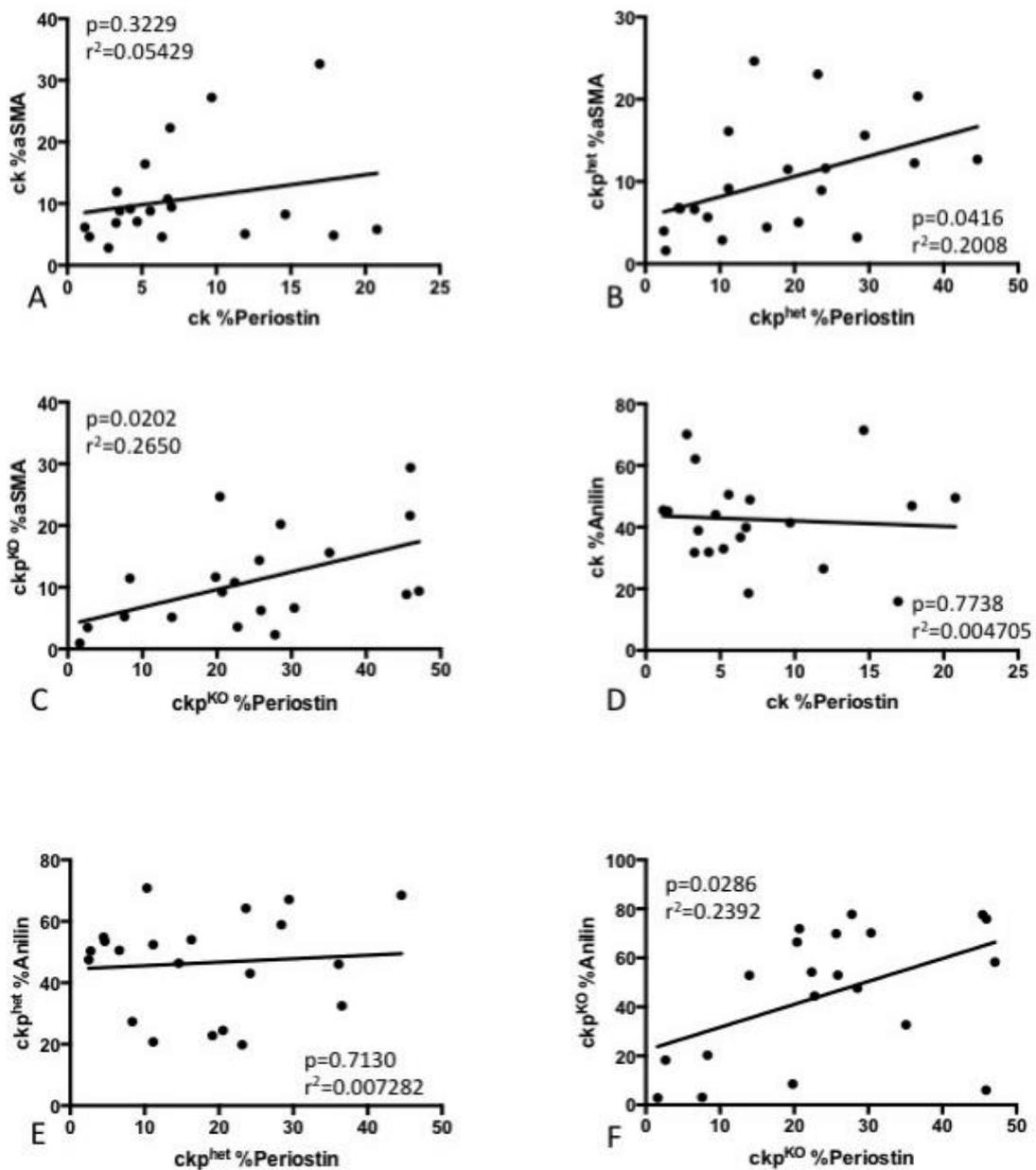
Anfärbbarkeit durch Anilin. Dieser Zusammenhang bestand weder bei  $ckp^{het}$ - noch bei  $ckp^{KO}$ -Mäusen (**Abbildung 18**).



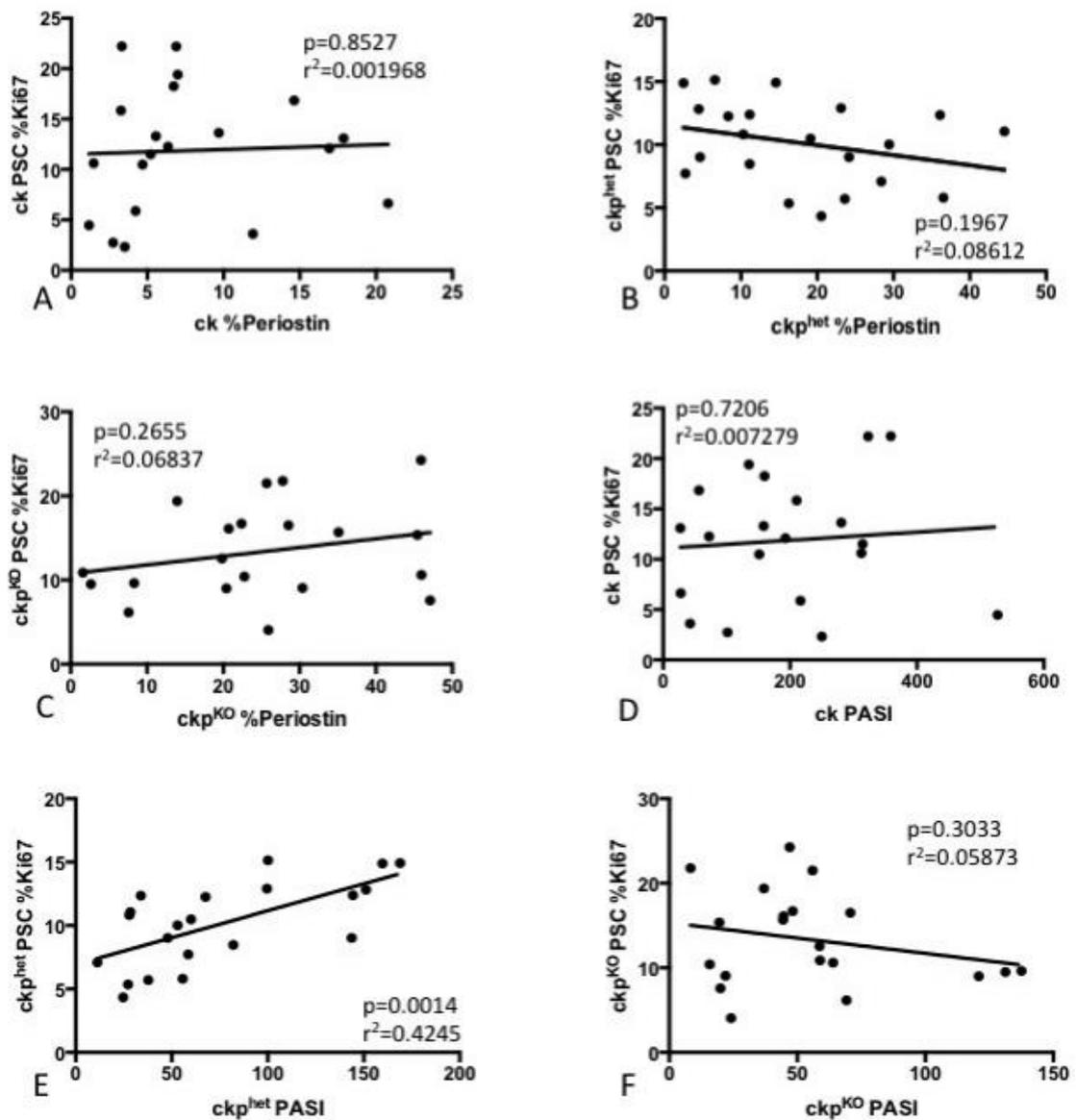
**Abbildung 18 Korrelation von Anilin-Positivität mit PSC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression:** Die lineare Regressionsanalyse von Parametern, die durch semi-quantitative bzw. quantitative immunhistochemische Analyse erhoben wurden, zeigt eine signifikante inverse Korrelation zwischen  $\alpha$ SMA-Expression und Anilin-Anfärbbarkeit bei Gewebe von  $ck$ -Mäusen ( $Ptf1a^{+/Cre}$   $K-ras^{+/LSL-G12D}$ ).

Bei der weiteren Analyse zeigte sich ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Periostin- und  $\alpha$ SMA-Expression bei  $ckp^{het}$ -Mäusen ( $p=0.042$ ) sowie auch

bei  $ckp^{KO}$ -Mäusen ( $p=0.02$ ). Bei  $ck$ -Mäusen bestand kein signifikanter Zusammenhang. Bei  $ckp^{KO}$ -Mäusen zeigte sich außerdem ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Periostin- und Anilin-Positivität ( $p=0.029$ ). Bei den anderen GEMMs bestand dieser Zusammenhang nicht (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19** Korrelation der Periostin-Expression mit  $\alpha$ SMA-Expression und Anilin-Positivität bei den verschiedenen Mausmodellen: Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen Periostin- und  $\alpha$ SMA-Expression bei  $ckp^{het}$ - und  $ckp^{KO}$ -Mäusen ( $p=0.042$  bzw.  $p=0.02$ , B und C). Bei  $ckp^{KO}$ -Mäusen zeigt sich zudem ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Periostin-Expression und Anilin-Positivität ( $p=0.029$ , F).



**Abbildung 20** Korrelation von Periostin-Expression sowie von PASI mit PSC-Proliferation bei den verschiedenen Mausmodellen: Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen PASI und PSC Ki67-Positivität bei ckp<sup>het</sup>-Mäusen ( $p=0.0014$ , E).

Bei ckp<sup>het</sup>-Mäusen ergab die lineare Regressionsanalyse einen signifikanten Zusammenhang zwischen PASI und PSC-Proliferation ( $p=0.0014$ ), welcher bei den anderen GEMMs nicht bestand (**Abbildung 20**). Zwischen PASI und PCC-Proliferation sowie zwischen ASI und PSC- sowie PCC-Proliferation bestand bei keinem der Mausmodelle eine signifikante Korrelation.

---

### 4.2.3 Korrelation der pathologischen Parameter mit dem Überleben von ck- und ckp-Mäusen

Um den Einfluss der histologischen Parameter auf das Überleben der verschiedenen GEMMs zu analysieren, führten wir für die folgenden Parameter eine Kaplan-Meier-Analyse sowie einen Log-Rank Test bei den beiden Mausmodellen durch: Proliferationsraten der PCCs und PSCs, ESPI,  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression sowie Kollagenbildung (**Tabelle 7**). Bei ck-Mäusen zeigte sich in der univariablen Analyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen  $\alpha$ SMA-Expression und einem längeren Überleben ( $p=0.017$ ). Eine niedrige Anilin-Positivität korrelierte ebenfalls signifikant mit längerem Überleben ( $p=0.004$ ). In der multivariablen Analyse ergaben sich eine signifikante positive Korrelation des ESPI ( $p=0.035$ ) sowie eine negative Korrelation der PCC-Proliferationsrate mit dem Überleben ( $p=0.023$ ). Auch die  $\alpha$ SMA-Expression wies in der multivariablen Analyse Signifikanz auf ( $p=0.036$ ). Es zeigte sich außerdem ein positiver Trend zwischen Periostin-Expression und Überleben ( $p=0.069$ ).

Bei den ckp<sup>het</sup>-Mäusen ergab sich weder in der univariablen noch in der multivariablen Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen der analysierten Parameter.

Bei den ckp<sup>KO</sup>-Mäusen zeigte sich in der univariablen Analyse eine signifikante negative Korrelation zwischen  $\alpha$ SMA-Expression ( $p=0.047$ ), PCC-Proliferation ( $p\leq 0.0001$ ) sowie auch PSC-Proliferation ( $p\leq 0.0001$ ) mit dem Überleben. Die PCC-Proliferation war bei den ckp<sup>KO</sup>-Mäusen der einzige unabhängige prognostische Faktor ( $p=0.013$ , **Tabelle 7**).

Bei allen GEMMs lag bei der Mehrzahl aller Tiere der ESPI  $\leq 2$  (ck: 55%, ckp<sup>het</sup>: 86%, ckp<sup>KO</sup>: 85%), sodass hier keine Subgruppen-Analyse erfolgte.

Tabelle 7: Ergebnisse der univariablen (UVA) und multivariablen (MVA) Analysen bei GEMMs.

Parameter	Medianes Überleben (Tage)	UVA	MVA	HR	95% Konfidenzintervall	
ck-PCCKi67 niedrig/ hoch	406/342	0.894	<b>0.023</b>	<b>19.613</b>	<b>1.510</b>	<b>254.745</b>
ck-PSCKi67 niedrig/ hoch	431/342	0.206	0.175	0.242	0.031	1.875
ck-ESPI niedrig/ hoch	319/434	0.294	<b>0.035</b>	<b>0.142</b>	<b>0.023</b>	<b>0.871</b>
ck-αSMA niedrig/ hoch	342/467	<b>0.017</b>	<b>0.036</b>	<b>0.219</b>	<b>0.053</b>	<b>0.902</b>
ck-Anilin niedrig/ hoch	467/337	<b>0.004</b>	0.916	1.105	0.172	7.084
ck-Periostin niedrig/ hoch	393/406	0.532	0.069	0.296	0.080	1.098
ckp <sup>het</sup> PCCKi67 niedrig/ hoch	104/170	0.258	0.137	0.151	0.012	1.829
ckp <sup>het</sup> PSCKi67 niedrig/ hoch	148/170	0.538	0.817	0.879	0.296	2.612
ckp <sup>het</sup> ESPI niedrig/ hoch	148/149	0.660	0.221	5.236	0.369	74.348
ckp <sup>het</sup> αSMA niedrig/ hoch	152/148	0.789	0.805	1.145	0.392	3.345
ckp <sup>het</sup> Anilin niedrig/ hoch	149/148	0.961	0.945	1.041	0.332	3.265
ckp <sup>het</sup> Periostin niedrig/ hoch	161/148	0.374	0.379	1.624	0.552	4.784
ckp <sup>KO</sup> PCCKi67 niedrig/ hoch	63/46	<b>≤0.0001</b>	<b>0.013</b>	<b>16.725</b>	<b>1.793</b>	<b>156.009</b>
ckp <sup>KO</sup> PSCKi67 niedrig/ hoch	63/46	<b>≤0.0001</b>	0.122	3.669	0.707	19.041
ckp <sup>KO</sup> ESPI niedrig/ hoch	52/50	0.543	0.791	1.244	0.248	6.232
ckp <sup>KO</sup> αSMA niedrig/ hoch	61/48	<b>0.047</b>	<b>0.196</b>	<b>2.718</b>	<b>0.597</b>	<b>12.380</b>
ckp <sup>KO</sup> Anilin niedrig/ hoch	60/50	0.772	0.831	0.878	0.265	2.908
ckp <sup>KO</sup> Periostin niedrig/ hoch	61/49	0.293	0.530	1.524	0.410	5.664

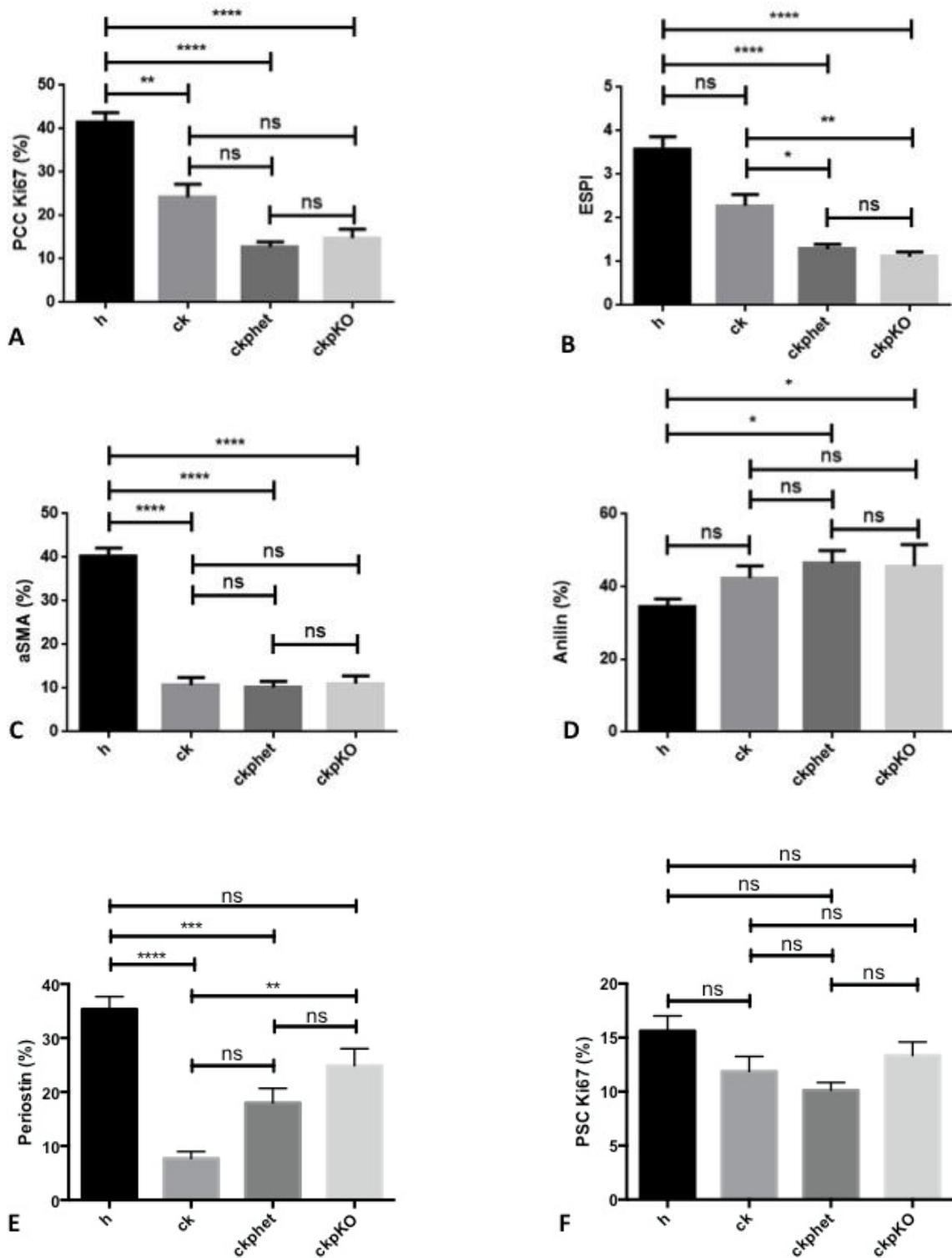
---

Beim Vergleich zweier Gruppen wurde der Median als Cut-off Wert verwendet. HR: Hazard Ratio,  $\alpha$ SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin, PCC: Pankreatische Tumorzellen, PSC: Pankreatische Sternzellen, ESPI: Epithelial Stromal Proliferation Index.

