



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar

Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess

# **Die Charakterisierung der Interaktion von Nerven- und Sternzellen im Pankreaskarzinom**

Karl Rüdiger Göß

**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**

**Prüfer der Dissertation:**

- 1. apl. Prof. Dr. Güralp Onur Ceyhan**
- 2. Prof. Dr. Helmut Friess**

**Die Dissertation wurde am 16.05.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.01.2020 angenommen.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Das Pankreaskarzinom</b>	<b>6</b>
1.1	Epidemiologie, Risikofaktoren und Symptome	6
1.2	Diagnose und Therapie	7
1.3	Histopathologie und Tumorgenese	9
<b>2</b>	<b>Das Stroma des Pankreaskarzinoms</b>	<b>10</b>
2.1	Eigenschaften und Entstehung der Stromareaktion	10
2.2	Therapeutische Ansätze	11
<b>3</b>	<b>Die Sternzellen des Pankreas</b>	<b>12</b>
3.1	Ursprung und Eigenschaften	12
3.2	Interaktion mit anderen Zellarten	14
<b>4</b>	<b>Bedeutung der Nervenzellen im Pankreaskarzinom</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>1</b>	<b>Material</b>	<b>20</b>
1.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	20
1.2	Allgemeine Geräte	20
1.3	Allgemeine Reagenzien	20
1.4	Allgemeine Materialien für die Zellkultur	21
1.5	Spezielle Materialien für den Neuroplastizitätsassay	23
1.6	Spezielle Materialien für die Zellisolation	23
1.6.1	Isolation der Sternzellen	23
1.6.2	Isolation der <i>Dorsal Root Ganglia</i> (DRG)	24
1.7	Spezielle Materialien für den Migrationassay	24
1.8	Spezielle Materialien für die Immunfluoreszenz	25
1.9	Software	25
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Isolation und Kultivierung von <i>Dorsal Root Ganglia</i>	25
2.2	Isolation und Kultivierung von pankreatischen Sternzellen aus Ratten mit der Nycodenz <sup>®</sup> -Methode	27
2.3	Zellkultur	29
2.4	Stimulation der Sternzellen mit TGF- $\beta$ und Gewinnung von Zellüberständen	30
2.5	Stimulation der Sternzellen durch Hypoxie und Gewinnung von Zellüberständen	30
2.6	Messung der Proteinkonzentration der Überstände	31
2.7	Phasen-Kontrastmikroskopie	31

2.8	Immunfloreszenz der Sternzellen .....	31
2.9	Neuroplastizitätsassay .....	32
2.10	Migrationassay .....	34
<b>3</b>	<b>Tierhaltung .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>35</b>
<b>III</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>1</b>	<b>Zellbiologische Analyse der Sternzellen .....</b>	<b>37</b>
1.1	Morphologische Analyse der Sternzellen nach primärer Isolation und Stimulation mit TGF- $\beta$ .....	37
1.2	Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz nach Stimulation mit TGF- $\beta$ .....	38
<b>2</b>	<b>Einfluss der Sternzellen auf die Neuroplastizität .....</b>	<b>39</b>
2.1	Analyse der Neuritendichte von <i>Dorsal Root Ganglia</i> unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen .....	39
2.2	Analyse der Gliazelldichte von <i>Dorsal Root Ganglia</i> unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen .....	42
2.3	Analyse der Neuriten- und Gliazelldichte von <i>Dorsal Root Ganglia</i> unter dem Einfluss von hypoxischen Sternzellen .....	43
<b>3</b>	<b>Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit von Sternzellen.....</b>	<b>46</b>
3.1	Einfluss von <i>Dorsal Root Ganglia</i> auf die Migration der Sternzellen.....	46
3.2	Einfluss von <i>Dorsal Root Ganglia</i> auf die Migration der Sternzellen in Abhängigkeit von Pankreaskarzinomzellen.....	49
<b>IV</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>VII</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>VIII</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

AFL	atypische flache Läsionen
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
cpm	cycles per minute
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DRG	dorsal root ganglion
EUS	endoskopische Ultraschall
°C	Grad Celsius
FMI	Forward Migration Index
FGF2	fibroblast growth factor 2
G	Gauge (Einheit)
GFAP	glial fibrillary acidic protein
IL	Interleukin
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
mm	Milimeter
min	Minuten
MCN	muzinöse zystische Neoplasie
MRT	Magnetresonanztomographie
NGF	nerve growth factor
NB	Neurobasal (medium)
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Mililiter
rpm	rounds per minute

PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDGF	platelet-derived growth factor
(r)PSC	(rat) pancreatic stellate cell
qPCR	quantitative (Echtzeit) Polymerasekettenreaktion
TGF- $\beta$	transforming growth factor - $\beta$
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor - $\alpha$

# **I EINLEITUNG**

## **1 Das Pankreaskarzinom**

### **1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Symptome**

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist eine den Tod bringende Krankheit mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 7% (Siegel et al., 2016). Mit weltweit geschätzten 300 000 Neuerkrankungen pro Jahr steht die Erkrankung an vierter Stelle der tumorbedingten Todesfälle. Es zeigte sich im Gegensatz zu anderen bösartigen Tumorerkrankungen ein Anstieg der Sterberate in beiden Geschlechtern von 2009 bis 2014 (Männer: 7,85 auf 8,13; Frauen: 5,33 auf 5,56 /100 000 Einwohner) (Malvezzi et al., 2014). Bereits im Jahr 2030 wird die Erkrankung die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache sein und somit noch mehr in das Interesse der Öffentlichkeit und medizinischen Forschung rücken (Rahib et al., 2014).