### 4.3 Vergleich von humanem und murinem Gewebe hinsichtlich Zellproliferation und Fibrose

Da für die Auswertung der Ki67-Färbung die absolute Zahl Ki67-positiver Zellen bei 400 Krebszellen sowie bei 400 Sternzellen gezählt wurde und da die Auswertung der  $\alpha$ SMA- und Anilin-Färbungen mittels PC-gestützter Bildanalyse erfolgte, konnten die Komponenten des Tumorstromas bei menschlichem und bei murinem Gewebe quantitativ verglichen werden. Dabei zeigte sich bei menschlichen Tumoren im Vergleich zu allen GEMMs eine signifikant höhere Proliferationsrate der Tumorzellen ( $p \leq 0.0001$ ). Zwischen den einzelnen GEMMs zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede. Hinsichtlich PSC-Proliferation ergaben sich zwischen keiner der Gruppen signifikante Unterschiede ( $p = 0.1921$ , vgl. **Abbildung 21**).

Der ESPI war bei menschlichem Gewebe und Gewebe der ck-Mäuse signifikant höher als bei ckp-Mäusen. Zwischen humanem Gewebe und ck-Mäusen zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise lag bei humanem Gewebe eine signifikant höhere  $\alpha$ SMA-Expression vor als bei jedem der GEMMs (+360% bis +406%,  $p \leq 0.0001$ ). Das Gewebe von ckp-Mäusen wies eine signifikant höhere Kollagenbildung auf als humanes Gewebe (+48% bis +55%,  $p = 0.0180$ ). Zwischen humanem Gewebe und Gewebe von ck-Mäusen bestand dabei kein signifikanter Unterschied. Die Periostin-Expression war bei humanem Gewebe signifikant höher als bei dem Gewebe sowohl von ck-Mäusen als auch von ckp<sup>het</sup>-Mäusen ( $p \leq 0.0001$ ). Ckp<sup>KO</sup>-Mäuse wiesen eine signifikant höhere Periostin-Expression als ck-Mäuse auf; zu humanem Gewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21** Quantitative Analyse von PDAC-Gewebe beim Menschen und genetisch modifizierten Mausmodellen: PCC Ki67: Proliferationsindex der pankreatischen Tumorzellen, PSC Ki67: Proliferationsindex der pankreatischen Sternzellen, ESPI: Epithelial Stromal Proliferation Index, αSMA: Alpha-Smooth Muscle Actin, h: human, n.s: nicht signifikant, \*: signifikant.

---

## 5 DISKUSSION

Bei der Zielsetzung unserer Studie beschäftigten wir uns vor allem mit der Frage: Wie kommt es bei verschiedenen Therapieansätzen mit antifibrotischem Wirkmechanismus beim PDAC zu einer so deutlichen Diskrepanz zwischen vielversprechenden Ergebnissen in präklinischen Studien und enttäuschenden Resultaten im klinischen Setting?

Als mögliche Ursachen für diese Problematik kommen vor allem die drei folgenden Aspekte in Frage: 1) Es werden ungeeignete experimentelle Designs und Werkzeuge verwendet: Ungeeignete Marker zur Erfassung der Veränderungen im Tumorstroma sowie ineffiziente Experimentalsysteme, die die Tumormikroumgebung nicht vergleichbar widerspiegeln, führen zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse.

2) Die antifibrotische Therapie wird nicht-selektiv bei allen Patienten angewendet. Bei einigen Patienten, bei denen das Stroma eine protektive Rolle einnimmt, könnte sie sich jedoch sogar kontraproduktiv auswirken.

3) Es liegen funktionelle Unterschiede des Tumorstromas beim Menschen und bei genetisch modifizierten Mausmodellen vor, welches entsprechend abweichende Interaktionen mit den Tumorzellen aufweist und somit Unterschiede im Verhalten der Tumor-Stroma-Einheit zur Folge hat.

An genetisch modifizierten Mausmodellen durchgeführte Studien werden durch viele Faktoren beeinflusst. Einflussfaktoren sind unter anderem der Zeitpunkt, an welchem ein bestimmtes Medikament eingesetzt wird sowie die Dauer, über die es gegeben wird. Dabei können bei unterschiedlichem Vorgehen gegenteilige Effekte ausgelöst werden. Hier lässt sich als ein Beispiel wieder die bereits erwähnte klinische Studie zur Stromareduktion durch einen Sonic Hedgehog- Inhibitor anführen, die auf Grund erhöhter Mortalität im Therapiearm abgebrochen werden musste (Amakye, Jagani et

---

al. 2013, Erkan 2013). Vorangegangen war der Einsatz desselben Medikamentes in einer präklinischen Studie mit durchschlagendem Erfolg (Olive, Jacobetz et al. 2009, Hwang, Moore et al. 2012). Die Aufarbeitung durch dieselbe Arbeitsgruppe zeigte, dass durch eine akute Verminderung des Stromas die Tumorperfusion zeitweise erhöht und somit die wirksame Konzentration von Medikamenten im Tumorgewebe erhöht werden kann, chronische Verminderung jedoch zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf und gering differenzierten Tumoren führt (Rhim, Oberstein et al. 2014).

Ein weiteres wichtiges Problem bei vielen Studien ist die Verwendung von  $\alpha$ SMA als Marker, um die „fibroblastische Aktivität“ von PSCs zu bestimmen (Tsang, Zhang et al. 2013, Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014). Doch obwohl die Extrazellulärmatrix ein Produkt aktivierter Sternzellen darstellt, korreliert die  $\alpha$ SMA-Expression nicht immer mit dem Grad der Fibrose oder Inflammation (Erkan, Michalski et al. 2008, Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). PSCs stellen eine wichtige Komponente des Tumorstromas dar und das Verständnis ihres Verhaltens ist sehr wichtig, um hier therapeutisch eingreifen zu können. Dabei wird häufig die  $\alpha$ SMA-Expression von PSCs mit „PSC-Aktivität“, und damit meist auch mit fibroblastischer Aktivität gleichgesetzt (Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014). Es besteht Einigkeit darüber, dass die  $\alpha$ SMA-Expression zusammen mit dem Verlust der Vitamin A-speichernden Fetttröpfchen die Transdifferenzierung von ruhenden PSCs zum aktivierten myofibroblastischen Phänotyp kennzeichnet (Erkan, Adler et al. 2012, Xue, Jia et al. 2018). Die Korrelation von  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs und PSC-Proliferation ist jedoch bislang unklar. Bisherige in vitro-Untersuchungen zeigten eine Überlappung der  $\alpha$ SMA-Expression mit der proliferativen Phase der PSCs, wobei jedoch meist nur ein kurzer Zeitraum von etwa 2 bis 3 Tagen untersucht wurde. Dabei wurden PSCs zumeist auf Plastik oder in Xenograft-Modellen kultiviert (Apte, Haber et al. 1998,

---

Bachem, Schneider et al. 1998, Masamune, Watanabe et al. 2008, Rebours, Albuquerque et al. 2013). Bei unserer Studie zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen PSC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression. Um die Reproduzierbarkeit dieser Begebenheit in vitro zu überprüfen, führten wir Immunfluoreszenz- und Westernblot-Untersuchungen durch: Eine Analyse von PCNA- und  $\alpha$ SMA-Expression bei kultivierten primären humanen pankreatischen Sternzellen über einen zeitlichen Verlauf von 64 Tagen zeigte, dass die  $\alpha$ SMA-Expression im Verlauf zunahm, während die Proliferationsrate der PSCs gleichzeitig abnahm. Physiologisch gesehen ist diese Entwicklung eigentlich nicht verwunderlich: bei  $\alpha$ SMA handelt es sich um ein Intermediärfilament des Zytoskeletts, das einen kontraktilen Faktor der Myofibroblasten darzustellen scheint. Dabei lassen sich Vergleiche zum Vorgang der physiologischen Wundheilung ziehen, bei der Fibroblasten ihren Phänotyp ändern. Während der Granulation mit Gewebekontraktion entwickelt sich ein hoher Anteil der Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche eine  $\alpha$ SMA-Expression aufweisen (Gabbiani 1992). Wenn die Wunde epithelialisiert ist und die Kontraktion somit sistiert, verschwinden die Myofibroblasten wieder - am ehesten durch Apoptose. Die dabei entstehende Narbe wird zellärmer, wobei sich noch typische Fibroblasten ohne Mikrofilamente beziehungsweise  $\alpha$ SMA nachweisen lassen (Gabbiani 1992). Auch bei fibrokontraktilen Erkrankungen entwickeln Fibroblasten kontraktile Eigenschaften und entwickeln eine Zentripetalkraft, die zu einer Kontraktion des Gewebes führt. Wie in chronischen Wunden persistieren dabei jedoch die Myofibroblasten (Gabbiani 1992, Arora and McCulloch 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten, die auf eine steifere Oberfläche mit somit erhöhter Spannung aufgebracht werden, die Struktur ihres Zytoskeletts sowie die Beschaffenheit des Integrins auf ihrer Zelloberfläche verändern (Desmouliere and Gabbiani 1992, Arora, Narani et al. 1999, Desmouliere, Chaponnier et al. 2005, Jones

---

and Ehrlich 2011). Wenn die Zellen auf eine steife Matrix aufgebracht werden, werden ihre Ausläufer länger; an der Zelloberfläche wird  $\alpha\beta3$ -Integrin exprimiert und die Zellen exprimieren  $\alpha$ SMA. Auf ein flexibles Gel aufgebracht, stellen sich die Zellen hingegen insgesamt kürzer dar, exprimieren  $\alpha2\beta1$ -Integrin auf der Zelloberfläche und kein  $\alpha$ SMA (Jones and Ehrlich 2011). Entsprechend exprimieren auch Fibroblasten bei der Wundheilung zu Beginn im frühen Granulationsgewebe unter minimaler Spannung  $\alpha2\beta1$ -Integrin auf der Zelloberfläche, welches für die Organisation feiner Kollagen-Fibrillen zu kräftigen Kollagensträngen benötigt wird. Im Verlauf unter zunehmender Spannung wird  $\alpha2\beta1$ -Integrin durch  $\alpha\beta3$ -Integrin bei gleichzeitig beginnender  $\alpha$ SMA-Expression ersetzt (Jones and Ehrlich 2011). Dieser Prozess findet dabei konsistent mit dem Wechsel von Interaktionen der Fibroblasten mit Kollagen zu Interaktionen mit nicht-Kollagen Proteinen statt. Es kommt dadurch bei Vorliegen einer erhöhten Spannung zur Wundkontraktion (Jones and Ehrlich 2011).

Aktinfilamente werden in Fibrillenbündeln organisiert und führen zu einer guten Adhäsion der Zellen am Substrat, wobei diese Organisation bei in vitro-Untersuchungen sehr von den Proteinen der Extrazellulärmatrix abhängt (Arora and McCulloch 1999). Aus der guten Adhäsion resultiert ein Schutz der Zellen gegen Apoptose (Arora and McCulloch 1999). Wenn Zellen mit Inhibitoren der fokalen Adhäsionskinase behandelt werden oder wenn der Integrin-Signalweg blockiert wird, wird die  $\alpha$ SMA-Expression in den Zellen ebenfalls reduziert (Mantoni, Lunardi et al. 2011). Es ist wahrscheinlich, dass ein steifes Stroma mit einem langsamen Turnover der Extrazellulärmatrix mit einer hohen  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs assoziiert ist und im Gegenzug ein weniger steifes Stroma mit einem schnelleren Turnover der Matrix sowie mit einer geringeren  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die  $\alpha$ SMA-Expression von PSCs zwar die Transdifferenzierung von PSCs zum aktiven myofibroblastischen Phänotyp anzeigt,

---

jedoch nicht mit der PSC-„Aktivität“ per se gleichgesetzt werden kann, und dass eine solche Interpretation somit zu falschen Schlussfolgerungen bei Studien führt (Erkan, Adler et al. 2012). Als ein neuer Therapieansatz werden derzeit auch Angriffspunkte an Signalwegen, die zur PSC-Inaktivierung führen, untersucht. So führt die Hemmung des MAPK-Signalwegs in PSCs über Retinol beziehungsweise Retinsäure zu einer Induktion der Inaktivierung von aktivierten PSCs (Kim, Yoo et al. 2009, Masamune and Shimosegawa 2009, Erkan, Adler et al. 2012). Auch weitere Ansatzpunkte zur PSC-Inaktivierung werden erforscht (Kim, Yoo et al. 2009, Erkan, Adler et al. 2012, Han, Li et al. 2018, Kanat and Ertas 2018). Obwohl die Extrazellulärmatrix ein Produkt aktivierter PSCs ist, korreliert die PSC-„Aktivität“, die durch  $\alpha$ SMA-Expression ermittelt wird, jedoch nicht immer mit der Ausprägung der Fibrosierung des Gewebes oder auch der Infiltration inflammatorischer Zellen (Michalski, Gorbachevski et al. 2007, Erkan, Michalski et al. 2008, Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). Die Funktion der  $\alpha$ SMA-positiven, aktivierten PSCs kann prädominant fibroblastisch oder fibrolytisch sein (Krizhanovsky, Yon et al. 2008). PSCs können Proteine der Extrazellulärmatrix sezernieren, jedoch beispielsweise auch Matrix-Metalloproteinasen, welche ECM-Proteine abbauen, sowie Gewebeinhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen (Tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP) produzieren (Liu and Du 2015). Zellen mit prädominant fibrolytischer Funktion führen zu einem Abbau von Extrazellulärmatrix. Auch zwischen der  $\alpha$ SMA-Expression von PSCs und der Kollagen-Ablagerung besteht somit keine Korrelation. Dies konnte übereinstimmend mit früher publizierten Daten auch in unserer Studie gezeigt werden. Deshalb bedeutet die Elimination von PSCs, die mit ihrer fibrolytischen Aktivität auch für das Turnover der ECM verantwortlich sind, in späteren Tumorstadien auch nicht unbedingt, dass dadurch die Stromadichte abnimmt.

---

Bezüglich des zweiten Punktes ist ein wichtiger Aspekt, dass die Menge an desmoplastischem Gewebe beim PDAC innerhalb eines Tumors sowie auch zwischen den einzelnen Patienten sehr variabel ausgeprägt ist, was einen bedeutenden Einfluss auf die Prognose hat. Insgesamt ist die extrazelluläre Matrix eine wichtige Komponente der Tumormikroumgebung. ECM-Proteine können die Mikroumgebung modulieren und die Homöostase regulieren (Liu and Du 2015).

Der Activated Stroma Index (ASI), definiert als das Verhältnis von  $\alpha$ SMA-Expression zu Anilin-Expression, ist ein Marker für die Stromaaktivität beim PDAC: Der Index zeigt an, ob das Stroma prädominant als fibrolytisch, fibrogen, inaktiv oder schlafend zu werten ist (Erkan, Hausmann et al. 2012). Der ASI ist ein unabhängiger prognostischer Marker für das Überleben, obwohl Tumorzellen weder  $\alpha$ SMA noch Anilin exprimieren (Erkan, Michalski et al. 2008). Dies zeigt, wie wichtig der Einfluss der Tumormikroumgebung - unter anderem durch Selektionsdruck auf die Tumorzellen mit sequenzieller phänotypischer Adaptation auf diese Barriere - auf das Verhalten des PDAC ist (Erkan, Michalski et al. 2008, Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). Eine desmoplastische hypoxische Mikroumgebung kann zur Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms beitragen, indem Apoptose-resistente Klone selektioniert werden (Erkan, Hausmann et al. 2012, Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012, Le, Rajeshkumar et al. 2012). Zudem kann ein desmoplastisches Stroma den Transport von Therapeutika zu den Tumorzellen sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen beeinträchtigen (Provenzano, Cuevas et al. 2012, Jain 2013, Whatcott, Diep et al. 2015, Kim, Shin et al. 2017).

Der Effekt des Grades an Desmoplasie auf das Outcome beim PDAC ist sogar vergleichbar mit dem des Lymphknotenstatus (Erkan, Michalski et al. 2008). Auch unsere Daten zeigen, dass das Tumorstroma beim humanen PDAC nicht einheitlich ist. Bei der Analyse des Stromas zeigten sich hohe Standardabweichungen bei der

---

$\alpha$ SMA-Expression (16,4%), der Periostin-Expression (19,8%) sowie auch bei der Anilin-Positivität (18,3%). Auch die Ki67-Positivität von PCCs und PSCs wies in unserem Kollektiv hohe Standardabweichungen auf (19,5% bzw. 11,8%). Bei der Korrelation dieser Parameter mit dem Überleben zeigte sich, dass das Verhältnis von Ki67-Positivität der PCCs zu Ki67-Positivität der PSCs dabei den einzigen unabhängigen prognostischen Faktor unter den pathologischen Parametern darstellt. Wir definierten diesen Parameter als Epithelial Stromal Proliferation Index (ESPI). Der Grad der Tumorzell-Proliferation allein hat keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben; bei der PSC-Proliferation wiesen Patienten mit hohen und mit niedrigen Werten ein annähernd gleiches Überleben auf. Entscheidend ist also das Verhältnis dieser beiden Parameter zueinander, beziehungsweise die Balance der Proliferationsraten von PCCs und PSCs.

Es zeigte sich, dass der ESPI bei hoher PCC-Proliferation tendenziell ebenfalls höhere Werte aufweist; möglicherweise kann hier die PSC-Proliferation in den peritumoralen Arealen nicht mit den schneller proliferierenden Tumorzellen „mithalten“. Bei Patienten mit einem solchen hohen ESPI war das Überleben schlechter. In einer multivariablen Analyse konnte gezeigt werden, dass die Balance der Proliferationsraten von PCCs und PSCs zusammen mit dem Lymphknotenstatus und der Tumorgröße den wichtigsten Einfluss auf das Patientenüberleben zu haben scheint. Eine Subgruppen-Analyse zeigte, dass Patienten mit einem  $ESPI \leq 2$  eine andere Tumorbilogie beziehungsweise Stromareaktion aufweisen, die mit einem dreimal längeren Überleben assoziiert ist. Es handelt sich dabei um 28% der Kohorte. Klinisch sind die Patienten älter, haben häufiger differenzierte Tumore und weisen weniger häufig Metastasen auf. Der Grund für das niedrige ESPI-Verhältnis ist bei diesen Patienten aber nicht allein die geringere Proliferationsrate der Tumorzellen, sondern auch eine signifikant höhere Proliferationsrate der PSCs verglichen mit den anderen ESPI-

---

Fraktionen. Die Tumore weisen auch eine signifikant geringere  $\alpha$ SMA-Expression und eine geringere Kollagenablagerung in ihrem Stroma auf. Wie oben bereits beschrieben, wird  $\alpha$ SMA analog zum physiologischen Prozess der Wundheilung in Fibrillenbündeln organisiert und führt zu einer besseren Adhäsion der Zellen und somit zu einer geringeren Motilität der PSCs beziehungsweise zu einem steiferen Stroma (Arora and McCulloch 1999).

Es scheint also insgesamt so, dass Patienten mit einem ESPI  $\leq 2$  ein dynamischeres Stroma mit einem schnellen Turnover der Extrazellulärmatrix aufweisen.

Bei der linearen Regressionsanalyse der immunhistochemisch erhobenen Parameter korrelierte in unserer Untersuchung eine höhere PSC-Proliferationsrate signifikant invers mit der  $\alpha$ SMA-Expression. Diese korrelierte wiederum signifikant linear mit der Periostin-Expression. Eine hohe Sternzell-Proliferationsrate scheint also tendenziell mit einer geringeren  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression assoziiert zu sein.

Ein ESPI  $\leq 2$  korrelierte in unserer Studie signifikant mit einer niedrigen PCC-Proliferationsrate ( $p=0.0225$ ), einer hohen PSC-Proliferationsrate ( $p=0.0002$ ), niedriger  $\alpha$ SMA-Expression ( $p=0.0289$ ) und höherem Patientenalter ( $p=0.0241$ ). Es zeigten sich außerdem positive Trends bei niedriger Anilin-Positivität ( $p=0.0548$ ) sowie bei guter Differenzierung der Tumore (G1 vs. G2 und G3,  $p=0.0623$ ).

Übereinstimmend hierzu zeigte sich in der Korrelation mit dem Patientenüberleben in unserer Kohorte ein tendenziell längeres Überleben bei Patienten mit niedriger PCC-Proliferationsrate (19 vs. 13 Monate) sowie bei niedriger  $\alpha$ SMA-Expression (18 vs. 15 Monate), wenn auch nur die Korrelation von ESPI mit dem Überleben Signifikanz aufwies (18 vs. 12 Monate,  $p=0.008$  in der multivariablen Analyse bei ESPI  $\leq 2$  bzw.  $>2$ ). Dies scheint die These zu unterstützen, dass ein weniger dichtes Stroma vorteilhaft ist. Die Rolle des Periostins scheint jedoch schwieriger zu erfassen zu sein: Bei ESPI-Werten  $\leq 2$  zeigte sich tendenziell eine etwas niedrigere Periostin-Expression

---

als bei einem hohen ESPI; das Patientenüberleben war jedoch bei hoher Periostin-Expression etwas besser als bei niedrigen Werten (17 vs. 15 Monate).

In den meisten Studien wird eine hohe Periostin-Expression mit einem schlechteren Outcome in Verbindung gebracht (Erkan, Kleeff et al. 2007, Liu and Du 2015, Liu, Li et al. 2016). Periostin, auch Osteoblast-Specific Factor 2 (OSF-2), ist ein sekretorisches ECM-Protein, welches im Periost exprimiert und in der Tumormikroumgebung verschiedener Tumorentitäten überexprimiert wird; beim PDAC ist die Periostin-Expression 42mal höher als in gesundem Pankreasgewebe (Erkan, Hausmann et al. 2012). Neuere Studien zeigen, dass Periostin mit der Karzinogenese verschiedener Malignome assoziiert ist und bei verschiedenen Karzinomentitäten überexprimiert ist, so außer beim Pankreaskarzinom (Erkan, Kleeff et al. 2007, Ben, Jin et al. 2011) unter anderem auch beim Mammakarzinom, beim Neuroblastom, beim epithelialen Ovarialkarzinom sowie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Sasaki, Sato et al. 2002, Morra, Rechsteiner et al. 2012, Xu, Xu et al. 2012, Kang, Liu et al. 2018). Mit der Periostin-Immunhistochemie lässt sich eine Fibrosierung des Gewebes gut darstellen. Periostin wird beim PDAC ausschließlich von aktivierten Sternzellen produziert und ist mit einem Krankheitsprogress assoziiert (Erkan, Kleeff et al. 2007). Es konnte sogar gezeigt werden, dass Periostin ein früherer Indikator für die Aktivierung von PSCs ist als  $\alpha$ SMA, welches derzeit den am häufigsten verwendeten Marker für die PSC-Aktivierung darstellt (Erkan, Kleeff et al. 2007). Periostin scheint ein Marker für die Tumor-spezifische Sternzell-Aktivierung zu sein (Erkan, Hausmann et al. 2012). Es wird angenommen, dass Periostin die PCC-Proliferation stimuliert und die Widerstandskraft der Tumorzellen gegen Nährstoffmangel und Hypoxie erhöht (Baril, Gangeswaran et al. 2007, Liu and Du 2015) sowie ihre Invasivität fördert (Baril, Gangeswaran et al. 2007, Ben, Jin et al. 2011). Bei hohen Periostin-Konzentrationen erfolgt eine Aktivierung des AKT-

---

Signalwegs, wodurch es zu einem besseren Überleben der PCC unter hypoxischen Bedingungen sowie zu einer erhöhten Migration von Tumorzellen kommt (Kanno, Satoh et al. 2008). Außerdem wirkt Periostin proangiogen (Liu and Du 2015); auch induziert es die Expression von Matrix-Metalloproteinasen, wodurch der Abbau von Extrazellulärmatrix sowie die PCC-Migration unterstützt wird (Conway, Izuhara et al. 2014). Periostin könnte sogar für die Chemoresistenz auf Gemcitabin verantwortlich sein (Liu, Li et al. 2016). PCCs wiederum stimulieren PSCs zur Sekretion von Periostin (Erkan, Kleeff et al. 2007). Somit erhöht die Interaktion von pankreatischen Tumor- und Sternzellen die Periostin-Expression (Liu and Du 2015). Periostin scheint auch die PSC-Aktivität zu erhöhen (Erkan, Kleeff et al. 2007). Einmal durch Tumorzellen aktiviert, können PSCs ihr aktives Stadium durch einen autokrinen „Periostin-Loop“ sogar unter Radiotherapie aufrechterhalten und ECM-Proteine produzieren (Erkan, Kleeff et al. 2007). Der genaue Effekt von Periostin auf PCCs ist jedoch bislang unklar und wird kontrovers diskutiert: Beispielsweise zeigte eine Studie von Kanno et al. ein langsames Wachstum bei Tumoren mit Periostin-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle (Kanno, Satoh et al. 2008). Auch wiesen Tumore mit Periostin-Überexpression in dieser Studie eine geringere Metastasierung auf (Kanno, Satoh et al. 2008). Periostin könnte also auch je nach Expressionsmenge einen biphasischen Effekt auf die Tumorzellproliferation beim PDAC haben (Liu and Du 2015). Dabei scheinen niedrige Periostin-Konzentrationen die Tumoraggressivität zu hemmen; hohe Konzentrationen scheinen hingegen zu einer Erhöhung der Tumoraggressivität zu führen (Kanno, Satoh et al. 2008).

Beim Menschen sowie auch bei genetisch modifizierten Mausmodellen, die auf einer Aktivierung des K-ras- Onkogens basieren, spiegelt die Proliferationsrate der PSCs die der PCCs wider, was auch unsere Daten zeigen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass

---

PSCs bei der Pankreaskarzinogenese nicht zwei gegensätzliche Rollen spielen können. Es wird weithin angenommen, dass die Aktivierung von PSCs sich Tumorsupportiv auswirkt (Bachem, Schunemann et al. 2005, Erkan, Kleeff et al. 2007, Apte and Wilson 2012, Apte, Wilson et al. 2013, Kadaba, Birke et al. 2013). Pankreatische Sternzellen stellen Schlüsselmediatoren der desmoplastischen Stromareaktion dar (Farrow, Rowley et al. 2009). Einige Therapieansätze zielen darauf ab, die sekretorische Funktion von PSCs zu hemmen oder aktivierte PSCs wieder in ihren Ruhezustand zu versetzen (Apte, Pirola et al. 2012, Pang, Wilson et al. 2017, Yeo, Phillips et al. 2017). Hintergrund ist dabei, durch nachlassende ECM-Produktion die Gewebisdichte zu reduzieren. Dadurch hofft man zum einen, durch eine verbesserte Blutversorgung den Transport von Chemotherapeutika zu den Tumorzellen zu verbessern (Neesse, Michl et al. 2011), zum anderen hofft man durch Verringerung von Hypoxie die Selektion resistenterer und aggressiverer Tumorzellklone zu verhindern (Gharibi, Adamian et al. 2016). Solche Therapieansätze, die am Pankreasstroma angreifen, zeigten jedoch in klinischen Studien bislang keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Bahrami, Khazaei et al. 2017).

In unserer Studie zeigte sich hingegen, dass Patienten mit einem niedrigen ESPI – der mit einer hohen PSC-Proliferationsrate assoziiert ist - ein besseres Überleben aufweisen als Patienten mit hohem ESPI. Es gibt einige Studien, die auf eine protektive Rolle von Sternzellen und Tumorstroma hindeuten (Bissell and Hines 2011, Erkan 2013, Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014, Rhim, Oberstein et al. 2014, Xue, Jia et al. 2018). Die Verminderung Karzinom-assoziiertes Fibroblasten könnte eine Immunsuppression induzieren sowie die Epithelial-mesenchymale Transition fördern (Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014). Einige Studien deuten sogar darauf hin, dass die Eliminierung des Stromas zu gering differenzierten Tumoren und beschleunigter Tumorprogression führen könnte (Ozdemir, Pentcheva-Hoang et al. 2014, Rhim,

---

Oberstein et al. 2014). Auch die Inzidenz des PDAC (10-12:100.000) verglichen mit der Häufigkeit von dysplastischen PanIN-Läsionen, aus denen sich kein invasives Karzinom entwickelt, spricht dafür, dass Kontrollmechanismen des Körpers ein Fortschreiten der Karzinogese verhindern können (Lohr, Kloppel et al. 2005, Erkan 2013). Die Aktivierung von PSCs und die Bildung von Extrazellulärmatrix kann einen Abwehrmechanismus des Körpers darstellen, wodurch eine Barriere um den schädlichen Stimulus gebildet und so die Tumorausbreitung gehemmt wird (Bissell and Hines 2011). Dabei lassen sich Vergleiche zum physiologischen Prozess der Wundheilung ziehen, bei welchem Fibroblasten eine Transformation zu  $\alpha$ SMA-exprimierenden Myofibroblasten vollziehen wie oben bereits beschrieben (Gabbiani 1992). Durch eine Hemmung des lokalen Wachstums des Tumors kommt es möglicherweise zu einer besseren Resektabilität. Allerdings kann ein dichtes Stroma auch einen Trigger zur Metastasierung des Karzinoms darstellen (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). Diesen Zusammenhang bestätigte unsere Korrelation von pankreatischer Tumorzellproliferation und –invasion unter Serum-Entzug, bei der bei abnehmender Konzentration von fetalem Kälberserum ein signifikanter Anstieg der Tumorzellinvasion nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 12**). Unter bestimmten Umständen könnte eine Zerstörung der Stroma-Barriere im Gegensatz hierzu jedoch zu einer Steigerung der Metastasierung führen, das Tumorstroma also auch in dieser Hinsicht einen protektiven Effekt aufweisen (Erkan 2013). Insbesondere in späteren Stadien, in denen die Selektionierung aggressiverer Tumorzellklone bereits stattgefunden hat, besitzt die Kombination von Chemotherapie mit antifibrotischer Therapie nicht die Potenz, alle Tumorzellen zu eradizieren, könnte jedoch den Weg für eine gesteigerte Disseminierung von Tumorzellen „frei machen“ (Erkan 2013).

Die Ursachen für die Diskrepanz, dass viele Studien eine Tumor-supportive Rolle des Stromas beim PDAC zu belegen scheinen, andererseits einige Untersuchungen im

---

Gegenteil aber eine protektive Rolle des Stromas zeigen, müssen dringend eingehender untersucht werden. Sie deutet darauf hin, dass die Beschaffenheit des Tumorstromas von Patient zu Patient variieren kann.

Wenn diese Annahme zutrifft, wäre die nicht-selektive Anwendung antifibrotisch wirksamer Therapeutika nicht sinnvoll. Insbesondere für die Patientengruppe mit einem ESPI  $\leq 2$ , welche die beste Prognose aufweist, wäre eine solche Therapie kontraproduktiv.

Ein weiterer Aspekt, der einen großen Einfluss auf die Karzinogenese beim PDAC zu haben scheint, ist das Vorliegen einer Entzündungsreaktion im Pankreasgewebe. So entsteht das PDAC häufig auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis, wobei es sich um einen fortschreitenden fibroinflammatorischen Prozess handelt (Braganza, Lee et al. 2011). Auch bei verschiedenen anderen Organen entstehen Karzinome gehäuft auf dem Boden einer chronischen Fibrose und Entzündung. Natürlich entsteht das PDAC nicht immer in Zusammenhang mit einer chronischen Pankreatitis, aber in fortgeschrittenen Stadien liegen fast immer eine Entzündungsreaktion mit Infiltration von verschiedenen Entzündungszellen sowie eine fibrotische Reaktion vor, wobei es schwer zu sagen ist, welche dieser Faktoren zu welchem Grad Ursache oder Folge der Karzinogenese sind, beziehungsweise zu welchen Teilen die Faktoren zusammenspielen (Kessenbrock, Plaks et al. 2010, Mehner, Miller et al. 2014). Infiltrierende Entzündungszellen können das Tumorzellwachstum beeinträchtigen; sie sezernieren jedoch auch Wachstumsfaktoren und angiogene Faktoren, die Tumorzellen stimulieren und ihre Proliferation fördern, sowie verschiedene proteolytische Enzyme, die die Struktur und Funktion der Extrazellulärmatrix beeinträchtigen (Hanahan and Coussens 2012, Mehner, Miller et al. 2014). So produzieren beispielsweise Makrophagen und neutrophile Granulozyten Matrix

---

Metalloproteinase-9 (MMP9), ein Enzym, welches durch Stimulation von hyperproliferativem Wachstum und Neoangiogenese eine große Rolle in der frühen Karzinogenese spielt (Hanahan and Coussens 2012, Mehner, Miller et al. 2014). Eine chronische Inflammation ist auch durch eine vaskuläre Hyperpermeabilität gekennzeichnet, vergleichbar mit hyperpermeablen unreifen Tumorgefäßen (Gkretsi, Zacharia et al. 2017).

Auch die inflammatorische Reaktion beim PDAC ist somit ein potenzieller Angriffspunkt für Therapeutika, wobei sich jedoch die Ausprägung dieser Reaktion und möglicherweise auch ihre effektive Funktion – insbesondere auch durch die Interaktion mit Tumorzellen und Tumormikroumgebung – von Patient zu Patient unterscheiden kann.

Hinsichtlich des dritten Punktes gibt es unserer Kenntnis nach bislang keine Studie, die die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des PDAC-Stromas in humanem Gewebe und bei genetisch modifizierten Mausmodellen untersucht. Hier konnten wir zeigen, dass die Tumorzellen in humanem Gewebe signifikant höhere Proliferationsraten aufweisen als bei den untersuchten GEMMs (unter Berücksichtigung von homo- und heterozygoten *ckp*-Mäusen im Folgenden als drei GEMMs bezeichnet). Dies führt auch zu einem deutlich höheren ESPI in humanem Gewebe im Vergleich zu GEMMs (signifikant bei *ckp*<sup>het</sup>- und *ckp*<sup>KO</sup>-Mäusen). Der Anteil an *ckp*-Mäusen mit einem ESPI  $\leq 2$  liegt bei 85%; beim Menschen liegt dieser Anteil nur bei 28%. Bei 72% der Patienten lag die Proliferationsrate der Krebszellen über denen der GEMMs. Es zeigten sich auch Gemeinsamkeiten bei der Beschaffenheit von humanem und murinem Stroma: So wiesen bei allen drei Mausmodellen die Proliferationsraten von PCCs und PSCs wie in humanem Gewebe eine signifikante lineare Korrelation auf. Auch beispielsweise  $\alpha$ SMA- und Periostin-Expression zeigten bei *ckp*<sup>het</sup>- und *ckp*<sup>KO</sup>-Mäusen wie beim

Menschen eine signifikante lineare Korrelation. Humanes und murines PDAC-Stroma wies in unserer Studie jedoch weitere deutliche Unterschiede auf: Die  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs in humanem Stroma war signifikant höher als bei allen drei GEMMs; die Kollagen-Ablagerung hingegen war deutlich niedriger (Signifikanz bei  $ckp^{het}$ - und  $ckp^{KO}$ -Mäusen). Humanes Gewebe wies in unserer Untersuchung eine deutlich höhere Periostin-Expression verglichen mit murinem Gewebe auf (Signifikanz im Vergleich zu  $ck$ - sowie zu  $ckp^{het}$ -Mäusen). Während  $\alpha$ SMA-Expression und Anilin-Positivität zwischen den drei untersuchten Mausmodellen keine relevanten Unterschiede aufwiesen, zeigten sich zwischen allen drei Modellen deutliche Differenzen bei der Periostin-Expression:  $ck$ -Mäuse wiesen dabei die geringste,  $ckp^{KO}$ -Mäuse die höchste Periostin-Expression auf. Die Sternzell-Proliferationsrate zeigte keine signifikanten Unterschiede, war in humanem Gewebe aber tendenziell höher als bei den Mausmodellen. Der ESPI hatte nur bei  $ck$ -Mäusen einen relevanten Einfluss auf das Überleben. Erstaunlicherweise war hier ein hoher ESPI mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert; eine niedrige PCC-Proliferationsrate korrelierte signifikant, eine niedrige PSC-Proliferationsrate nicht signifikant mit einem besseren Überleben. Interessanterweise korrelierte bei  $ck$ -Mäusen eine hohe  $\alpha$ SMA-Expression signifikant mit einem besseren Überleben, bei  $ckp^{KO}$ -Mäusen im Gegenteil eine niedrige  $\alpha$ SMA-Expression. Auch bei diesem Mausmodell waren niedrige PCC- und PSC-Proliferationsraten mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert.