Entscheidend für das Langzeitüberleben ist das Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung. So unterscheiden sich die 5-Jahres-Überlebensraten mit 2% im metastasiertem Stadium von 11% in lokal fortgeschrittenem Stadium und 27% bei noch lokal begrenztem Wachstum erheblich. Die Erkrankung bleibt meist lange unbemerkt, da sie zunächst nur mit unspezifischen Beschwerden wie Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit, Veränderung der Darmaktivität und Bauch-, Rücken- oder Schulterschmerzen symptomatisch wird. Erst bei fortschreitendem Wachstum kann es durch Kompression des Gallenganges zu einem schmerzlosen Ikterus kommen, welches meist das erste spezifische Symptom darstellt. Ebenso kann sich als Folge der tumorbedingten Gewebsschädigung ein Diabetes mellitus manifestieren (Kamisawa et al., 2016). Aus diesem Grund sind 53% der Tumore bei Diagnosestellung bereits metastasiert, 28% zeigen einen lokal fortgeschrittenen Befund und nur 9% sind noch auf ein lokales Wachstum begrenzt (Siegel et al., 2016). Als Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom werden Nikotinabusus, übermäßiger Alkoholkonsum, eine chronische Pankreatitis und ein lang bestehender Diabetes mellitus angesehen. Ebenso spielt auch die genetische Komponente eine große Rolle, da bei 10% der Erkrankten ein Pankreaskarzinom in der Familiengeschichte bekannt ist. Keimzellmutationen in folgenden Genen (in Klammern mit entsprechendem Syndrom) sind mit einem erhöhten Auftreten assoziiert: BRCA2, BRCA1 und PALB2 (genetisches Brust- und

Ovarialkarzinom), CDKN2A/p16 (familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom / FAMMM), STK11/LKB1 (Peutz-Jeghers Syndrom), PRSS1 (hereditäre Pankreatitis), MLH1 (Lynch-Syndrom), TP53 (Li-Fraumeni Syndrom) (Rustgi, 2014; Solomon et al., 2012).

## **1.2 Diagnose und Therapie**

Die Diagnose eines Pankreaskarzinomes wird gewöhnlich mit einer kontrastmittelverstärkten Computertomographie (CT) gestellt. Hier lassen sich die wichtigsten umgebenden Strukturen und die Ausbreitung des Tumors gut beurteilen, um die Resektabilität des Tumors zu bestimmen. Ebenso kann eine Metastasierung in Leber und Lunge nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden. Eine noch höhere Sensitivität in der Diagnostik bietet die endoskopische Ultraschalluntersuchung (EUS) (98-100% gegenüber 86% im CT). Für eine histologische Sicherung des Befundes wird eine endosonographisch gestützte Feinnadelbiopsie durchgeführt. Weiterhin findet die Bestimmung des Tumormarkers CA 19-9 (Carbohydrate-Antigen) bei begründetem Verdacht und als Verlaufsparemeter der Erkrankung Anwendung (Kamisawa et al., 2016).

Die einzige kurative Behandlung ist die R0-Resektion des Tumors, sodass allen Patienten mit resektablem Befund eine Operation empfohlen werden sollte. Bei Lokalisation des Tumors im Pankreaskopf wird meist eine pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie durchgeführt. Weiterhin sind - wenn für eine komplette Tumorresektion notwendig - auch totale Pankreatektomien möglich. Bei im Pankreasschwanz lokalisierten Tumoren werden laparoskopische oder offene Pankreaslinksresektionen mit Splenektomie durchgeführt (Huttner et al., 2016). Die Entwicklungen in der Chirurgie und dem peri- und postoperativen Management haben die Definitionen eines „resektablen Befundes“ verändert. So stellen Resektionen mit anschließender Rekonstruktion von Gefäßen, sowie multiviszerales Resektionen keine größeren chirurgischen Schwierigkeiten mehr da (Evans et al., 2009). Es zeigte sich jedoch, dass lediglich eine venöse Resektion der Vena portae oder der Vena mesenterica superior bei Tumorinfiltration einen Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens erbrachte. Eine ausgeprägte multiviszerales Resektion, eine erweiterte Lymphadenektomie oder die Entfernung von befallenen arteriellen Gefäßen verlängerte das Gesamtüberleben nicht, sodass von zu radikalen Resektionen wieder Abstand genommen wurde (Barreto and Windsor, 2016). Somit werden nicht metastasierte Pankreaskarzinome in resektabel, borderline-resektabel und lokal fortgeschrittene Tumore eingeteilt. Als borderline-resektabel

werden Tumore bezeichnet, welche die V. mesenterica superior, die V. portae, die Arterie gastroduodenalis und/oder die Arterie hepatica in nur einem kleinen Abschnitt befallen, jedoch nicht bis an den Tuncus coelicacus reichen und die Arterie mesenterica superior  $<180^\circ$  ummauern (Bockhorn et al., 2014). Borderline und primär resektable Befunde sollten einer operativen Therapie zu geführt werden. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren besteht die Möglichkeit durch eine neoadjuvante (Radio-)chemotherapie doch noch einen resektablen Befund zu erreichen. In wieweit borderline-resektable Tumore oder sogar primär resektable Befunde vor geplanter Resektion von einer neoadjuvanten Chemotherapie profitieren, ist Gegenstand von aktuellen klinischen Studien und noch nicht ausreichend geklärt. Nach einer erfolgreichen RO-Resektion kann das durchschnittliche Gesamtüberleben von 20,2 Monaten mit einer anschließenden Chemotherapie von 6 Zyklen Gemcitabin auf 22,8 Monate verlängert werden (Oettle et al., 2013). Eine aktuelle große Studie (ESPAC-4) mit insgesamt 730 resezierten Patienten konnte einen Überlebensvorteil einer adjuvanten Chemotherapie von Gemcitabin kombiniert mit Capecitabin im Vergleich zur alleinigen Gemcitabin-Therapie (28,8 Monate vs. 25,5 Monate medianes Gesamtüberleben) zeigen (Neoptolemos et al., 2017). Auf Grundlage dieser randomisierten multizentrischen Studie ist zu erwarten, dass die Leitlinien, welche bisher noch eine Gemcitabin-Monotherapie empfehlen, in nächster Zeit hinsichtlich einer kombinierten Chemotherapie verändert werden.

Patienten mit einem metastasierten Pankreaskarzinom haben ohne Therapie eine infauste Prognose mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von wenigen Monaten. Durch eine palliative Chemotherapie mit Gemcitabin kann ein medianes Gesamtüberleben von ungefähr 6 Monaten erreicht werden. 2011 konnte durch die Einführung des FOLFIRINOX Schema (Oxaliplatin, Irinotecan, 5-FU und Leucovorin) das durchschnittlichen Gesamtüberlebens dieser Patienten auf 11 Monate verlängert werden (Conroy et al., 2011). Jedoch zeigt FOLFIRINOX ein deutlich erhöhtes Nebenwirkungsprofil und kann somit nur bei Patienten in relativ gutem Allgemeinzustand verabreicht werden. Einen weiteren Vorteil zeigte die Erweiterung von Gemcitabin mit nab-Paclitaxel (durchschnittliches Überleben 8,5 Monate) mit einer deutlich besseren Verträglichkeit (Von Hoff et al., 2013).

Auf Grund der niedrigen Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung und dem schnellen und aggressiven Wachstum des Tumors stehen aktuell keine Screening- oder Vorsorgeuntersuchungen für das Bauchspeicheldrüsenkarzinom zur



Verfügung. Eine Empfehlung für Screeninguntersuchungen mittels EUS oder einer Magnetresonanztomographie (MRT) wird nur für Personen mit einem hohen Risiko für das Auftreten der Erkrankung ausgesprochen (Vasen et al., 2016). Hierzu zählen Personen mit oben erwähnten bekannten Genmutationen oder einer ausgeprägten familiären Vorbelastung wie zum Beispiel mindestens zwei Erkrankten in der Verwandtschaft ersten Grades (Canto et al., 2013).

### **1.3 Histopathologie und Tumorgenese**

Der mit Abstand häufigste maligne Tumor der Bauchspeicheldrüse ist das duktales Adenokarzinom (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) mit circa 75-80%. In der gesamten Arbeit wird das Wort Pankreaskarzinom synonym für das duktales Adenokarzinom verwendet. Als zweithäufigste bösartige Tumore finden sich neuroendokrine Karzinome (15-20%), welche eine wesentlich bessere Prognose als das PDAC aufweisen. Mit weniger als 5% der bösartigen Neubildungen des Pankreas lassen sich solide pseudopapilläre Tumore, Kolloidkarzinome, Azinuszell-Karzinome, Adenosquamöse-Karzinome und undifferenzierte Karzinome zu einer dritten Gruppe zusammenfassen (Kleeff et al., 2016). Das Pankreaskarzinom entsteht meist aus kleinsten Vorläuferläsionen, sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Diese nicht invasiven Epithelveränderungen finden sich in den klein-kalibrigen Ausführungsgängen des Pankreas und werden nach histopathologischen Veränderungen in low-grade und high-grade PanIN unterschieden (Basturk et al., 2015). Als weitere Vorstufen konnten die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinöse zystische Neoplasie (MCN) identifiziert werden (Hezel et al., 2006). Die IPMN wird als eine nicht invasive, größer als 1cm zystische, muzin-produzierende Neoplasie mit Bezug zum Pankreasgang definiert (Furukawa et al., 2005). Es wird eine Unterscheidung der IPMN des Hauptganges (main-duct IPMN), des Seitenganges (branch-duct IPMN) und einer gemischten Form (mixed-type IPMN) getroffen. In 30-50% der MD und mixed-type IPMN findet sich bereits ein invasives Wachstum (Farrell, 2015), sodass identifizierte Patienten einer kurativen Resektion zugeführt werden sollten. Die muzinös zystische Neoplasie ist eine seltene, vermehrt bei Frauen (>95%) vorkommende zystische Veränderung des Pankreas, welche häufig im Pankreasschwanz (95% der Fälle) lokalisiert ist. Das Risiko der Entartung wird mit unter 20% angegeben. Die Indikation für eine Resektion wird unter Berücksichtigung verschiedener Malignitätskriterien gestellt (Größenzunahme im Verlauf und Vorhandensein von Knötchen sog. Nodules)

(Crippa et al., 2008). Ein weiterer möglicher Entstehungsort eines invasiven PDAC konnte durch Pankreaskarzinommasmodelle gefunden werden und beschreibt einen möglichen Ursprung des Tumors von den Azinuszellen. In einer azinär-duktalem Metaplasie (ADM) entstehen sog. atypische flache Läsionen (AFL), aus welchen ein invasiv wachsendes Karzinom entstehen kann (Esposito et al., 2012).

Die Transformation der Zelle hin zu einem invasiv wachsendem malignen Zelltyp beruht auf einer Akkumulation von verschiedenen genetischen Mutationen. Im Pankreaskarzinom konnten vier Hauptgene (ein Onkogen und drei Tumorsuppressorgene) identifiziert werden. In 90% der Tumore findet sich eine Mutation im Onkogen KRAS. Dies beeinflusst durch die Expression einer GTPase die Herunterregulierung von verschiedenen Wachstumsfaktoren in der Zelle und führt bei einer Mutation zu vermehrtem Zellwachstum. CDKN2A, ein Tumorsuppressorgen, welches einen Regulator des Zellzyklus darstellt, zeigt sich in 90% der Fälle verändert. Weitere häufig mutierte Gene sind das in vielen bösartigen Tumoren veränderte Tumorsuppressorgen TP-53 (ungefähr 75% der PDAC) und SMAD4 (50% der PDAC). SMAD4 ist für die Regulierung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  verantwortlich. Untersuchungen an Vorläuferzellen konnten zeigen, dass eine Mutation von KRAS und CDKN2A zu den frühen Ereignissen in der Tumorgenese zählt, wohingegen eine Veränderung in TP-53 und SMAD vermutlich erst in high-grade Dysplasien und bereits invasiven Tumoren eine Rolle spielt (Hezel et al., 2006; Wood and Hruban, 2012).