Die Untersuchung zeigt eindrücklich, dass keines der verwendeten Mausmodelle das Tumorstroma beim PDAC und somit auch die Tumor-Stroma-Interaktionen adäquat abbildet. Die drei untersuchten GEMMs unterscheiden sich auch untereinander stark in der Beschaffenheit des Stromas. Insbesondere zeigen sich deutliche Differenzen in der Gesamtausprägung verschiedener Marker, was zum Teil einen großen Einfluss auf deren Bedeutung zu haben scheint. Dies zeigt, dass es nicht auf einzelne absolute

---

Werte, sondern auf das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des Tumorstromas ankommt. Beispielsweise ist die  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs beim Menschen deutlich stärker ausgeprägt als im murinen Gewebe; hier ist eine niedrigere Expression vorteilhaft für das Outcome. Bei den drei GEMMs ist der Einfluss der  $\alpha$ SMA-Expression auf das Überleben hingegen unterschiedlich; bei einem der Modelle korreliert ein hoher Wert mit einem längeren Überleben. Bei der Periostin-Expression geht das abfallende durchschnittliche Überleben der drei untersuchten GEMMs mit ansteigenden mittleren Periostin-Werten einher. Dabei zeigt sich bei ck-Mäusen, dem Modell mit den niedrigsten durchschnittlichen Periostin-Werten und dem längsten Überleben, bei einer hohen Periostin-Expression ein besseres Outcome (Trend;  $p=0.069$  in der multivariablen Analyse), bei ckp<sup>KO</sup>-Mäusen im Gegensatz bei einem niedrigem Periostin-Wert tendenziell ein besseres Outcome (nicht signifikant). Hierbei ist zu beachten, dass Tendenzen natürlich auch durch die kleine Fallzahl bedingt sein könnten; die Ergebnisse sollten somit mit Vorsicht interpretiert werden. Auch der ESPI ist bei abweichenden PSC- und vor allem deutlich unterschiedlichen PCC-Proliferationsraten weder zwischen humanem und murinem Stroma, noch zwischen den verschiedenen Mausmodellen vergleichbar.

Die Unterschiede zwischen humanem und murinem Tumorstroma könnten durch die unterschiedliche Tumorentwicklung bei Menschen und GEMMs herrühren. Während die Mehrzahl der humanen PDACs unifokal sind und meist erst im späten Erwachsenenalter entstehen, werden bei GEMMs genetische Veränderungen häufig simultan in vielen Zellen induziert, um den Zeitraum der Tumorentwicklung zu verkürzen. Onkogene Mutationen werden während der Organentwicklung in Epithelzellen eingebracht, wodurch die maligne Transformation im gesamten Pankreas simultan beginnt. Die präkanzerösen Läsionen sowie die Tumore bei GEMMs weisen daher meist ein multifokales oder diffuses Wachstum auf und

---

entstehen viel früher im Leben der Tiere, werden jedoch häufig als Modelle für sporadische, nicht-hereditäre PDAC verwendet (Gopinathan, Morton et al. 2015, Krempley and Yu 2017). Auch die Desmoplasie ist häufig nicht so stark ausgeprägt wie in humanem PDAC. Es ist möglich, dass durch die schnelle und multifokale Tumorentstehung und –entwicklung bei GEMMs den Stromakomponenten keine Zeit bleibt, schrittweise auf diese Entwicklung zu reagieren wie in humanem PDAC. Insbesondere die Ausbildung der Extrazellulärmatrix könnte einen längeren Zeitraum in Anspruch nehmen. Weitere wichtige Abweichungen bei der Tumorentwicklung zwischen Mäusen und Menschen kommen durch genetische Unterschiede zustande: So befinden sich beispielsweise die für p53 und BRCA1 kodierenden Gene bei Mäusen auf demselben Chromosom, was die Wahrscheinlichkeit einer simultanen Deletion erhöht (Sharpless and Depinho 2006). Auch weisen Mäuse eine andere Beschaffenheit der Telomere auf als Menschen, was zu Unterschieden bei der Entstehung und der Progression von Mutationen führt (Artandi, Chang et al. 2000, Krempley and Yu 2017).

Insgesamt sind die Ergebnisse in GEMMs reproduzierbar und konsistent; Eigenschaften und Verhalten von PDAC in Mäusen können jedoch nicht einfach mit humanem PDAC gleichgesetzt werden. Es gibt viele experimentelle Tiermodelle, die die klinische Situation am Menschen nicht ausreichend repräsentieren. Die jeweiligen Systeme mit multiplen Signalwegen auf zellulärer und subzellulärer Ebene sind zu komplex, als dass der Effekt einer genetischen Intervention auf den Phänotyp exakt vorhergesagt werden könnte (Erkan, Hausmann et al. 2012, Perez-Mancera, Guerra et al. 2012). GEMMs sind nichtsdestotrotz derzeit die besten verfügbaren Modelle zur Untersuchung des PDAC. Die an ihnen erhobenen Daten sollten jedoch mit Vorsicht interpretiert werden (Erkan, Hausmann et al. 2012).

---

Falls durch antifibrotische Therapieansätze ein positiver Effekt erzielt werden kann, sind Patienten mit höherem ESPI wahrscheinlich diejenigen, die davon profitieren könnten. Das Gewebe insbesondere dieser Patienten wird von GEMMs derzeit nicht adäquat abgebildet.

Unsere Studie zeigt eine weitere interessante Korrelation: Patienten mit niedriger PCC-Proliferation scheinen häufiger Lymphknotenmetastasen zu entwickeln (83% vs. 61%,  $p=0.06$ ). Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant, aber es zeigt sich ein eindeutiger Trend, wobei natürlich zu beachten ist, dass dieser durch die Größe der Fallzahl bedingt sein könnte und somit mit Vorsicht interpretiert werden sollte. Eine mögliche Ursache könnte im langsameren Wachstum des Primärtumors begründet liegen, wodurch es erst zu einer Detektion des Tumors kommt, wenn er bereits Metastasen gebildet hat, beziehungsweise es primär zu einer Detektion der Metastasen kommt. Übereinstimmend zu dieser Theorie zeigen anaplastische Tumore zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein aggressives lokales Wachstum, weisen aber verglichen mit dem klassischen PDAC seltener Metastasen auf (Abiatari, Esposito et al. 2010, Clark, Arun et al. 2014). Alternativ kann auch die Tumormikroumgebung den Prozess der Metastasierung beeinflussen. Eine nährstoffarme Mikroumgebung könnte Tumorzellen einen Anreiz zur Metastasierung geben (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). Wie oben bereits beschrieben konnten wir zeigen, dass abnehmende Nährstoff-beziehungsweise Wachstumsfaktor-Konzentrationen die Zellproliferation verlangsamen und gleichzeitig die Invasivität von Tumorzellen signifikant erhöhen (**Abbildung 12**).

Es gibt einige Therapieansätze, die an einer Hemmung der Neoangiogenese des PDAC angreifen. Man hofft, dass durch die Normalisierung der Gewebepfusion

durch Reduktion der unreifen hyperpermeablen Gefäße der Effekt von Chemotherapeutika an den Tumorzellen verbessert werden kann (Gkretsi, Zacharia et al. 2017). Ein Beispiel hierfür ist Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper, der VEGF-A blockiert. VA-lip-siRNA<sub>gp46</sub> (an Vitamin A-Liposomen gebundene siRNA gegen das Kollagen-spezifische Chaperon gp46) wiederum soll beispielsweise durch Induktion eines Defektes der Kollagensynthese und Induktion von Apoptose aktivierter Sternzellen die Pankreasfibrose reduzieren und die Neoangiogenese hemmen (Ishiwatari, Sato et al. 2013). Durch ein Retinol-bindendes Protein wird das Molekül selektiv von pankreatischen, jedoch auch von hepatischen Sternzellen aufgenommen (Ishiwatari, Sato et al. 2013).

Beim PDAC ist die Mikrogefäß-Dichte im Vergleich zum normalen Pankreas auf 20% reduziert (Duner, Lopatko Lindman et al. 2010, Erkan, Hausmann et al. 2012). Unabhängig von der angiogenen Funktion der PSCs kommt es durch die kontinuierliche Ablagerung von ECM-Proteinen durch aktivierte PSCs um das feine Kapillar-Netzwerk im periazinären Raum schon physikalisch durch eine Verminderung der Blutzirkulation und des Sauerstoffaustauschs zu einer zunehmenden Gewebshypoxie (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2009, Erkan, Reiser-Erkan et al. 2012). Als Antwort auf die Hypoxie erhöhen sowohl PSCs als auch PCCs die Produktion von Hypoxie-induziertem Faktor (HIF) 1 $\alpha$  (Couvelard, O'Toole et al. 2005, Reiser-Erkan, Erkan et al. 2008), welcher wiederum unter anderem durch Stimulation der Chemokine 2 (CCL2)- Sekretion die Entzündungsreaktion und Fibrose des PDAC fördert (Li, Li et al. 2016). Da das Vorliegen von Hypoxie einen Stimulus für PSCs darstellt, breitet sich so die Reaktion weiter auf das umliegende Gewebe aus, wodurch sich ein Halo von Veränderungen ähnlich denen der chronischen Pankreatitis um den Tumor ausbildet (Erkan, Hausmann et al. 2012). PSCs können proangiogene Substanzen wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor

---

(FGF) und Periostin produzieren; sie haben eine höhere angiogene Potenz als PCCs (Erkan, Hausmann et al. 2012). Insgesamt weisen PSCs und PCCs aber durch reziproke Interaktionen eine prädominant antiangiogene Wirkung auf (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2009, Erkan, Hausmann et al. 2012). Im Gegensatz hierzu zeigten Untersuchungen an Mausmodellen, dass Tumore, bei denen PCCs und PSCs zusammen in die Tiere injiziert wurden, eine höhere Mikrogefäß-Dichte aufweisen als bei Injektion von PCCs alleine (Bachem, Schunemann et al. 2005, Hwang, Moore et al. 2008). Diese konsistenten Ergebnisse an Mäusen spiegeln die klinischen Verhältnisse beim Menschen nicht wider, was erneut zeigt, dass die verwendeten Mausmodelle nur eingeschränkt auf die Situation beim Menschen übertragbar sind (Erkan, Hausmann et al. 2012).

In humanem PDAC kann den Sternzellen bislang letztlich keine eindeutige proangiogene oder antiangiogene Rolle zugeordnet werden (Erkan, Adler et al. 2012). Eine Theorie ist, dass PSCs in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation und vom Krankheitsstadium einen unterschiedlichen Einfluss auf die Angiogenese haben (Erkan, Adler et al. 2012, Xue, Jia et al. 2018). So könnten PSCs in früheren Stadien im Bereich der Tumorfront eher für eine proangiogene Mikroumgebung sorgen; in fortgeschrittenen Stadien sowie in dichten fibrotischen Arealen könnten sie hingegen eine antiangiogene Mikroumgebung unterstützen (Erkan, Adler et al. 2012).

Es ist wahrscheinlich, dass die in den meisten Tumoren bereits fibrotische, hypovaskularisierte und somit hypoxische Mikroumgebung verantwortlich für den Misserfolg antiangiogener Therapieansätze beim PDAC im klinischen Setting ist (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2009, Erkan, Hausmann et al. 2012). So zeigte sich beispielsweise in einer doppelblinden randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase III-Studie bei der Anwendung von Gemcitabin plus Bevacizumab bei 602 Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom kein Vorteil gegenüber Gemcitabin plus Placebo

---

(Kindler, Niedzwiecki et al. 2010). Insgesamt erlangt kaum einer der vielversprechenden antiangiogenen Therapieansätze die Marktreife. Somit stellt sich die Frage, ob eine Hemmung der Neoangiogenese überhaupt zielführend und nicht in manchen Fällen sogar kontraproduktiv ist. Sicherlich ist der Einsatz antiangiogener Therapeutika nicht unselektiv bei allen Patienten und in jeder Situation sinnvoll. Vielmehr müssen die Einflüsse der Tumormikroumgebung und der Tumor-Stroma-Interaktion weiter untersucht werden. Hierfür ist eine genaue Kenntnis der Beschaffenheit des Stromas essentiell und es muss geklärt werden, inwieweit sich Ergebnisse an Mausmodellen auf den Menschen übertragen lassen.

---

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Antifibrotische Therapieansätze spielen derzeit eine große Rolle bei dem Versuch, die nach wie vor meist infauste Prognose des Pankreaskarzinoms zu verbessern. Sie sollen durch eine Verringerung der Desmoplasie erreichen, dass Therapeutika besser zu den Tumorzellen gelangen und dass keine Selektion von aggressiven therapieresistenten Tumorzellklonen stattfindet; der Circulus vitiosus zwischen Tumorzellen und tumorsupportiver Mikroumgebung soll unterbrochen werden. Bei in vitro- Untersuchungen und an Mausmodellen zeigten sich vielversprechende Ergebnisse solcher Therapeutika, die in klinischen Studien allerdings nicht bestätigt werden konnten (Bahrami, Khazaei et al. 2017). Unsere Studie beleuchtet mögliche Ursachen für diese Diskrepanz. So konnten wir in humanem Gewebe sowie in primären humanen pankreatischen Sternzellen zeigen, dass die  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs nicht mit ihrer Proliferationsrate übereinstimmt, sondern dass vielmehr eine inverse Korrelation besteht. Sie korreliert auch weder beim Menschen noch in GEMMs mit der Kollagenablagerung. Die  $\alpha$ SMA-Expression, der am häufigsten verwendete Marker für die myofibroblastische Transdifferenzierung von pankreatischen Sternzellen, kann also nicht mit Sternzell-„Aktivität“ gleichgesetzt werden und ist nicht dazu geeignet, die fibrogenen Eigenschaften der PSCs zu erfassen.

Unsere Daten zeigen weiterhin, dass die Stromabeschaffenheit bei den Patienten sehr unterschiedlich ausgeprägt ist und dass einzelne Stromakomponenten übereinstimmend mit aktuellen Studien einen protektiven Effekt haben könnten. Der ESPI wurde dabei als neuer unabhängiger prognostischer Faktor für das humane PDAC definiert. Patienten mit einem ESPI  $\leq 2$  weisen ein signifikant besseres Überleben auf. Bei ihren Tumoren kann die Proliferation der PSCs mit der der PCCs mithalten; sie zeigen eine hohe PSC-Proliferationsrate bei geringer  $\alpha$ SMA-Expression

---

und Kollagenablagerung. Ein solches dynamisches Stroma, das bei etwa 30% der Patienten gefunden wurde, scheint sich also protektiv auszuwirken und zwar in einem solchen Ausmaß, dass ansonsten vergleichbare Patienten ein dreifach längeres Überleben (40 Monate vs. 13 Monate) erreichen. Die Rolle insbesondere der PSCs und der Periostin-Expression, sowie die Rolle des Tumorstromas insgesamt lässt sich nicht als einheitlich Tumor-supportiv oder als protektiv werten; unsere Daten weisen darauf hin, dass diese Parameter in Abhängigkeit von der Gesamtzusammensetzung des Stromas einen unterschiedlichen, sogar gegensätzlichen Einfluss auf die Tumorprogression haben können.

Unsere vergleichende Analyse des Tumorstromas beim Menschen und bei genetisch modifizierten Mausmodellen zeigt, dass signifikante Unterschiede der Tumormikroumgebung zwischen Menschen und Mausmodellen, die auf einer Aktivierung des K-ras-Onkogens basieren, bestehen. So weist humanes Gewebe eine deutlich höhere Tumor- sowie auch Sternzellproliferation auf als murines Gewebe. Trotz einer signifikant höheren  $\alpha$ SMA-Expression in humanen Tumoren zeigen murine Tumore eine höhere Kollagenablagerung in ihrem Stroma. Die Periostin-Expression ist beim Menschen deutlich höher als in murinem Gewebe und unterscheidet sich auch stark zwischen den verschiedenen Mausmodellen. Dies zeigt, dass die Modelle in Bezug auf das Tumorstroma beim PDAC nur eingeschränkt mit den Verhältnissen im Menschen vergleichbar sind. Die untersuchten GEMMs unterscheiden sich auch untereinander stark, was bedeutet, dass ein Modell für eine Studie sorgfältig je nach Fragestellung ausgewählt und die Resultate entsprechend in Bezug auf die Eigenschaften des Modells interpretiert werden sollten. Neue innovative Modelle könnten die Verhältnisse beim Menschen besser abbilden.