## **2 Das Stroma des Pankreaskarzinoms**

### **2.1 Eigenschaften und Entstehung der Stromareaktion**

Das Pankreaskarzinom ist ein besonders stromareicher Tumor, was ihn von vielen anderen Malignomen unterscheidet. Weniger als 20% der Tumormasse werden von malignen Zellen gebildet. Das Gewebe besteht zum größten Teil aus kollagenreicher extrazellulärer Matrix (ECM) und weiteren Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen, endokrinen Zellen und Nervenzellen. Diese sich gegenseitig beeinflussenden Strukturen um und im Bereich der Tumorzellen werden als das „Microenvironment“ des Tumors bezeichnet (Feig et al., 2012). Der Umbau von gesundem Pankreasgewebe mit Zunahme des kollagenreichen Bindegewebes wird Desmoplasie genannt und ist charakteristisch

sowohl für das Karzinom als auch die chronische Pankreatitis (Apte and Wilson, 2012). Die Grundlagenforschung des Pankreaskarzinoms beschränkte sich lange allein auf die Tumorzellen ohne die umgebenden Strukturen zu berücksichtigen. Jedoch ließen sich erfolgversprechende in-vitro Ergebnisse oft durch in-vivo Versuche nicht bestätigen. Ein möglicher Grund hierfür ist die Komplexität des Microenvironments mit seinem Einfluss auf die Tumorbiologie, sodass diesem nun mehr Beachtung geschenkt wird.

1998 konnten erstmals Zellen identifiziert und isoliert werden, welche für die massive Stromareaktion verantwortlich sind: die Sternzellen des Pankreas (Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). Diese im gesunden Pankreasgewebe sehr kleine Zellpopulation wird im Tumor in eine aktive Form überführt und steigert unter anderem ihre Produktion von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin (Feig et al., 2012). Diese daraus entstehende desmoplastische Reaktion wird als ein Grund für das hypoxische Milieu des Pankreaskarzinoms angesehen. Durch die Fibrosierung des Gewebes kommt es zu einer Dichtezunahme mit Erhöhung des interstitiellen Flüssigkeitsdruckes (interstitial fluid pressure). Hierdurch verringert sich die Perfusion des Gewebes, was neben einer Selektionierung der besser angepassten Tumorzellen ein Grund für das relativ schlechte Ansprechen des Tumors auf eine Chemotherapie ist (Provenzano et al., 2012). Viele in-vitro und in-vivo Untersuchungen zeigten einen positiven Einfluss des Stromas auf das Tumorzellwachstum (Hwang et al., 2008), die Invasivität und Proliferationsrate der Tumorzellen (Bachem et al., 2005) und auf die Metastasierung (Xu et al., 2010). Ebenso wird dem Stroma ein protektiver Einfluss auf Tumorzellen hinsichtlich der Wirkung von Strahlentherapie (Mantoni et al., 2011) und Chemotherapie (Olive et al., 2009) zugesprochen, sodass die Stromazellen und insbesondere die Sternzellen zunächst als Tumor unterstützend angesehen wurden.

## **2.2 Therapeutische Ansätze**

Aus diesem Grund erweiterte sich das Ziel möglicher Therapien von den Tumorzellen hin zu den stromaproduzierenden Zellen. Eine erste erfolgversprechende Arbeit im Jahr 2009 konnte durch eine Depletion des Tumorstromas in einem KPC-Pankreaskarzinom-Mausmodell eine erhöhte Perfusion des Tumors und einer Zunahme der Gefäßdichte zeigen. Hierdurch kam es zu einer gesteigerten Aufnahme und Wirksamkeit von verabreichten Chemotherapeutika. Das Tumorstroma wurde durch eine pharmakologische

Inhibition des Sonic Hedgehog (Shh) Signalweges reduziert. Der Signalweg führt über eine Hochregulation von Transkriptionsfaktoren in Stromazellen zu einer verstärkten Desmoplasie im Pankreaskarzinom (Olive et al., 2009). Eine daraufhin veranlasste klinische Phase II Studie, welche eine Therapie mit Gemcitabin + Shh Inhibitor (Saridegib<sup>®</sup>) vs. Gemcitabin + Placebo in metastasierten Pankreaskarzinompatienten verglich, musste nach einer ersten Zwischenanalyse abgebrochen werden, da sich durch die Saridegib<sup>®</sup> - Einnahme ein aggressiveres Fortschreiten der Krankheit zeigte (Infinity-Pharmaceuticals). Im Jahr 2014 erschienen zwei wegweisende Arbeiten, die dem Stroma erstmalig eine supprimierende Wirkung auf den Tumor nachweisen konnten. Durch einen Knockout des Shh-Liganden in einem Pankreaskarzinom-Mausmodell entwickelten die Mäuse aggressivere und undifferenziertere Tumore mit einer erhöhten Proliferation und Vaskularisation (Rhim et al., 2014). Ebenso zeigten Mäuse, welche durch einen transgenetischen Knockout die stromabildenden Myofibroblasten zu Beginn oder im Endstadium eines Pankreaskarzinoms verloren hatten, invasivere und undifferenziertere Tumore mit einem schlechteren Überleben (Ozdemir et al., 2014). Auf Grund dieser Ergebnisse scheint das Stroma den Tumor in seinem Wachstum eher einzuschränken. Wenn eine komplette Ausschaltung des Stromas keine therapeutische Option darstellt, wäre eine gemäßigte Regulation gegebenenfalls ein sinnvoller möglicher Ansatz. Dies wurde in einer aktuellen Arbeit aufgegriffen. Durch Gabe eines Vitamin-D Analogons zeigten bereits aktivierte PSC eine Herunterregulation ihrer sekretorischen Gene und ließen sich in einen inaktiven Zustand überführen. Ein Therapieansatz von Vitamin D und Gemcitabin zeigte einen deutlichen Überlebensvorteil in PDAC-Mäusen mit einer geringeren Ausbildung der Desmoplasie mit folglich erhöhtem Chemotherapieansprechen (Sherman et al., 2014).

Das den Tumor umgebende Stroma erlangte wie kein anderes Themengebiet im Bereich der Pankreaskarzinomforschung große Aufmerksamkeit. Nach anfänglich großer Hoffnung auf eine erfolgreiche und vielversprechende Therapie, zeigt sich jedoch, dass die Komplexität des Tumor-Microenviroment noch längst nicht verstanden ist.

### **3 Die Sternzellen des Pankreas**

#### **3.1 Ursprung und Eigenschaften**

Die Sternzellen des Pankreas (pancreatic stellate cells, PSC) stellen den

Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix dar und sind somit für die Bildung des tumorassoziierten Stromas von außergewöhnlicher Bedeutung. Erstmals konnten die Sternzellen 1998 aus dem Pankreasgewebe gesunder Ratten isoliert und kultiviert werden (Apte et al., 1998; Bachem et al., 1998). Die Zellen zeigen morphologisch sowie funktionell eine große Ähnlichkeit mit hepatischen Sternzellen, welche bereits zuvor bekannt waren und für fibrotische Umbauvorgänge in der Leber verantwortlich sind (Apte et al., 1998). Im gesunden Pankreasgewebe stellen die PSC mit nur 4 % der Zellen einen relativ kleinen Anteil der Zellpopulation dar und sind hauptsächlich in den periazinären Arealen lokalisiert. Die Funktion in ihrer hier noch inaktiven Form ist noch nicht vollständig geklärt. Durch ihre Fähigkeit extrazelluläre Matrixproteine sowie die zu deren Abbau benötigten Enzyme MMPs (matrix metalloproteinase) und deren Inhibitor TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) zu produzieren, sind sie vermutlich auch im gesunden Gewebe an der Aufrechterhaltung der extrazellulären Bestandteile beteiligt (Wilson et al., 2014). Weiterhin wird ihnen auch eine Rolle in der Regulation der Cholezystokinin (CCK) vermittelten exokrinen Pankreasfunktion zugeschrieben. Sternzellen exprimieren CCK-Rezeptoren und sind nach Stimulation in der Lage Acetylcholin (ACh) zu sezernieren, das die in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Azinuszellen zur Sekretion von Amylase stimuliert (Phillips et al., 2010). Charakteristisch für den noch ruhenden Zustand der Zellen sind ihre zytoplasmatischen Vitamin A enthaltende Fetteinschlüsse (lipid droplets) und ihre abgerundete Zellform (siehe Abbildung 1). Die Sternzellen exprimieren verschiedene Strukturproteine wie Desmin, Nestin, Vimentin und GFAP (glial fibrillary acid protein), welche sie von anderen Fibroblasten unterscheiden (Wilson et al., 2014).

In der Karzinogenese oder im Rahmen einer Gewebeschädigung mit folgender entzündlichen Reaktion werden die Sternzellen aktiviert und verändern sowohl ihre Morphologie als auch ihre Funktion. Sie verlieren ihre abgerundete Form sowie die charakteristischen „lipid droplets“ im Zytoplasma und nehmen ein sternartiges myofibroblastenartiges Aussehen an (Erkan et al., 2012). Diese Strukturveränderungen lassen sich durch eine verstärkte Expression des Intermediärfilamentes  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) erkennen, sodass der Nachweis von  $\alpha$ -SMA als Aktivitätsmarker verwendet wird (Apte et al., 1999). In der aktuellen Literatur werden aktivierte PSC häufig auch als tumor-assoziierte Fibroblasten (cancer-associated fibroblasts, CAFs) bezeichnet, da somit auch

Fibroblasten anderen Ursprungs, welche durch eine Veränderung im Tumor die Eigenschaften der PSC erhalten, mit eingeschlossen werden können. In den letzten Jahren konnten viele Faktoren identifiziert werden, welche zu einer Aktivierung der Zellen führen. Neben Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), führen Interleukine (IL) 1, 6 und 10, sowie hypoxischer und mechanischer Stress zur Aktivierung der Zellen (Apte et al., 1999; Erkan et al., 2012; Nielsen et al., 2016). Die mechanische Aktivierung zeigt sich bereits in-vitro durch eine morphologische Veränderung der Zellen wenige Tage nach Isolation und dem Kontakt mit aus Plastik bestehender Petrischalen, sodass eine zellbiologische Untersuchung von ruhenden Zellen in vitro nur eingeschränkt möglich ist. Aktivierte PSC proliferieren und steigern die Synthese extrazellulärer Matrixproteine (Vonlaufen et al., 2008). Die Zellen lassen sich in aktiviertem Zustand im gesamten Pankreasgewebe nachweisen. Interessanterweise zeigen sich aktivierten Sternzellen bereits um PanIN-Vorläuferlesionen des Pankreaskarzinoms, sodass die „Rekrutierung“ der PSC bereits in frühen Stadien der Tumorgenese eine Rolle zu spielen scheint (Pandol et al., 2012).

### **3.2 Interaktion mit anderen Zellarten**

Viele in vivo und in vitro Arbeiten zeigen einen engen Zusammenhang und eine gegenseitige Beeinflussung von Sternzellen und Tumorzellen. So ließen sich Sternzellen sowohl durch eine Co-Kultivierung als auch durch eine Behandlung mit Tumorzellüberständen aktivieren. Nachfolgend zeigten die Zellen eine erhöhte Proliferationsrate und eine verstärkte ECM-Produktion und wiesen eine gesteigerte Migrationsfähigkeit auf (Apte and Wilson, 2012). Die gesteigerte ECM-Synthese wird durch die Sekretion von TGF- $\beta$ 1 und FGF2 (fibroblast growth factor 2) vermittelt (Bachem et al., 2005).