Im Hinblick auf mögliche neue Therapieoptionen des PDAC müssen die Tumor-Stroma-Interaktionen dringend eingehender untersucht werden. So könnten

---

beispielsweise die geringen Ansprechraten auf Gemcitabin oder auf neoadjuvante Therapien wie die Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Radiatio in der Beschaffenheit des Tumorstromas der Patienten begründet liegen. Mit einem besseren Verstehen der Funktionen des Tumorstromas könnte die Therapie auf den jeweiligen Patienten zugeschnitten werden. So scheint eine nichtselektive antifibrotische Therapie für Patienten mit  $ESPI \leq 2$ , die das längste Überleben aufweisen, kontraproduktiv zu sein, könnte bei Patienten mit hohem ESPI aber durchaus einen positiven Effekt haben. Dabei sollte das gesamte Stroma mit seinen verschiedenen Komponenten und deren Interaktionen, einschließlich den Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, den Fibroblasten, der vaskulären Komponente und den Immunzellen, betrachtet werden. Auch im Hinblick auf das Krankheitsstadium kann die Tumormikroumgebung jeweils unterschiedlichen Einfluss haben. An dem späten Interventionszeitpunkt, an dem sich die meisten Patienten befinden, da das PDAC nicht früher entdeckt wird, könnten sich antifibrotische Theapeutika ebenfalls nachteilig auswirken. Das dichte Stroma scheint hier als Barriere gegen Tumorwachstum und –metastasierung zu fungieren; die Anpassung des Tumors an die desmoplastische Mikroumgebung mit Selektionierung aggressiverer Tumorzellklone hat bereits stattgefunden.

Zukünftige Ziele sind die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden, um die Stromaeigenschaften schon in frühen Krankheitsstadien oder sogar schon in Krebsvorstufen zu analysieren. Dadurch könnten Interventionen an der Tumor-Stroma-Einheit früher stattfinden und möglicherweise könnte sogar eine Früherkennung des PDAC erzielt werden. Durch eine weitere genauere Analyse könnten neue Schlüsselsignalwege und -moleküle gefunden werden, die eine Entkoppelung von als Tumor-supportiv identifizierten Krebszell-Sternzell-Interaktionen möglich machen könnten. Neue Technologien wie Genomic Tumor-Profilng könnten

---

weitergehende Informationen liefern, um Patientenkollektive zu identifizieren, die von einer bestimmten Therapiestrategie profitieren und somit eine individuell angepasste zielgerichtete Therapie für die Patienten ermöglichen (Barati Bagherabad, Afzaljavan et al. 2017, Chiaravalli, Reni et al. 2017).

Unsere Studie weist mehrere Limitationen auf. So ist beispielsweise die Quantifizierung von Ki67 im Stroma sehr schwierig und könnte durch die Missinterpretation von PCC als PSC Fehler aufweisen. Bei den verschiedenen Mausmodellen wurde das Gewebe von jeweils ca. 20 Tieren untersucht; auch diese moderaten Fallzahlen könnten zu einem Bias führen.

---

## Literaturverzeichnis

- Abiatari, I., I. Esposito, T. D. Oliveira, K. Felix, H. Xin, R. Penzel, T. Giese, H. Friess and J. Kleeff (2010). "Moesin-dependent cytoskeleton remodelling is associated with an anaplastic phenotype of pancreatic cancer." Journal of cellular and molecular medicine **14**(5): 1166-1179.
- Amakye, D., Z. Jagani and M. Dorsch (2013). "Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer." Nature medicine **19**(11): 1410-1422.
- American Cancer Society (2015). "Cancer Facts & Figures 2015." American Cancer Society, Atlanta.
- Andersen, D. K., M. Korc, G. M. Petersen, G. Eibl, D. Li, M. R. Rickels, S. T. Chari and J. L. Abbruzzese (2017). "Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer." Diabetes **66**(5): 1103-1110.
- Apte, M. V., P. S. Haber, T. L. Applegate, I. D. Norton, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola and J. S. Wilson (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut **43**(1): 128-133.
- Apte, M. V., R. C. Pirola and J. S. Wilson (2012). "Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas." Front Physiol **3**: 344.
- Apte, M. V. and J. S. Wilson (2012). "Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells." Journal of gastroenterology and hepatology **27 Suppl 2**: 69-74.
- Apte, M. V., J. S. Wilson, A. Lugea and S. J. Pandol (2013). "A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment." Gastroenterology **144**(6): 1210-1219.
- Ardito, C. M., B. M. Gruner, K. K. Takeuchi, C. Lubeseder-Martellato, N. Teichmann, P. K. Mazur, K. E. Delgiorno, E. S. Carpenter, C. J. Halbrook, J. C. Hall, D. Pal, T. Briel, A. Herner, M. Trajkovic-Arsic, B. Sipos, G. Y. Liou, P. Storz, N. R. Murray, D. W. Threadgill, M. Sibilica, M. K. Washington, C. L. Wilson, R. M. Schmid, E. W. Raines, H. C. Crawford and J. T. Siveke (2012). "EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis." Cancer cell **22**(3): 304-317.
- Arora, P. D. and C. A. McCulloch (1999). "The deletion of transforming growth factor-beta-induced myofibroblasts depends on growth conditions and actin organization." The American journal of pathology **155**(6): 2087-2099.
- Arora, P. D., N. Narani and C. A. McCulloch (1999). "The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts." The American journal of pathology **154**(3): 871-882.
- Artandi, S. E., S. Chang, S. L. Lee, S. Alson, G. J. Gottlieb, L. Chin and R. A. DePinho (2000). "Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice." Nature **406**(6796): 641-645.
- Avan, A., K. Quint, F. Nicolini, N. Funel, A. E. Frampton, M. Maftouh, S. Pelliccioni, G. J. Schuurhuis, G. J. Peters and E. Giovannetti (2013). "Enhancement of the antiproliferative

---

activity of gemcitabine by modulation of c-Met pathway in pancreatic cancer." Curr Pharm Des **19**(5): 940-950.

Bachem, M. G., E. Schneider, H. Gross, H. Weidenbach, R. M. Schmid, A. Menke, M. Siech, H. Beger, A. Grunert and G. Adler (1998). "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." Gastroenterology **115**(2): 421-432.

Bachem, M. G., M. Schunemann, M. Ramadani, M. Siech, H. Beger, A. Buck, S. Zhou, A. Schmid-Kotsas and G. Adler (2005). "Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells." Gastroenterology **128**(4): 907-921.

Bahrami, A., M. Khazaei, F. Bagherieh, M. Ghayour-Mobarhan, M. Maftouh, S. M. Hassanian and A. Avan (2017). "Targeting stroma in pancreatic cancer: Promises and failures of targeted therapies." J Cell Physiol **232**(11): 2931-2937.

Bao, Z., C. Cao, X. Geng, B. Tian, Y. Wu, C. Zhang, Z. Chen, W. Li, H. Shen and S. Ying (2016). "Effectiveness and safety of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy: A systematic review and meta-analysis." Oncotarget **7**(7): 7629-7639.

Barati Bagherabad, M., F. Afzaljavan, S. ShahidSales, S. Mahdi Hassanian and A. Avan (2017). "Targeted Therapies in Pancreatic Cancer: Promises and Failures." J Cell Biochem.

Bardeesy, N., A. J. Aguirre, G. C. Chu, K. H. Cheng, L. V. Lopez, A. F. Hezel, B. Feng, C. Brennan, R. Weissleder, U. Mahmood, D. Hanahan, M. S. Redston, L. Chin and R. A. Depinho (2006). "Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(15): 5947-5952.

Baril, P., R. Gangeswaran, P. C. Mahon, K. Caulee, H. M. Kocher, T. Harada, M. Zhu, H. Kalthoff, T. Crnogorac-Jurcevic and N. R. Lemoine (2007). "Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the beta4 integrin and the PI3k pathway." Oncogene **26**(14): 2082-2094.

Beatty, G. L., D. A. Torigian, E. G. Chiorean, B. Saboury, A. Brothers, A. Alavi, A. B. Troxel, W. Sun, U. R. Teitelbaum, R. H. Vonderheide and P. J. O'Dwyer (2013). "A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **19**(22): 6286-6295.

Ben, Q. W., X. L. Jin, J. Liu, X. Cai, F. Yuan and Y. Z. Yuan (2011). "Periostin, a matrix specific protein, is associated with proliferation and invasion of pancreatic cancer." Oncol Rep **25**(3): 709-716.

Bhowmick, N. A., A. Chytil, D. Plieth, A. E. Gorska, N. Dumont, S. Shappell, M. K. Washington, E. G. Neilson and H. L. Moses (2004). "TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia." Science **303**(5659): 848-851.

Bissell, M. J. and W. C. Hines (2011). "Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression." Nature medicine **17**(3): 320-329.

- Blaine, S. A., K. C. Ray, K. M. Branch, P. S. Robinson, R. H. Whitehead and A. L. Means (2009). "Epidermal growth factor receptor regulates pancreatic fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **297**(3): G434-441.
- Boeck, S., D. P. Ankerst and V. Heinemann (2007). "The role of adjuvant chemotherapy for patients with resected pancreatic cancer: systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis." Oncology **72**(5-6): 314-321.
- Bosetti, C., P. Bertuccio, E. Negri, C. La Vecchia, M. P. Zeegers and P. Boffetta (2012). "Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology." Mol Carcinog **51**(1): 3-13.
- Braganza, J. M., S. H. Lee, R. F. McCloy and M. J. McMahon (2011). "Chronic pancreatitis." Lancet **377**(9772): 1184-1197.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin.
- Burriss, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens and D. D. Von Hoff (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-2413.
- Chari, S. T., C. L. Leibson, K. G. Rabe, L. J. Timmons, J. Ransom, M. de Andrade and G. M. Petersen (2008). "Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer." Gastroenterology **134**(1): 95-101.
- Cheng, N., N. A. Bhowmick, A. Chytil, A. E. Gorksa, K. A. Brown, R. Muraoka, C. L. Arteaga, E. G. Neilson, S. W. Hayward and H. L. Moses (2005). "Loss of TGF-beta type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF-alpha-, MSP- and HGF-mediated signaling networks." Oncogene **24**(32): 5053-5068.
- Chiaravalli, M., M. Reni and E. M. O'Reilly (2017). "Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art 2017 and new therapeutic strategies." Cancer Treat Rev **60**: 32-43.
- Chiorean, E. G., B. P. Schneider, F. M. Akisik, S. M. Perkins, S. Anderson, C. S. Johnson, J. DeWitt, P. Helft, R. Clark, E. L. Johnston, A. J. Spittler, J. Deluca, G. Bu, S. Shahda, P. J. Loehrer, K. Sandrasegaran and H. R. Cardenas (2014). "Phase 1 pharmacogenetic and pharmacodynamic study of sorafenib with concurrent radiation therapy and gemcitabine in locally advanced unresectable pancreatic cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **89**(2): 284-291.
- Chllamma, M. K., N. Cook, N. C. Dhani, K. Giby, A. Dodd, L. Wang, D. W. Hedley, M. J. Moore and J. J. Knox (2016). "FOLFIRINOX for advanced pancreatic cancer: the Princess Margaret Cancer Centre experience." Br J Cancer **115**(6): 649-654.
- Cid-Arregui, A. and V. Juarez (2015). "Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma." World J Gastroenterol **21**(31): 9297-9316.

Ciliberto, D., C. Botta, P. Correale, M. Rossi, M. Caraglia, P. Tassone and P. Tagliaferri (2013). "Role of gemcitabine-based combination therapy in the management of advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomised trials." Eur J Cancer **49**(3): 593-603.

Clark, C. J., J. S. Arun, R. P. Graham, L. Zhang, M. Farnell and K. M. Reid-Lombardo (2014). "Clinical characteristics and overall survival in patients with anaplastic pancreatic cancer." Am Surg **80**(2): 117-123.

Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Groupe Tumeurs Digestives of and P. Intergroup (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." N Engl J Med **364**(19): 1817-1825.

Conway, S. J., K. Izuhara, Y. Kudo, J. Litvin, R. Markwald, G. Ouyang, J. R. Arron, C. T. Holweg and A. Kudo (2014). "The role of periostin in tissue remodeling across health and disease." Cell Mol Life Sci **71**(7): 1279-1288.

Couvelard, A., D. O'Toole, R. Leek, H. Turley, A. Sauvanet, C. Degott, P. Ruzsiewicz, J. Belghiti, A. L. Harris, K. Gatter and F. Pezzella (2005). "Expression of hypoxia-inducible factors is correlated with the presence of a fibrotic focus and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinomas." Histopathology **46**(6): 668-676.

Cubilla, A. L. and P. J. Fitzgerald (1976). "Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer." Cancer Res **36**(7 PT 2): 2690-2698.

Dagleish, A. G., J. Stebbing, D. J. Adamson, S. S. Arif, P. Bidoli, D. Chang, S. Cheeseman, R. Diaz-Beveridge, C. Fernandez-Martos, R. Glynn-Jones, C. Granetto, B. Massuti, K. McAdam, R. McDermott, A. J. Martin, D. Papamichael, R. Pazo-Cid, J. M. Vieitez, A. Zaniboni, K. J. Carroll, S. Wagle, A. Gaya and S. S. Mudan (2016). "Randomised, open-label, phase II study of gemcitabine with and without IMM-101 for advanced pancreatic cancer." Br J Cancer **115**(9): e16.

de Jesus, V. H. F., M. P. G. Camandaroba, M. D. S. Donadio, A. Cabral, T. P. Muniz, L. de Moura Leite and L. F. Sant'Ana (2018). "Retrospective comparison of the efficacy and the toxicity of standard and modified FOLFIRINOX regimens in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma." J Gastrointest Oncol **9**(4): 694-707.

Dergham, S. T., M. C. Dugan, R. Kucway, W. Du, D. S. Kamarauskiene, V. K. Vaitkevicius, J. D. Crissman and F. H. Sarkar (1997). "Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma." Int J Pancreatol **21**(2): 127-143.

Desmouliere, A., C. Chaponnier and G. Gabbiani (2005). "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast." Wound Repair Regen **13**(1): 7-12.

Desmouliere, A. and G. Gabbiani (1992). "The cytoskeleton of arterial smooth muscle cells during human and experimental atheromatosis." Kidney Int Suppl **37**: S87-89.

Dong, M., Q. Dong, H. Zhang, J. Zhou, Y. Tian and Y. Dong (2007). "Expression of Gadd45a and p53 proteins in human pancreatic cancer: potential effects on clinical outcomes." J Surg Oncol **95**(4): 332-336.

---

Dugan, M. C., S. T. Dergham, R. Kucway, K. Singh, L. Biernat, W. Du, V. K. Vaitkevicius, J. D. Crissman and F. H. Sarkar (1997). "HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival." Pancreas **14**(3): 229-236.

Duner, S., J. Lopatko Lindman, D. Ansari, C. Gundewar and R. Andersson (2010). "Pancreatic cancer: the role of pancreatic stellate cells in tumor progression." Pancreatology **10**(6): 673-681.

Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." The New England journal of medicine **315**(26): 1650-1659.

Erkan, M. (2013). "The role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer." Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology **13**(2): 106-109.

Erkan, M. (2013). "Understanding the stroma of pancreatic cancer: co-evolution of the microenvironment with epithelial carcinogenesis." The Journal of pathology **231**(1): 4-7.

Erkan, M., G. Adler, M. V. Apte, M. G. Bachem, M. Buchholz, S. Detlefsen, I. Esposito, H. Friess, T. M. Gress, H. J. Habisch, R. F. Hwang, R. Jaster, J. Kleeff, G. Kloppel, C. Kordes, C. D. Logsdon, A. Masamune, C. W. Michalski, J. Oh, P. A. Phillips, M. Pinzani, C. Reiser-Erkan, H. Tsukamoto and J. Wilson (2012). "StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research." Gut **61**(2): 172-178.

Erkan, M., S. Hausmann, C. W. Michalski, A. A. Fingerle, M. Dobritz, J. Kleeff and H. Friess (2012). "The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications." Nature reviews. Gastroenterology & hepatology.

Erkan, M., J. Kleeff, I. Esposito, T. Giese, K. Ketterer, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2005). "Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis." Oncogene **24**(27): 4421-4432.

Erkan, M., J. Kleeff, A. Gorbachevski, C. Reiser, T. Mitkus, I. Esposito, T. Giese, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2007). "Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity." Gastroenterology **132**(4): 1447-1464.

Erkan, M., M. Kurtoglu and J. Kleeff (2016). "The role of hypoxia in pancreatic cancer: a potential therapeutic target?" Expert Rev Gastroenterol Hepatol **10**(3): 301-316.

Erkan, M., C. W. Michalski, S. Rieder, C. Reiser-Erkan, I. Abiatari, A. Kolb, N. A. Giese, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2008). "The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma." Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association **6**(10): 1155-1161.

Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski, S. Deucker, D. Sauliunaite, S. Streit, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2009). "Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma." Neoplasia **11**(5): 497-508.

Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski, B. Kong, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2012). "The Impact of the Activated Stroma on Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Biology and Therapy Resistance." Current molecular medicine.

Erkan, M., N. Weis, Z. Pan, C. Schwager, T. Samkharadze, X. Jiang, U. Wirkner, N. A. Giese, W. Ansorge, J. Debus, P. E. Huber, H. Friess, A. Abdollahi and J. Kleeff (2010). "Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells." Molecular cancer **9**: 88.

Ernsting, M. J., B. Hoang, I. Lohse, E. Undzys, P. Cao, T. Do, B. Gill, M. Pintilie, D. Hedley and S. D. Li (2015). "Targeting of metastasis-promoting tumor-associated fibroblasts and modulation of pancreatic tumor-associated stroma with a carboxymethylcellulose-docetaxel nanoparticle." J Control Release **206**: 122-130.

Evans, D. B., M. B. Farnell, K. D. Lillemoe, C. Vollmer, Jr., S. M. Strasberg and R. D. Schulick (2009). "Surgical treatment of resectable and borderline resectable pancreas cancer: expert consensus statement." Ann Surg Oncol **16**(7): 1736-1744.

Everhart, J. and D. Wright (1995). "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis." JAMA **273**(20): 1605-1609.

Farrow, B., D. Rowley, T. Dang and D. H. Berger (2009). "Characterization of tumor-derived pancreatic stellate cells." J Surg Res **157**(1): 96-102.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.

Ferlay, J., C. Partensky and F. Bray (2016). "More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017." Acta Oncol **55**(9-10): 1158-1160.