Ebenso zeigten die Tumorzellen nach einer Stimulation durch PSC einen über PDGF vermittelten Proliferationsanstieg, eine erniedrigte Apoptoserate und eine gesteigerte Migration (Vonlaufen et al., 2008). Unter hypoxischen Bedingungen führte eine Stimulation der Tumorzellen durch Co-Kultivierung oder durch Überstände von PSC zu einer verstärkten Invasivität der Tumorzellen (Eguchi et al., 2013). Der Einfluss der Sternzellen auf Tumorzellen ließ sich auch durch in vivo Versuche bestätigen. Ein durch subkutane Tumorzellinjektion wachsender Tumor bei einer athymen Maus zeigte eine deutliche Größenzunahme, wenn zu den Tumorzellen Sternzellen verabreicht wurden (Bachem et al., 2005). Ebenso zeigten

Mäuse, denen Tumorzellen mit Sternzellen in das Pankreas injiziert wurden, neben einem verstärktem lokalem Wachstum auch eine erhöhte lokale und distale Metastasierung als bei alleiniger Tumorzellinjektion (Xu et al., 2010).

Auch konnten Einflüsse der Sternzellen auf weitere im Microenvironment des Tumors vorkommende Zellen gezeigt werden. So ließ sich ein positiver Effekt auf die Angiogenese nachweisen, welcher jedoch nur unter normoxischen Bedingungen zu sehen ist und nicht unter den im Stroma vorherrschenden hypoxischen Bedingungen (Erkan et al., 2009). Über eine Beeinflussung der Immunzellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Mastzellen) scheinen die PSC eine negative Wirkung auf die tumorspezifische Immunantwort des Körpers zu haben (Wilson et al., 2014). Relativ wenig ist bisher über den Einfluss der Sternzellen auf die Nervenzellen im Pankreaskarzinom bekannt. Durch eine Stimulation der PSC mit dem bekannten Wachstumsfaktor TGF $\beta$  zeigte sich eine verstärkte Expression von NGF (nerve growth factor) und den beiden Rezeptoren TrkA und p75<sup>NTR</sup>. NGF ist ein Wachstums- und Überlebensfaktor für sensorische und sympathische Nerven und spielt im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen eine Rolle (Haas et al., 2009). In hepatischen Sternzellen führt NGF zu einer Zunahme der Apoptose. Dies ließ sich für pankreatischen Sternzellen jedoch nicht bestätigen (Asai et al., 2006; Haas et al., 2009). Auch die Tatsache, dass Sternzellen neben NGF noch weitere neuronale Marker wie GFAP, BDNF (brain-derived neurotropic factor) und Nestin exprimieren, spricht für eine mögliche Beeinflussung mit neuronalen Strukturen (Wilson et al., 2014). Auch die bereits erwähnte Eigenschaft der Sternzellen ACh zu sezernieren unterstützt diese Vermutung (Phillips et al., 2010). Einen weiteren Hinweis für eine neurotrophe Wirkung der Sternzellen ergab die Beobachtung, dass die Überstände von humanen Sternzellen eine Veränderung im Wachstum der aus Ratten isolierten Rückenmarks-Ganglienzellen (dorsal root ganglia, DRG) bewirkten. Durch die Stimulation mit dem Überstand der PSC zeigten die Neuriten eine Dichtezunahme (Demir et al., 2010). Eine wichtige Rolle scheint auch der bereits erwähnte Sonic Hedgehog-Signalweg einzunehmen. So konnte gezeigt werden, dass es durch eine Überexpression des Sonic Hedgehog-Proteins in Tumorzellen über eine parakrine Aktivierung der Sternzellen zu einer gesteigerten perineuralen Invasion kommt. In Kokulturen erhöhte sich die nervenassoziierte Migration von Tumorzellen und in einem orthotropen Xenograft-Tumormodell zeigte sich eine Zunahme von Tumorgröße, Metastasierung und perineuraler Invasion nach Koinjektion von parakrin stimulierten Tumorzellen und

Sternzellen (Li et al., 2014).

In bisher unpublizierten Daten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Sternzellen aus Ratten (rPSC) die neurotrophen Faktoren Artemin und Neurturin, sowie die dazugehörigen Rezeptoren  $GFR\alpha-3$  und  $GFR\alpha-2$  exprimieren. Durch eine Stimulation der rPSC mit TGF $\beta$ -1 ließ sich eine Steigerung der Expression mittels Westernblot und quantitativer real-time PCR (qPCR) nachweisen (Dischl, 2017)

#### **4 Bedeutung der Nervenzellen im Pankreaskarzinom**

Der Betrachtung der Nerven kommt im Pankreaskarzinom im Vergleich zu anderen gastrointestinalen Tumoren eine besondere Bedeutung zu, da sich bei nahezu 100% der Tumore eine neurale Invasion durch Tumorzellen zeigt (Liebl et al., 2014). Neurale Invasion beschreibt die Infiltration intra- und extrapancreatischer Nerven durch Karzinomzellen. Diese können sich entlang des Perineuriums ausbreiten oder auch in das Endoneurium infiltrieren und so in direkten Kontakt mit Axonen und Gliazellen (Schwannzellen) gelangen (Bockman et al., 1994). In einer histopathologischen Analyse von 90 resezierten Pankreaskarzinomen zeigte sich in 50% der Fälle eine Tumorzellinfiltration von intrapancreatischen Nerven, welche jedoch schon außerhalb des lokalisierten Tumorgewebes gelegen waren (Takahashi et al., 1997). Dies korrelierte ebenfalls positiv mit dem Nachweis von Tumorzellen in angrenzenden extrapancreatischen Nervenplexi (Takahashi et al., 1997). Das perineurale Wachstum bzw. die Metastasierung in extrapancreatische Nervenplexi wird als ein Grund für das hohe Rezidivrisiko des Pankreaskarzinoms nach erfolgreicher Resektion angesehen (Nakao et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die perineurale Invasion einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor für das Pankreaskarzinom darstellt und stark mit dem Auftreten eines Lokalrezidiv assoziiert ist (Zhang et al., 2013). Neben der Infiltration lassen sich noch weitere Veränderungen der Nerven im Pankreaskarzinom nachweisen. So kommt es zu einer Hypertrophie und Zunahme der Dichte der im Pankreas befindlichen Nerven (Ceyhan et al., 2009a). Die Fähigkeit der Nerven zur Veränderung durch bestimmte Stimuli, wie durch sezernierende Faktoren eines Tumors, wird Neuroplastizität genannt.

Ebenso ließ sich bei einem erhöhten Grad an Desmoplasie im Tumorgewebe eine



verstärkte neurale Invasion nachweisen, sodass dem „microenvironment“ des Tumors auch in diesem Punkt eine entscheidende Rolle zu zukommen scheint (Ceyhan et al., 2009a). Für die gegenseitige Beeinflussung von Tumorzellen und Nervenzellen konnten sogenannte neurotrophe Faktoren identifiziert werden, welche als Stimuli für beide Zellarten von Bedeutung sind. Neurotrophe Faktoren sind essenziell für das Wachstum, die Regeneration und das Überleben von Neuronen (Yan et al., 2003). Aus den verschiedenen bekannten neurotrophen Faktoren der GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor)-Familie zeigte sich für Artemin und Neurturin eine besonders wichtige Rolle in der pankreatischen Neuropathie. Artemin wird im Pankreaskarzinom im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe verstärkt exprimiert, führt zu einer Steigerung der Invasivität von Tumorzellen und bewirkt eine Zunahme der Nervendichte (Ceyhan et al., 2006). Auch NGF, welches im Tumorgewebe überexprimiert wird, führt zu einer erhöhten Neuritendichte von myenterischen Plexus-Nervenzellen, nachdem diese mit Tumorgewebelysaten stimuliert wurden (Ceyhan et al., 2010). Neben Artemin und NGF ist auch Neurturin im Pankreaskarzinom hochreguliert. Tumorzellen entwickeln durch den Einfluss von Neurturin eine erhöhte Proliferationsrate sowie eine verstärkte Invasivität und zeigen eine zielgerichtete Migration zu exponierten Nervenzellen (Wang et al., 2014). Interessanterweise sind Artemin, Neurturin und NGF nicht nur im Tumorgewebe selbst, sondern auch im angrenzenden Stroma vermehrt exprimiert (Ceyhan et al., 2010; Wang et al., 2014).

Neben den bereits erwähnten Veränderungen auf neuronaler Ebene zeigt sich im Pankreaskarzinom auch eine Infiltration der Nerven mit Immunzellen im Sinne einer pankreatischen Neuritis sowie eine Veränderung in der Qualität der innervierenden Nervenfasern. Sowohl der Anteil der sympathischen als auch der cholinergen Nervenfasern nimmt im Pankreaskarzinom ab. Dieser Vorgang wird neuronales „Remodelling“ genannt (Ceyhan et al., 2009b).

## **5 Ziele der Arbeit**

Die genaue Funktion des tumorassoziierten Stroma im Pankreaskarzinom ist trotz intensivster Forschung noch nicht ausreichend geklärt und die Möglichkeiten einer

zielgerichteten Therapie bisher noch nicht verstanden. Um dieses komplexe Konstrukt und seinen Einfluss besser verstehen zu können, ist eine genaue Betrachtung und Analyse aller im sogenannten „microenvironment“ vorkommender Zellen anzustreben. Wichtige Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der Grad der Stromareaktion (Desmoplasie) mit einer erhöhten neuralen Invasion von Tumorzellen im Pankreaskarzinom korreliert (Ceyhan et al., 2009a). Die neurale Invasion wiederum ist ein entscheidender prognostischer Faktor für das Überleben und das Rezidivrisiko von Patienten mit einem Pankreaskarzinom (Zhang et al., 2013). 2009 konnten Haas et al. erstmalig zeigen, dass Sternzellen nach ihrer Aktivierung neurotrophe Faktoren exprimieren (Haas et al., 2009). Welchen tatsächlichen Einfluss die Sternzellen auf die Nervenzellen im Pankreaskarzinom ausüben, wurde bisher noch nicht genauer erforscht. Ebenso stellt sich die Frage, ob die Sternzellen bei der neuralen Invasion von Tumorzellen einen möglichen Trigger darstellen oder selbst an der Migration in Richtung der Nerven beteiligt sind.

Die Ziele dieser Arbeit waren somit die Interaktion der Sternzellen mit den Nervenzellen im Pankreaskarzinom genauer zu analysieren und zu charakterisieren, um einen möglichen relevanten Einfluss der Sternzellen auf die Nervenzellen zu erforschen. Stellvertretend für die peripheren Nerven des Pankreas wurden die Versuche mit primär isolierten *dorsal root ganglia* (DRG) von jungen Ratten durchgeführt, welche als Nerven des peripheren Nervensystems den Nerven im Pankreaskarzinom sehr ähnlich sind. Die in dieser Arbeit verwendeten primären Sternzellen wurden mit einer speziellen Methode der Dichtegradientenzentrifugation in besonders hohem Reinheitsgrad aus gesunden Rattenpankreatata isoliert (Apte et al., 1998). Eine Charakteristikum der Sternzellen ist ihre Aktivierung in der Entstehung des Stroma, sodass wir die primär isolierten Sternzellen für unsere Versuche mit *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) oder durch hypoxische Bedingungen stimulierten, um einen möglichen Einfluss dieser Aktivierung auf die Nervenzellen nachweisen zu können.