Frese, K. K., A. Neesse, N. Cook, T. E. Bapiro, M. P. Lolkema, D. I. Jodrell and D. A. Tuveson (2012). "nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer." Cancer Discov **2**(3): 260-269.

Fuchs, C. S., G. A. Colditz, M. J. Stampfer, E. L. Giovannucci, D. J. Hunter, E. B. Rimm, W. C. Willett and F. E. Speizer (1996). "A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer." Arch Intern Med **156**(19): 2255-2260.

Fusai, G., N. Warnaar, C. A. Sabin, S. Archibong and B. R. Davidson (2008). "Outcome of R1 resection in patients undergoing pancreatoduodenectomy for pancreatic cancer." Eur J Surg Oncol **34**(12): 1309-1315.

Gabbiani, G. (1992). "The biology of the myofibroblast." Kidney international **41**(3): 530-532.

Gharibi, A., Y. Adamian and J. A. Kelber (2016). "Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer." Acta Histochem.

Giuliani, J., P. Piacentini and A. Bonetti (2015). "Management of advanced pancreatic cancer in daily clinical practice." Tumori **0**(0): 0.

- Gkretsi, V., L. C. Zacharia and T. Stylianopoulos (2017). "Targeting Inflammation to Improve Tumor Drug Delivery." Trends Cancer **3**(9): 621-630.
- Gong, J., R. Tuli, A. Shinde and A. E. Hendifar (2016). "Meta-analyses of treatment standards for pancreatic cancer." Mol Clin Oncol **4**(3): 315-325.
- Gopinathan, A., J. P. Morton, D. I. Jodrell and O. J. Sansom (2015). "GEMMs as preclinical models for testing pancreatic cancer therapies." Dis Model Mech **8**(10): 1185-1200.
- Gourgou-Bourgade, S., C. Bascoul-Mollevi, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, V. Boige, J. Berille and T. Conroy (2013). "Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial." J Clin Oncol **31**(1): 23-29.
- Greer, J. B., D. C. Whitcomb and R. E. Brand (2007). "Genetic predisposition to pancreatic cancer: a brief review." Am J Gastroenterol **102**(11): 2564-2569.
- Groen, E. J., A. Roos, F. L. Muntinghe, R. H. Enting, J. de Vries, J. H. Kleibeuker, M. J. Witjes, T. P. Links and A. P. van Beek (2008). "Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis." Ann Surg Oncol **15**(9): 2439-2450.
- Guerra, C. and M. Barbacid (2013). "Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma." Mol Oncol **7**(2): 232-247.
- Han, X., Y. Li, Y. Xu, X. Zhao, Y. Zhang, X. Yang, Y. Wang, R. Zhao, G. J. Anderson, Y. Zhao and G. Nie (2018). "Reversal of pancreatic desmoplasia by re-educating stellate cells with a tumour microenvironment-activated nanosystem." Nat Commun **9**(1): 3390.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." Cancer Cell **21**(3): 309-322.
- Hartwig, W., T. Hackert, U. Hinz, A. Gluth, F. Bergmann, O. Strobel, M. W. Buchler and J. Werner (2011). "Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome." Ann Surg **254**(2): 311-319.
- Herman, J. M., M. J. Swartz, C. C. Hsu, J. Winter, T. M. Pawlik, E. Sugar, R. Robinson, D. A. Laheru, E. Jaffee, R. H. Hruban, K. A. Campbell, C. L. Wolfgang, F. Asrari, R. Donehower, M. Hidalgo, L. A. Diaz, Jr., C. Yeo, J. L. Cameron, R. D. Schulick and R. Abrams (2008). "Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital." J Clin Oncol **26**(21): 3503-3510.
- Hidalgo, M. (2010). "Pancreatic cancer." N Engl J Med **362**(17): 1605-1617.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy and D. A. Tuveson (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." Cancer cell **4**(6): 437-450.

Hiraoka, N., Y. Ino, S. Sekine, H. Tsuda, K. Shimada, T. Kosuge, J. Zavada, M. Yoshida, K. Yamada, T. Koyama and Y. Kanai (2010). "Tumour necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation." Br J Cancer **103**(7): 1057-1065.

Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges and G. J. Offerhaus (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." Am J Surg Pathol **25**(5): 579-586.

Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons and S. E. Kern (2000). "Progression model for pancreatic cancer." Clin Cancer Res **6**(8): 2969-2972.

Hruban, R. H., K. Takaori, D. S. Klimstra, N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A. V. Biankin, S. A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G. J. Offerhaus, M. Shimizu and S. Yonezawa (2004). "An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms." Am J Surg Pathol **28**(8): 977-987.

Hruban, R. H., A. D. van Mansfeld, G. J. Offerhaus, D. H. van Weering, D. C. Allison, S. N. Goodman, T. W. Kensler, K. K. Bose, J. L. Cameron and J. L. Bos (1993). "K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization." Am J Pathol **143**(2): 545-554.

Hu, Y. X., H. Watanabe, K. Ohtsubo, Y. Yamaguchi, A. Ha, T. Okai and N. Sawabu (1997). "Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma." Clin Cancer Res **3**(9): 1473-1477.

Hua, Z., Y. C. Zhang, X. M. Hu and Z. G. Jia (2003). "Loss of DPC4 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma." World J Gastroenterol **9**(12): 2764-2767.

Hwang, R. F., T. Moore, T. Arumugam, V. Ramachandran, K. D. Amos, A. Rivera, B. Ji, D. B. Evans and C. D. Logsdon (2008). "Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression." Cancer Res **68**(3): 918-926.

Hwang, R. F., T. T. Moore, M. M. Hattersley, M. Scarpitti, B. Yang, E. Devereaux, V. Ramachandran, T. Arumugam, B. Ji, C. D. Logsdon, J. L. Brown and R. Godin (2012). "Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer." Molecular cancer research : MCR **10**(9): 1147-1157.

Iacobuzio-Donahue, C. A., V. E. Velculescu, C. L. Wolfgang and R. H. Hruban (2012). "Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing." Clin Cancer Res **18**(16): 4257-4265.

Ishiwatari, H., Y. Sato, K. Murase, A. Yoneda, R. Fujita, H. Nishita, N. K. Birukawa, T. Hayashi, T. Sato, K. Miyaniishi, R. Takimoto, M. Kobune, S. Ota, Y. Kimura, K. Hirata, J. Kato and Y. Niitsu (2013). "Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes." Gut **62**(9): 1328-1339.

- Jain, R. K. (2013). "Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers." J Clin Oncol **31**(17): 2205-2218.
- Jones, C. and H. P. Ehrlich (2011). "Fibroblast expression of alpha-smooth muscle actin, alpha2beta1 integrin and alphavbeta3 integrin: influence of surface rigidity." Exp Mol Pathol **91**(1): 394-399.
- Kadaba, R., H. Birke, J. Wang, S. Hooper, C. D. Andl, F. Di Maggio, E. Soylu, M. Ghallab, D. Bor, F. E. Froeling, S. Bhattacharya, A. K. Rustgi, E. Sahai, C. Chelala, P. Sasieni and H. M. Kocher (2013). "Imbalance of desmoplastic stromal cell numbers drives aggressive cancer processes." The Journal of pathology **230**(1): 107-117.
- Kanat, O. and H. Ertas (2018). "Shattering the castle walls: Anti-stromal therapy for pancreatic cancer." World J Gastrointest Oncol **10**(8): 202-210.
- Kang, J., S. Demaria and S. Formenti (2016). "Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy." J Immunother Cancer **4**: 51.
- Kang, Y., J. Liu, Y. Zhang, Y. Sun, J. Wang, B. Huang and M. Zhong (2018). "Upregulation of Periostin expression in the pathogenesis of ameloblastoma." Pathol Res Pract.
- Kanno, A., K. Satoh, A. Masamune, M. Hirota, K. Kimura, J. Umino, S. Hamada, A. Satoh, S. Egawa, F. Motoi, M. Unno and T. Shimosegawa (2008). "Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells." Int J Cancer **122**(12): 2707-2718.
- Katz, M. H., J. B. Fleming, P. Bhosale, G. Varadhachary, J. E. Lee, R. Wolff, H. Wang, J. Abbruzzese, P. W. Pisters, J. N. Vauthey, C. Charnsangavej, E. Tamm, C. H. Crane and A. Balachandran (2012). "Response of borderline resectable pancreatic cancer to neoadjuvant therapy is not reflected by radiographic indicators." Cancer **118**(23): 5749-5756.
- Kaufman, B., R. Shapira-Frommer, R. K. Schmutzler, M. W. Audeh, M. Friedlander, J. Balmana, G. Mitchell, G. Fried, S. M. Stemmer, A. Hubert, O. Rosengarten, M. Steiner, N. Loman, K. Bowen, A. Fielding and S. M. Domchek (2015). "Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation." J Clin Oncol **33**(3): 244-250.
- Kern, S., R. Hruban, M. A. Hollingsworth, R. Brand, T. E. Adrian, E. Jaffee and M. A. Tempero (2001). "A white paper: the product of a pancreas cancer think tank." Cancer Res **61**(12): 4923-4932.
- Kessenbrock, K., V. Plaks and Z. Werb (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell **141**(1): 52-67.
- Kim, B., B. Seo, S. Park, C. Lee, J. O. Kim, K. T. Oh, E. S. Lee, H. G. Choi and Y. S. Youn (2017). "Albumin nanoparticles with synergistic antitumor efficacy against metastatic lung cancers." Colloids Surf B Biointerfaces **158**: 157-166.

- Kim, J. H., B. C. Shin, W. S. Park, J. Lee and H. J. Kuh (2017). "Antifibrotic effects of pentoxifylline improve the efficacy of gemcitabine in human pancreatic tumor xenografts." *Cancer Sci* **108**(12): 2470-2477.
- Kim, N., W. Yoo, J. Lee, H. Kim, H. Lee, Y. S. Kim, D. U. Kim and J. Oh (2009). "Formation of vitamin A lipid droplets in pancreatic stellate cells requires albumin." *Gut* **58**(10): 1382-1390.
- Kim, S., J. E. Signorovitch, H. Yang, O. Patterson-Lomba, C. Q. Xiang, B. Ung, M. Parisi and J. L. Marshall (2018). "Comparative Effectiveness of nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine vs FOLFIRINOX in Metastatic Pancreatic Cancer: A Retrospective Nationwide Chart Review in the United States." *Adv Ther*.
- Kindler, H. L., T. Ioka, D. J. Richel, J. Bennouna, R. Letourneau, T. Okusaka, A. Funakoshi, J. Furuse, Y. S. Park, S. Ohkawa, G. M. Springett, H. S. Wasan, P. C. Trask, P. Bycott, A. D. Ricart, S. Kim and E. Van Cutsem (2011). "Axitinib plus gemcitabine versus placebo plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: a double-blind randomised phase 3 study." *Lancet Oncol* **12**(3): 256-262.
- Kindler, H. L., D. Niedzwiecki, D. Hollis, S. Sutherland, D. Schrag, H. Hurwitz, F. Innocenti, M. F. Mulcahy, E. O'Reilly, T. F. Wozniak, J. Picus, P. Bhargava, R. J. Mayer, R. L. Schilsky and R. M. Goldberg (2010). "Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303)." *J Clin Oncol* **28**(22): 3617-3622.
- Kindler, H. L., K. Wroblewski, J. A. Wallace, M. J. Hall, G. Locker, S. Nattam, E. Agamah, W. M. Stadler and E. E. Vokes (2012). "Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium." *Invest New Drugs* **30**(1): 382-386.
- Kleeff, J., P. Beckhove, I. Esposito, S. Herzig, P. E. Huber, J. M. Lohr and H. Friess (2007). "Pancreatic cancer microenvironment." *Int J Cancer* **121**(4): 699-705.
- Kleespies, A., K. W. Jauch and C. J. Bruns (2006). "Tyrosine kinase inhibitors and gemcitabine: new treatment options in pancreatic cancer?" *Drug Resist Updat* **9**(1-2): 1-18.
- Koong, A. C., V. K. Mehta, Q. T. Le, G. A. Fisher, D. J. Terris, J. M. Brown, A. J. Bastidas and M. Vierra (2000). "Pancreatic tumors show high levels of hypoxia." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**(4): 919-922.
- Krempley, B. D. and K. H. Yu (2017). "Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Chin Clin Oncol* **6**(3): 25.
- Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender and S. W. Lowe (2008). "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis." *Cell* **134**(4): 657-667.
- Kuno, A., T. Yamada, K. Masuda, K. Ogawa, M. Sogawa, S. Nakamura, T. Nakazawa, H. Ohara, T. Nomura, T. Joh, T. Shirai and M. Itoh (2003). "Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats." *Gastroenterology* **124**(4): 1010-1019.

- Le, A., N. V. Rajeshkumar, A. Maitra and C. V. Dang (2012). "Conceptual framework for cutting the pancreatic cancer fuel supply." Clin Cancer Res **18**(16): 4285-4290.
- Lewis, B. C., D. S. Klimstra and H. E. Varmus (2003). "The c-myc and PyMT oncogenes induce different tumor types in a somatic mouse model for pancreatic cancer." Genes Dev **17**(24): 3127-3138.
- Li, D. (2012). "Diabetes and pancreatic cancer." Mol Carcinog **51**(1): 64-74.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." Lancet **363**(9414): 1049-1057.
- Li, N., Y. Li, Z. Li, C. Huang, Y. Yang, M. Lang, J. Cao, W. Jiang, Y. Xu, J. Dong and H. Ren (2016). "Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) Recruits Macrophage to Activate Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." Int J Mol Sci **17**(6).
- Li, X. C., X. L. Lu and H. H. Chen (2011). "alpha-Tocopherol treatment ameliorates chronic pancreatitis in an experimental rat model induced by trinitrobenzene sulfonic acid." Pancreatology **11**(1): 5-11.
- Li, Y., M. Bhuiyan, V. K. Vaitkevicius and F. H. Sarkar (1998). "Molecular analysis of the p53 gene in pancreatic adenocarcinoma." Diagn Mol Pathol **7**(1): 4-9.
- Li, Y., J. Hong, J. E. Oh, A. R. Yoon and C. O. Yun (2017). "Potent antitumor effect of tumor microenvironment-targeted oncolytic adenovirus against desmoplastic pancreatic cancer." Int J Cancer.
- Li, Y., D. Kong, A. Ahmad, B. Bao and F. H. Sarkar (2013). "Pancreatic cancer stem cells: emerging target for designing novel therapy." Cancer Lett **338**(1): 94-100.
- Liao, W. C., K. L. Chien, Y. L. Lin, M. S. Wu, J. T. Lin, H. P. Wang and Y. K. Tu (2013). "Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis." Lancet Oncol **14**(11): 1095-1103.
- Liu, Y. and L. Du (2015). "Role of pancreatic stellate cells and periostin in pancreatic cancer progression." Tumour Biol **36**(5): 3171-3177.
- Liu, Y., F. Li, F. Gao, L. Xing, P. Qin, X. Liang, J. Zhang, X. Qiao, L. Lin, Q. Zhao and L. Du (2016). "Periostin promotes the chemotherapy resistance to gemcitabine in pancreatic cancer." Tumour Biol **37**(11): 15283-15291.
- Loeffler, M., J. A. Kruger, A. G. Niethammer and R. A. Reisfeld (2006). "Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake." J Clin Invest **116**(7): 1955-1962.
- Lohr, M., G. Kloppel, P. Maisonneuve, A. B. Lowenfels and J. Luttges (2005). "Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis." Neoplasia **7**(1): 17-23.
- Lowenfels, A. B. and P. Maisonneuve (2002). "Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer." Hematol Oncol Clin North Am **16**(1): 1-16.

- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg and L. Domellof (1993). "Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group." *N Engl J Med* **328**(20): 1433-1437.
- Lu, P., V. M. Weaver and Z. Werb (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression." *J Cell Biol* **196**(4): 395-406.
- Luttges, J., S. Schemm, I. Vogel, J. Hedderich, B. Kremer and G. Kloppel (2000). "The grade of pancreatic ductal carcinoma is an independent prognostic factor and is superior to the immunohistochemical assessment of proliferation." *The Journal of pathology* **191**(2): 154-161.
- Lynch, H. T. and R. M. Fusaro (1991). "Pancreatic cancer and the familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome." *Pancreas* **6**(2): 127-131.
- Maftouh, M., A. Avan, R. Sciarrillo, C. Granchi, L. G. Leon, R. Rani, N. Funel, K. Smid, R. Honeywell, U. Boggi, F. Minutolo, G. J. Peters and E. Giovannetti (2014). "Synergistic interaction of novel lactate dehydrogenase inhibitors with gemcitabine against pancreatic cancer cells in hypoxia." *Br J Cancer* **110**(1): 172-182.
- Malekigorji, M. C., A. D. M.; Hoskins, C. (2014). "The Use of Iron Oxide Nanoparticles for Pancreatic Cancer Therapy." *Journal of Nanomedicine Research* **1**(1-12).
- Malka, D., P. Hammel, F. Maire, P. Rufat, I. Madeira, F. Pessione, P. Levy and P. Ruzsniwski (2002). "Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis." *Gut* **51**(6): 849-852.
- Malvezzi, M., P. Bertuccio, T. Rosso, M. Rota, F. Levi, C. La Vecchia and E. Negri (2015). "European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women?" *Ann Oncol* **26**(4): 779-786.
- Mantoni, T. S., S. Lunardi, O. Al-Assar, A. Masamune and T. B. Brunner (2011). "Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling." *Cancer research* **71**(10): 3453-3458.
- Manzur, A., A. Oluwasanmi, D. Moss, A. Curtis and C. Hoskins (2017). "Nanotechnologies in Pancreatic Cancer Therapy." *Pharmaceutics* **9**(4).
- Masamune, A., M. Satoh, K. Kikuta, N. Suzuki, K. Satoh and T. Shimosegawa (2005). "Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells." *Biochem Pharmacol* **70**(6): 869-878.
- Masamune, A. and T. Shimosegawa (2009). "Signal transduction in pancreatic stellate cells." *J Gastroenterol* **44**(4): 249-260.
- Masamune, A., T. Watanabe, K. Kikuta, K. Satoh and T. Shimosegawa (2008). "NADPH oxidase plays a crucial role in the activation of pancreatic stellate cells." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **294**(1): G99-G108.
- Mazur, P. K., A. Herner, F. Neff and J. T. Siveke (2015). "Current methods in mouse models of pancreatic cancer." *Methods Mol Biol* **1267**: 185-215.

McAllister, F., J. M. Bailey, J. Alsina, C. J. Nirschl, R. Sharma, H. Fan, Y. Rattigan, J. C. Roeser, R. H. Lankapalli, H. Zhang, E. M. Jaffee, C. G. Drake, F. Housseau, A. Maitra, J. K. Kolls, C. L. Sears, D. M. Pardoll and S. D. Leach (2014). "Oncogenic Kras activates a hematopoietic-to-epithelial IL-17 signaling axis in preinvasive pancreatic neoplasia." *Cancer Cell* **25**(5): 621-637.

Mehner, C., E. Miller, D. Khauv, A. Nassar, A. L. Oberg, W. R. Bamlet, L. Zhang, J. Waldmann, E. S. Radisky, H. C. Crawford and D. C. Radisky (2014). "Tumor cell-derived MMP3 orchestrates Rac1b and tissue alterations that promote pancreatic adenocarcinoma." *Mol Cancer Res* **12**(10): 1430-1439.

Mersmann, M., A. Schmidt, J. F. Rippmann, T. Wuest, B. Brocks, W. J. Rettig, P. Garin-Chesa, K. Pfizenmaier and D. Moosmayer (2001). "Human antibody derivatives against the fibroblast activation protein for tumor stroma targeting of carcinomas." *Int J Cancer* **92**(2): 240-248.

Michalski, C. W., A. Gorbachevski, M. Erkan, C. Reiser, S. Deucker, F. Bergmann, T. Giese, M. Weigand, N. A. Giese, H. Friess and J. Kleeff (2007). "Mononuclear cells modulate the activity of pancreatic stellate cells which in turn promote fibrosis and inflammation in chronic pancreatitis." *Journal of translational medicine* **5**: 63.

Michaud, D. S., E. Giovannucci, W. C. Willett, G. A. Colditz, M. J. Stampfer and C. S. Fuchs (2001). "Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer." *JAMA* **286**(8): 921-929.

Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski, W. Parulekar and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." *J Clin Oncol* **25**(15): 1960-1966.

Moore, M. J., J. Hamm, J. Dancey, P. D. Eisenberg, M. Dagenais, A. Fields, K. Hagan, B. Greenberg, B. Colwell, B. Zee, D. Tu, J. Ottaway, R. Humphrey, L. Seymour and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2003). "Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." *J Clin Oncol* **21**(17): 3296-3302.

Morganti, A. G., M. Falconi, R. G. van Stiphout, G. C. Mattiucci, S. Alfieri, F. A. Calvo, J. B. Dubois, G. Fastner, J. M. Herman, B. W. Maidment, 3rd, R. C. Miller, W. F. Regine, M. Reni, N. K. Sharma, E. Ippolito and V. Valentini (2014). "Multi-institutional pooled analysis on adjuvant chemoradiation in pancreatic cancer." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **90**(4): 911-917.

Morra, L., M. Rechsteiner, S. Casagrande, A. von Teichman, P. Schraml, H. Moch and A. Soltermann (2012). "Characterization of periostin isoform pattern in non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **76**(2): 183-190.

Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(11): 839-849.

Nakhai, H., J. T. Siveke, B. Klein, L. Mendoza-Torres, P. K. Mazur, H. Algul, F. Radtke, L. Strobl, U. Zimmer-Strobl and R. M. Schmid (2008). "Conditional ablation of Notch signaling in pancreatic development." *Development* **135**(16): 2757-2765.

Neesse, A., P. Michl, K. K. Frese, C. Feig, N. Cook, M. A. Jacobetz, M. P. Lolkema, M. Buchholz, K. P. Olive, T. M. Gress and D. A. Tuveson (2011). "Stromal biology and therapy in pancreatic cancer." *Gut* **60**(6): 861-868.

Neoptolemos, J. P., D. H. Palmer, P. Ghaneh, E. E. Psarelli, J. W. Valle, C. M. Halloran, O. Faluyi, D. A. O'Reilly, D. Cunningham, J. Wadsley, S. Darby, T. Meyer, R. Gillmore, A. Anthoney, P. Lind, B. Glimelius, S. Falk, J. R. Izbicki, G. W. Middleton, S. Cummins, P. J. Ross, H. Wasan, A. McDonald, T. Crosby, Y. T. Ma, K. Patel, D. Sherriff, R. Soomal, D. Borg, S. Sothi, P. Hammel, T. Hackert, R. Jackson, M. W. Buchler and C. European Study Group for Pancreatic (2017). "Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial." *Lancet* **389**(10073): 1011-1024.

Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, M. W. Buchler and C. European Study Group for Pancreatic (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." *N Engl J Med* **350**(12): 1200-1210.

Oettle, H., P. Neuhaus, A. Hochhaus, J. T. Hartmann, K. Gellert, K. Ridwelski, M. Niedergethmann, C. Zulke, J. Fahlke, M. B. Arning, M. Sinn, A. Hinke and H. Riess (2013). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial." *JAMA* **310**(14): 1473-1481.

Oettle, H., S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W. O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken and H. Riess (2007). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial." *JAMA* **297**(3): 267-277.

Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. Denicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Ruckert, R. Grutzmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths and D. A. Tuveson (2009). "Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer." *Science* **324**(5933): 1457-1461.

Omary, M. B., A. Lugea, A. W. Lowe and S. J. Pandol (2007). "The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases." *The Journal of clinical investigation* **117**(1): 50-59.

Ozdemir, B. C., T. Pentcheva-Hoang, J. L. Carstens, X. Zheng, C. C. Wu, T. R. Simpson, H. Laklai, H. Sugimoto, C. Kahlert, S. V. Novitskiy, A. De Jesus-Acosta, P. Sharma, P. Heidari, U.

- Mahmood, L. Chin, H. L. Moses, V. M. Weaver, A. Maitra, J. P. Allison, V. S. LeBleu and R. Kalluri (2014). "Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival." *Cancer Cell* **25**(6): 719-734.
- Pang, T. C. Y., J. S. Wilson and M. V. Apte (2017). "Pancreatic stellate cells: what's new?" *Curr Opin Gastroenterol* **33**(5): 366-373.
- Pannala, R., J. B. Leirness, W. R. Bamlet, A. Basu, G. M. Petersen and S. T. Chari (2008). "Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus." *Gastroenterology* **134**(4): 981-987.
- Paron, I., S. Berchtold, J. Voros, M. Shamarla, M. Erkan, H. Hofler and I. Esposito (2011). "Tenascin-C enhances pancreatic cancer cell growth and motility and affects cell adhesion through activation of the integrin pathway." *PloS one* **6**(6): e21684.
- Paulson, A. S., H. S. Tran Cao, M. A. Tempero and A. M. Lowy (2013). "Therapeutic advances in pancreatic cancer." *Gastroenterology* **144**(6): 1316-1326.
- Perez-Mancera, P. A., C. Guerra, M. Barbacid and D. A. Tuveson (2012). "What we have learned about pancreatic cancer from mouse models." *Gastroenterology* **142**(5): 1079-1092.
- Petersen, G. M., M. de Andrade, M. Goggins, R. H. Hruban, M. Bondy, J. F. Korczak, S. Gallinger, H. T. Lynch, S. Syngal, K. G. Rabe, D. Seminara and A. P. Klein (2006). "Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(4): 704-710.
- Prasanna, A., M. M. Ahmed, M. Mohiuddin and C. N. Coleman (2014). "Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypo-fractionated radiation therapy." *J Thorac Dis* **6**(4): 287-302.
- Provenzano, P. P., C. Cuevas, A. E. Chang, V. K. Goel, D. D. Von Hoff and S. R. Hingorani (2012). "Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer Cell* **21**(3): 418-429.
- Rahib, L., B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman and L. M. Matrisian (2014). "Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States." *Cancer Res* **74**(11): 2913-2921.
- Rebours, V., M. Albuquerque, A. Sauvanet, P. Ruszniewski, P. Levy, V. Paradis, P. Bedossa and A. Couvelard (2013). "Hypoxia pathways and cellular stress activate pancreatic stellate cells: development of an organotypic culture model of thick slices of normal human pancreas." *PloS one* **8**(9): e76229.
- Reiser-Erkan, C., M. Erkan, Z. Pan, S. Bekasi, N. A. Giese, S. Streit, C. W. Michalski, H. Friess and J. Kleeff (2008). "Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer Biol Ther* **7**(9): 1352-1359.
- Ren, F., Y. C. Xu, H. X. Wang, L. Tang and Y. Ma (2012). "Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, for resectable advanced pancreatic adenocarcinoma: continue or stop?" *Pancreatol* **12**(2): 162-169.

Rhim, A. D., P. E. Oberstein, D. H. Thomas, E. T. Mirek, C. F. Palermo, S. A. Sastra, E. N. Dekleva, T. Saunders, C. P. Becerra, I. W. Tattersall, C. B. Westphalen, J. Kitajewski, M. G. Fernandez-Barrena, M. E. Fernandez-Zapico, C. Iacobuzio-Donahue, K. P. Olive and B. Z. Stanger (2014). "Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." Cancer cell.

Rickmann, M., E. C. Vaquero, J. R. Malagelada and X. Molero (2007). "Tocotrienols induce apoptosis and autophagy in rat pancreatic stellate cells through the mitochondrial death pathway." Gastroenterology **132**(7): 2518-2532.

Robert-Koch Institut (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin.

Robert Eferl and Emilio Casanova (eds.) (2015). "Mouse Models of Cancer: Methods and Protocols." Methods in Molecular Biology, vol. 1267.

Rougier, P., H. Riess, R. Manges, P. Karasek, Y. Humblet, C. Barone, A. Santoro, S. Assadourian, L. Hatteville and P. A. Philip (2013). "Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." Eur J Cancer **49**(12): 2633-2642.

Rucki, A. A. and L. Zheng (2014). "Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies." World J Gastroenterol **20**(9): 2237-2246.

Ryan, D. P., T. S. Hong and N. Bardeesy (2014). "Pancreatic adenocarcinoma." N Engl J Med **371**(22): 2140-2141.

Safran, H., M. Steinhoff, S. Mangray, R. Rathore, T. C. King, L. Chai, K. Berzein, T. Moore, D. Iannitti, P. Reiss, T. Pasquariello, P. Akerman, D. Quirk, R. Mass, L. Goldstein and U. Tantravahi (2001). "Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma." Am J Clin Oncol **24**(5): 496-499.

Sakurai, T., M. Kudo, N. Fukuta, T. Nakatani, M. Kimura, A. M. Park and H. Munakata (2011). "Involvement of angiotensin II and reactive oxygen species in pancreatic fibrosis." Pancreatology **11 Suppl 2**: 7-13.

Salem, A. I., M. Alfi, E. Winslow, C. S. Cho and S. M. Weber (2015). "Has survival following pancreaticoduodenectomy for pancreas adenocarcinoma improved over time?" J Surg Oncol **112**(6): 643-649.

Samkharadze, T., M. Erkan, C. Reiser-Erkan, I. E. Demir, B. Kong, G. O. Ceyhan, C. W. Michalski, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2011). "Pigment epithelium-derived factor associates with neuropathy and fibrosis in pancreatic cancer." The American journal of gastroenterology **106**(5): 968-980.

Sasaki, H., Y. Sato, S. Kondo, I. Fukai, M. Kiriya, Y. Yamakawa and Y. Fuji (2002). "Expression of the periostin mRNA level in neuroblastoma." J Pediatr Surg **37**(9): 1293-1297.

Saung, M. T. and L. Zheng (2017). "Current Standards of Chemotherapy for Pancreatic Cancer." Clin Ther.

Schneider, R., C. Spath, U. Nitsche, M. Erkan and J. Kleeff (2017). "Contemporary strategies to improve the outcome in locally advanced pancreatic cancer." *Minerva Chir* **72**(5): 424-431.

Schultheis, B., D. Reuter, M. P. Ebert, J. Siveke, A. Kerkhoff, W. E. Berdel, R. Hofheinz, D. M. Behringer, W. E. Schmidt, E. Goker, S. De Dosso, M. Kneba, S. Yalcin, F. Overkamp, F. Schlegel, M. Dommach, R. Rohrberg, T. Steinmetz, M. Bulitta and D. Strumberg (2017). "Gemcitabine combined with the monoclonal antibody nimotuzumab is an active first-line regimen in KRAS wildtype patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a multicenter, randomized phase IIb study." *Ann Oncol* **28**(10): 2429-2435.

Seidler, B., A. Schmidt, U. Mayr, H. Nakhai, R. M. Schmid, G. Schneider and D. Saur (2008). "A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10137-10142.

Seufferlein, T., M. Porzner, T. Becker, V. Budach, G. Ceyhan, I. Esposito, R. Fietkau, M. Follmann, H. Friess, P. Galle, M. Geissler, M. Glanemann, T. Gress, V. Heinemann, W. Hohenberger, U. Hopt, J. Izbicki, E. Klar, J. Kleeff, I. Kopp, F. Kullmann, T. Langer, J. Langrehr, M. Lerch, M. Lohr, J. Luttgies, M. Lutz, J. Mayerle, P. Michl, P. Moller, M. Molls, M. Munter, M. Nothacker, H. Oettle, S. Post, A. Reinacher-Schick, C. Rocken, E. Roeb, H. Saeger, R. Schmid, W. Schmiegel, M. Schoenberg, J. Siveke, M. Stuschke, A. Tannapfel, W. Uhl, S. Unverzagt, B. van Oorschot, Y. Vashist, J. Werner, E. Yekebas, A. Guidelines Programme Oncology, V. German Cancer Society e and A. German Cancer (2013). "[S3-guideline exocrine pancreatic cancer]." *Z Gastroenterol* **51**(12): 1395-1440.

Sharma, A., H. Kandlakunta, S. J. S. Nagpal, Z. Feng, W. Hoos, G. M. Petersen and S. T. Chari (2018). "Model to Determine Risk of Pancreatic Cancer in Patients With New-Onset Diabetes." *Gastroenterology* **155**(3): 730-739 e733.

Sharpless, N. E. and R. A. Depinho (2006). "The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development." *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 741-754.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." *CA Cancer J Clin* **65**(1): 5-29.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2018). "Cancer statistics, 2018." *CA Cancer J Clin* **68**(1): 7-30.

Strimpakos, A. S. and M. W. Saif (2013). "Update on phase I studies in advanced pancreatic adenocarcinoma. Hunting in darkness?" *JOP* **14**(4): 354-358.

Sun, C., D. Ansari, R. Andersson and D. Q. Wu (2012). "Does gemcitabine-based combination therapy improve the prognosis of unresectable pancreatic cancer?" *World J Gastroenterol* **18**(35): 4944-4958.

Suzuki, N., A. Masamune, K. Kikuta, T. Watanabe, K. Satoh and T. Shimosegawa (2009). "Ellagic acid inhibits pancreatic fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats." *Dig Dis Sci* **54**(4): 802-810.

Takikita, M., S. Altekruse, C. F. Lynch, M. T. Goodman, B. Y. Hernandez, M. Green, W. Cozen, M. Cockburn, M. Sibug Saber, M. Topor, C. Zeruto, B. Abedi-Ardekani, M. E. Reichman and

S. M. Hewitt (2009). "Associations between selected biomarkers and prognosis in a population-based pancreatic cancer tissue microarray." Cancer Res **69**(7): 2950-2955.

Tempero, M. A., M. P. Malafa, M. Al-Hawary, H. Asbun, A. Bain, S. W. Behrman, A. B. Benson, 3rd, E. Binder, D. B. Cardin, C. Cha, E. G. Chiorean, V. Chung, B. Czito, M. Dillhoff, E. Dotan, C. R. Ferrone, J. Hardacre, W. G. Hawkins, J. Herman, A. H. Ko, S. Komanduri, A. Koong, N. LoConte, A. M. Lowy, C. Moravek, E. K. Nakakura, E. M. O'Reilly, J. Obando, S. Reddy, C. Scaife, S. Thayer, C. D. Weekes, R. A. Wolff, B. M. Wolpin, J. Burns and S. Darlow (2017). "Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." J Natl Compr Canc Netw **15**(8): 1028-1061.

Tersmette, A. C., G. M. Petersen, G. J. Offerhaus, F. C. Falatko, K. A. Brune, M. Goggins, E. Rozenblum, R. E. Wilentz, C. J. Yeo, J. L. Cameron, S. E. Kern and R. H. Hruban (2001). "Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer." Clin Cancer Res **7**(3): 738-744.

Tsang, S. W., C. H. Cheng and P. S. Leung (2004). "The role of the pancreatic renin-angiotensin system in acinar digestive enzyme secretion and in acute pancreatitis." Regul Pept **119**(3): 213-219.

Tsang, S. W., S. P. Ip and P. S. Leung (2004). "Prophylactic and therapeutic treatments with AT 1 and AT 2 receptor antagonists and their effects on changes in the severity of pancreatitis." Int J Biochem Cell Biol **36**(2): 330-339.

Tsang, S. W., H. Zhang, C. Lin, H. Xiao, M. Wong, H. Shang, Z. J. Yang, A. Lu, K. K. Yung and Z. Bian (2013). "Rhein, a natural anthraquinone derivative, attenuates the activation of pancreatic stellate cells and ameliorates pancreatic fibrosis in mice with experimental chronic pancreatitis." PloS one **8**(12): e82201.

Tuveson, D. A., A. T. Shaw, N. A. Willis, D. P. Silver, E. L. Jackson, S. Chang, K. L. Mercer, R. Grochow, H. Hock, D. Crowley, S. R. Hingorani, T. Zaks, C. King, M. A. Jacobetz, L. Wang, R. T. Bronson, S. H. Orkin, R. A. DePinho and T. Jacks (2004). "Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects." Cancer Cell **5**(4): 375-387.

Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala and D. R. Rowley (2001). "Reactive stroma in prostate cancer progression." J Urol **166**(6): 2472-2483.

Ulmasov, B., Z. Xu, L. H. Tetri, T. Inagami and B. A. Neuschwander-Tetri (2009). "Protective role of angiotensin II type 2 receptor signaling in a mouse model of pancreatic fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **296**(2): G284-294.

Vaccaro, V., I. Sperduti, S. Vari, E. Bria, D. Melisi, C. Garufi, C. Nuzzo, A. Scarpa, G. Tortora, F. Cognetti, M. Reni and M. Milella (2015). "Metastatic pancreatic cancer: Is there a light at the end of the tunnel?" World J Gastroenterol **21**(16): 4788-4801.

Van Cutsem, E., H. van de Velde, P. Karasek, H. Oettle, W. L. Vervenne, A. Szawlowski, P. Schoffski, S. Post, C. Verslype, H. Neumann, H. Safran, Y. Humblet, J. Perez Ruixo, Y. Ma and D. Von Hoff (2004). "Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer." J Clin Oncol **22**(8): 1430-1438.

- Verslype, C., E. Van Cutsem, M. Dicato, S. Cascinu, D. Cunningham, E. Diaz-Rubio, B. Glimelius, D. Haller, K. Haustermans, V. Heinemann, P. Hoff, P. G. Johnston, D. Kerr, R. Labianca, C. Louvet, B. Minsky, M. Moore, B. Nordlinger, S. Pedrazzoli, A. Roth, M. Rothenberg, P. Rougier, H. J. Schmoll, J. Tabernero, M. Tempero, C. van de Velde, J. L. Van Laethem and J. Zalcborg (2007). "The management of pancreatic cancer. Current expert opinion and recommendations derived from the 8th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2006." *Ann Oncol* **18 Suppl 7**: vii1-vii10.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias and M. F. Renschler (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." *N Engl J Med* **369**(18): 1691-1703.
- Von Hoff, D. D., R. K. Ramanathan, M. J. Borad, D. A. Laheru, L. S. Smith, T. E. Wood, R. L. Korn, N. Desai, V. Trieu, J. L. Iglesias, H. Zhang, P. Soon-Shiong, T. Shi, N. V. Rajeshkumar, A. Maitra and M. Hidalgo (2011). "Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial." *J Clin Oncol* **29**(34): 4548-4554.
- Vonlaufen, A., S. Joshi, C. Qu, P. A. Phillips, Z. Xu, N. R. Parker, C. S. Toi, R. C. Pirola, J. S. Wilson, D. Goldstein and M. V. Apte (2008). "Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells." *Cancer Res* **68**(7): 2085-2093.
- Voskoglou-Nomikos, T., J. L. Pater and L. Seymour (2003). "Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models." *Clin Cancer Res* **9**(11): 4227-4239.
- Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C. A. Seiler, H. Friess and M. W. Buchler (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." *Br J Surg* **91**(5): 586-594.
- Whatcott, C. J., C. H. Diep, P. Jiang, A. Watanabe, J. LoBello, C. Sima, G. Hostetter, H. M. Shepard, D. D. Von Hoff and H. Han (2015). "Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer." *Clin Cancer Res* **21**(15): 3561-3568.
- Wittekind, C. (2010). "[2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]." *Pathologe* **31**(5): 331-332.
- Xu, C. P., X. J. Xue, N. Liang, D. G. Xu, F. J. Liu, X. S. Yu and J. D. Zhang (2014). "Effect of chemoradiotherapy and neoadjuvant chemoradiotherapy in resectable pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis." *J Cancer Res Clin Oncol* **140**(4): 549-559.
- Xu, D., H. Xu, Y. Ren, C. Liu, X. Wang, H. Zhang and P. Lu (2012). "Cancer stem cell-related gene periostin: a novel prognostic marker for breast cancer." *PLoS One* **7**(10): e46670.
- Xue, R., K. Jia, J. Wang, L. Yang, Y. Wang, L. Gao and J. Hao (2018). "A Rising Star in Pancreatic Diseases: Pancreatic Stellate Cells." *Front Physiol* **9**: 754.
- Yamamoto, T., S. Yagi, H. Kinoshita, Y. Sakamoto, K. Okada, K. Uryuhara, T. Morimoto, S. Kaihara and R. Hosotani (2015). "Long-term survival after resection of pancreatic cancer: a single-center retrospective analysis." *World J Gastroenterol* **21**(1): 262-268.

---

Yeo, D., P. Phillips, G. S. Baldwin, H. He and M. Nikfarjam (2017). "Inhibition of group 1 p21-activated kinases suppresses pancreatic stellate cell activation and increases survival of mice with pancreatic cancer." Int J Cancer **140**(9): 2101-2111.

Yu, Z., W. Zhong, Z. M. Tan, L. Y. Wang and Y. H. Yuan (2015). "Gemcitabine Adjuvant Therapy for Resected Pancreatic Cancer: A Meta-analysis." Am J Clin Oncol **38**(3): 322-325.

---

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Die zehn häufigsten Malignomentitäten bezüglich Inzidenz und Todesfällen, nach Geschlechtern unterteilt, USA, 2015.** Aus: Cancer Statistics, 2015 (Siegel et al. 2015)..... 10
- Abbildung 2 Todesfälle durch maligne Erkrankungen in den USA im Verlauf von 1930 bis 2011.** Aus: Cancer Statistics, 2015 (Siegel et al. 2015)..... 12
- Abbildung 3 Progressionsmodell für die Entstehung des Pankreaskarzinoms.** Progression über eine schrittweise Akkumulation von Genmutationen von gesunden Zellen bis hin zu metastasierten Karzinomzellen. Bei PanIN 3 Läsionen ist die Basalmembran noch erhalten. Aus: Genetic basis of pancreas cancer development and progression: insights from whole-exome and whole-genome sequencing (Iacobuzio-Donahue, Velculescu et al. 2012), basierend auf einer Illustration von Bona Kim. .... 17
- Abbildung 4 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms.** Genetisch modifizierte Mausmodelle und Xenograft Modelle sind derzeit State-of-the-art und scheinen das humane PDAC am besten zu rekapitulieren. Die in grau dargestellten Modelle werden seltener verwendet (Mazur, Herner et al. 2015). Aus: Mouse Models of Cancer: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1267 (Robert Eferl and Emilio Casanova (eds.) 2015)..... 22
- Abbildung 5 Ex vivo Analyse der Interaktionen von pankreatischen Karzinom- und Sternzellen:** Immunhistochemische Analysen von humanem PDAC Gewebe in konsekutiven Schnitten. Es wurden Antikörper gegen Ki67 (A, mit Hämatoxylin-Gegenfärbung) und  $\alpha$ SMA (B), eine Anilinfärbung (C), sowie Antikörper gegen Periostin (D) verwendet..... 45
- Abbildung 6 Quantitative Bildanalyse der  $\alpha$ SMA- und Periostin-Immunhistochemie sowie der Anilinfärbung:** Zur Analyse wurde Adobe Photoshop CS5 12.0 (Adobe Systems) verwendet. Hier sind exemplarisch die wichtigsten Arbeitsschritte der Analyse eines Schnittes mit Anilinfärbung gezeigt (Vorgehen wie oben beschrieben)..... 47
- Abbildung 7 Analyse der Interaktionen von pankreatischen Karzinom- und Sternzellen ex vivo.** Immunhistochemische Analyse von humanem PDAC- Gewebe in konsekutiven Schnitten. Hier gezeigt sind die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Ki67 (A, mit HE-Gegenfärbung), die  $\alpha$ SMA-Immunhistochemie (B) sowie die Anilinfärbung (C). Die Auswertung zeigt den Zusammenhang der Proliferation der beiden Zelltypen mit myofibroblastischer Transformation der PSCs und Kollagenablagerung in den peritumoralen Arealen. .... 54

- 
- Abbildung 8 Korrelation von PSC-Proliferation mit  $\alpha$ SMA-Expression und Kollagenablagerung:** Die lineare Regressionsanalyse der durch semi-quantitative und quantitative Analyse der Immunhistochemie erhobenen Parameter zeigt eine signifikante inverse Korrelation zwischen PSC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression. .... 56
- Abbildung 9 Korrelation von Periostin-Expression mit  $\alpha$ SMA- und Anilin-Positivität sowie mit Sternzellproliferation und Activated Stroma Index (ASI):** Die lineare Regressionsanalyse der Parameter zeigt eine signifikante Korrelation zwischen Periostin- und  $\alpha$ SMA-Expression ( $p < 0.0001$ , A). Auch zwischen Periostin-Expression und ASI besteht ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0.0424$ , D). .... 57
- Abbildung 10 Korrelation von Activated Stroma Index (ASI) und PASI mit Tumor- bzw. Sternzellproliferation.** Es zeigte sich ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen PASI und Sternzellproliferation ( $p = 0.0136$ , C). .... 58
- Abbildung 11 Korrelation von Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression bei primären humanen pankreatischen Sternzellen:** Die Immunfluoreszenz- Analyse mit Antikörpern gegen Ki67 und  $\alpha$ SMA zeigt die inverse Korrelation beider Proteine im frühen, nicht-konfluenten (A), sowie im späten, konfluenten (B) Stadium. Die Analyse des Zeitverlaufs der PSC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression der PSCs ohne Subkultivierung bestätigte bei Untersuchung an mehreren Zeitpunkten die reziproken Veränderungen beider Proteine. Wir möchten hier auf den graduellen Rückgang des Proliferating Cell Nuclear Antigen hinweisen, während die  $\alpha$ SMA-Positivität der Zellen erhalten bleibt (C). Abbildung 3D zeigt die densitometrische Analyse fünf verschiedener PSC-Klone, die aus dem Gewebe verschiedener Patienten gewonnen wurden. Die optischen Dichtewerte unabhängiger Experimente wurden auf Tag 1 normiert, das individuelle Hintergrundrauschen und die entsprechenden Loading Densities korrigiert (Erkan, Kleeff et al. 2007). .... 60
- Abbildung 12 Korrelation von pankreatischer Tumorzellproliferation und –invasion unter Serum-Entzug:** Die Zelllinien Panc1 (A) und SU86.86 (B) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum kultiviert. Die Zellproliferation wurde nach 48 Stunden mit Hilfe des 3-(4,5-dimethyltriazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium Bromidtests (MTT-Test) eruiert. Der Invasionstest wurde bei verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum durchgeführt, welche in den oberen und unteren Kammern des Invasionstest-Sets (8 $\mu$ m) jeweils gleich waren. Zu beachten ist das Mesenchym-artige Erscheinungsbild der Karzinomzellen unter niedrigen Serumkonzentrationen. .... 63
- Abbildung 13 Stratifizierung der Patienten in Subgruppen mit ESPI  $\leq 2$  und ESPI  $> 2$**  Bei  $\alpha$ SMA-Expression, der PCC Ki67-Positivität, PSC Ki67-Positivität und dem Patientenalter

ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen; bei Anilin-Expression und dem Grading der Karzinome zeigten sich positive Trends (A–F: gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung)..... 67

**Abbildung 14 Univariable Analyse von Einflussfaktoren auf das Überleben:** Kaplan-Meier Analyse und Log- Rank Test wurden verwendet, um die Survival- Unterschiede zwischen den Gruppen zu eruieren..... 69

**Abbildung 15 Immunhistochemische Analyse des Gewebes von ck-Mäusen:** Die immunhistochemische Analyse von Ptf1a<sup>+Cre</sup> K-ras<sup>+LSL-G12D</sup> PDAC-Gewebe in konsekutiven Schnitten zeigt die Interrelation der Proliferation von pankreatischen Tumor- und Sternzellen, die myofibroblastische Transformation bei PSCs sowie die Kollagenablagerung in den peritumoralen Arealen. Hier gezeigt immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Ki67 (A) und  $\alpha$ SMA (B) sowie Anilinfärbung (C) in konsekutiven Schnitten..... 72

**Abbildung 16 Immunhistochemische Analyse des Gewebes von ckp-Mäusen:** Immunhistochemische Analyse von murinem PDAC-Gewebe in konsekutiven Schnitten. Gewebe von heterozygoten (A – C) und homozygoten (D – F) K-ras<sup>+LSL-G12D</sup> p53<sup>fl</sup> Ptf1a<sup>+Cre</sup> Mäusen wurde untersucht. Hier gezeigt sind immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Ki67 (A, D) und  $\alpha$ SMA (B, E) sowie die Anilinfärbung (C, F). Die Auswertung zeigt den Zusammenhang der Proliferation von pankreatischen Tumor- und Sternzellen mit myofibroblastischer Transformation der PSCs und Kollagenablagerung in den peritumoralen Arealen. .... 73

**Abbildung 17 Korrelation der PSC-Proliferation mit PCC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression bei GEMMs:** Die lineare Regressionsanalyse der Parameter, die durch semi-quantitative bzw. quantitative Analyse der Immunhistochemie erhoben wurden, zeigt eine signifikante Korrelation zwischen PSC- und PCC-Proliferation. .... 74

**Abbildung 18 Korrelation von Anilin-Positivität mit PSC-Proliferation und  $\alpha$ SMA-Expression:** Die lineare Regressionsanalyse von Parametern, die durch semi-quantitative bzw. quantitative immunhistochemische Analyse erhoben wurden, zeigt eine signifikante inverse Korrelation zwischen  $\alpha$ SMA-Expression und Anilin-Anfärbbarkeit bei Gewebe von ck-Mäusen (Ptf1a<sup>+Cre</sup> K-ras<sup>+LSL-G12D</sup>)..... 75

**Abbildung 19 Korrelation der Periostin-Expression mit  $\alpha$ SMA-Expression und Anilin-Positivität bei den verschiedenen Mausmodellen:** Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen Periostin- und  $\alpha$ SMA-Expression bei ckp<sup>het</sup>- und ckp<sup>KO</sup>-Mäusen ( $p=0.042$  bzw.  $p=0.02$ , B und C). Bei ckp<sup>KO</sup>-Mäusen zeigt sich

---

zudem ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Periostin-Expression und Anilin-Positivität ( $p=0.029$ , F)..... 76

**Abbildung 20 Korrelation von Periostin-Expression sowie von PASI mit PSC-Proliferation bei den verschiedenen Mausmodellen:** Die lineare Regressionsanalyse zeigt einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen PASI und PSC Ki67-Positivität bei  $ckp^{het}$ -Mäusen ( $p=0.0014$ , E)..... 77

**Abbildung 21 Quantitative Analyse von PDAC-Gewebe beim Menschen und genetisch modifizierten Mausmodellen:** PCC Ki67: Proliferationsindex der pankreatischen Tumorzellen, PSC Ki67: Proliferationsindex der pankreatischen Sternzellen, ESPI: Epithelial Stromal Proliferation Index,  $\alpha$ SMA: Alpha-Smooth Muscle Actin, h: human, n.s: nicht signifikant, \*: signifikant..... 81

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: TNM-Staging des Pankreaskarzinoms. Aus TNM-Klassifikation maligner Tumoren (Wittekind 2010).....</b>	<b>15</b>
<b>Tabelle 2: Antikörper- Verdünnungen für die Westernblot-, Immunhistochemie- und Immunfluoreszenz-Analysen (humanes Gewebe). ....</b>	<b>50</b>
<b>Tabelle 3: Verteilung der klinischen Parameter auf die Subgruppen niedrige/ hohe PCC- bzw. PSC-Proliferation und niedriger/ hoher ESPI. ....</b>	<b>61</b>
<b>Tabelle 4: Ergebnisse der univariablen (UVA) und multivariablen (MVA) Analysen. ....</b>	<b>64</b>
<b>Tabelle 5: Univariable Analyse der ESPI-Subgruppen. ....</b>	<b>65</b>
<b>Tabelle 6: Ergebnisse der univariablen (UVA) und multivariablen (MVA) Analysen bei Stratifizierung ESPI <math>\leq 2</math> bzw. <math>&gt; 2</math>. ....</b>	<b>68</b>
<b>Tabelle 7: Ergebnisse der univariablen (UVA) und multivariablen (MVA) Analysen bei GEMMs. ....</b>	<b>79</b>

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Arbeit unterstützt und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Mert Erkan bedanken, der mir die Mitarbeit in seiner Forschungsgruppe an diesem spannenden Thema ermöglichte. Herzlichen Dank für die jahrelange Unterstützung, geduldige Beantwortung meiner Fragen und die auch trotz der zuletzt großen räumlichen Distanz großartige Betreuung!

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Helmut Friess und Prof. Dr. Jörg Kleeff für die konstruktive Unterstützung und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an der Chirurgischen Klinik durchführen zu können.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Christoph Michalski, Dr. Dr. Bo Kong, Prof. Dr. Jens Siveke, Dr. Alexander Herner, Prof. Dr. Irene Esposito, Carsten Jäger, Dr. Simone Hausmann, Dr. Daniela Stangel, Nadine Wagner, Nadja Maeritz, Carmen Marten und Manja Thorwirth bedanken, die an der Arbeit mitgewirkt haben bzw. zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Herzlichen Dank Dr. Tamar Samkharadze für die Einarbeitung im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gilt Viktorija Markovskaja für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, hilfreiche Änderungsvorschläge und die schöne Zusammenarbeit.

Bei allen KollegInnen aus dem Pankreasforschungslabor möchte ich mich für die technische Unterstützung, stetige Hilfestellung, guten Ratschläge und das tolle Arbeitsklima bedanken.

---

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für den Rückhalt, die stetige Motivation und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit bedanken. Insbesondere möchte ich meinen Eltern Rosmarie und Josef für ihre großartige und uneingeschränkte Unterstützung und den Beistand im gesamten Medizinstudium und bis heute danken. Ohne euch wären mir das Medizinstudium und das Promotionsvorhaben nicht möglich gewesen.

Bei meinem Bruder Marius möchte ich mich für die moralische Unterstützung und besonders auch für die technische Hilfe bedanken. Danke, dass du dir dafür immer Zeit genommen hast und dass ich dich auch sonst jederzeit anrufen kann.

Herzlichen Dank Wolfgang für das andauernde Interesse und Verständnis für meine Arbeit und dafür, dass du immer für mich da und Teil meines Lebens bist.

Last but not least ein ganz besonders lieber Dank an meinen Leo, der mich (durch ein schwangerschaftsbedingtes Beschäftigungsverbot) sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Vielen Dank euch allen.