Zunächst wurden die Sternzellen rein morphologisch genauer untersucht und die Expression der neurotrophen Faktoren Neurturin und Artemin mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Anschließend wurde der Einfluss der Sternzellen auf die Nervenzellen und Gliazellen mittels Neuroplastizitätsassay untersucht. Um eine weitere Eigenschaft der Sternzellen – ihre Migrationsfähigkeit – unter dem Einfluss von Nervenzellen zu untersuchen, wurden die Sternzellen im 3D-

Migrationassay mit DRG konfrontiert und ihre Migrationseigenschaften analysiert. Um die Bedingungen im Tumor real zu simulieren, wurden Sternzellen mit fluoreszierenden Tumorzellen vermischt und diese erneut im 3D-Migrationassay auf ihre Migrationsfähigkeit hin untersucht.

## **II MATERIAL UND METHODEN**

### **1 Material**

#### **1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien**

- Pipetten: Tip One, Star lab (Hamburg, GER)
- Pipetten: Eppendorf Pipetten Ratiolab (Dreieich, GER)
- Pipetten (Glas): Serological Pipette, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Reagenzröhrchen: Falcon Röhrchen, Ratiolab (Dreieich, GER)
- Tubes: Reagiergefäße Safe Seal, Sarstedt (Nürnbrecht, GER)

#### **1.2 Allgemeine Geräte**

- Magnetrührer: MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
- Mikroskop 1: Primo Vert, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikroskop 2: Observer Z1, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikroskop 3: Axioskop 40, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikroskop 4: BZ-9000E, Keyence (Osaka, JPN)
- Photometer: Multiskan EX, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Roll-Mixer: Stuart Roller-SRT9 (Shaffordshire, UK)
- Shaker: Shaker DRS-12, neolab (Heidelberg, GER)
- Vortexer: IKA Works, INC., MS 1 Minishaker (Wilmington, USA)
- Waage 1: Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
- Waage 2: EW-N/EG-N, Kern (Balingen, GER)
- Wasserbad: GFL (Burgwedel, GER)
- Zentrifuge klein: Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)

#### **1.3 Allgemeine Reagenzien**

- Paraformaldehyd 8 %, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Darmstadt, GER)
- BCA Protein Assay: Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Tween 20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Triton X, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

- Normal Goat serum 10 % - ready to use, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- DAPI, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Vecta Mount, Permanent mounting medium, H5000, Vector (Burlingame, USA)
- NaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- MgSO<sub>4</sub>, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- KCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- NaHCO<sub>3</sub>, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Glucose, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- CaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Saponin, Sigma Life Science (St. Louis, USA)

#### **1.4 Allgemeine Materialien für die Zellkultur**

##### **Geräte**

- Zellkultur: FASTER BHA 72, BHA 72M 1013 (Ferrara, ITA)
- Primärzellkultur: FASTER S.R.L., BHA-48 (Ferrara, ITA)
- Fluoreszenzlampe: HBO 100, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Zentrifuge groß: Centrifuge, 5810 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Zentrifuge klein: Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Inkubator: Galaxy 170S, New Brunswick / Eppendorf company (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Wasserbad: Aqualine AL 18, Lauda (Lauda Königshofen, GER)
- Inkubatorschüttler: MaxQ 4000, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- Neubauerzählkammer, Marienfeld (Lauda-Königshofen, GER)

##### **Verbrauchsmaterialien**

- 24 well Platten: 24 well Multiwell, Falcon (Durham, USA)
- 96 well Platten: 96 well Multiwell, Falcon (Durham, USA)
- 10cm Schale: Zellkultur Schale - Cellstar, 100mm x 20mm, Greiner Bio One (Frickhausen, GER)
- 6cm Zellkultur Schale, Cellstar, 60mm x 15mm, Greiner Bio One

(Frickenhausen, GER)

- 3,5cm Zellkultur Schale, Cellstar, 35mm x 10mm, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Zellschaber: Cell Lifter, Costar (Washington, USA)

### **Medien und Lösungen**

- Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Paraformaldehyd 8%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Penicillin-Streptomycin, Bio Reagent, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Amphotericin B, Bio Reagent, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Refobacin, Gentamicinsulfat, Merck (Wien, AUT)
- Metronidazol, Ratiopharm (Ulm, GER)
- Poly-D-Lysine hydrobromide, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Trypan Blue Stain 0.4%, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- Trypsin-EDTA, Solution 1x, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Zellkulturmedien
  - Neurobasal Medium mit L-Glutamine und B-27-Substitution, Invitrogen-GIBCO (Darmstadt, GER) Zusätze: 1 % Penicillin-Streptomycin, 1% Amphotericin B
  - DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamine, PAA (Pasching, AUT, jetzt GE Healthcare life science, Chicago, USA) Zusätze: 10 % Fetal Bovine Serum, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1% Amphotericin B
  - Häms F-12, Hams nutrient Mixture F-12 mit L-Glutamine, Sigma Life Science (St. Louis, USA) Zusätze: 1 % Penicillin-Streptomycin, 1% Amphotericin B
  - MEM-Medium: Minimum Essential Medium Eagle, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
  - Hank's BSS, Hanks balanced salt solution, PAA Laboratories GmbH (Pasching, AUT, jetzt GE Healthcare life science, Chicago, USA) Zusätze: 0,1% Metronidazol, 0,06% Gentamicin

### **Zelllinien**

- Panc02-Cherry: murine cherry-Protein transduzierte PDAC-Zellen mit

freundlicher Genehmigung von Dr. Mark Pines, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

## **1.5 Spezielle Materialien für den Neuroplastizitätsassay**

### **Geräte**

- Hypoxie-Kammer: Incubator Chamber, MIC-101, Billups-Rothenberg Inc. (Del Mar, USA)

### **Verbrauchsmaterialien und Chemikalien**

- Glas-Coverslips (Deckgläser rund 12 mm aus Glas), Merck (Darmstadt, GER)

### **Proteine**

- Nerve growth factor- $\beta$  (NGF- $\beta$ ), N1408, human, rekombinant, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Transforming growth factor- $\beta$  (hTGF- $\beta$ 1), human, rekombinant, Roche Diagnostics AG (Rotkreuz, CH)

### **Antikörper für Immunfluoreszenz**

1. Antikörper:

- $\beta$ III-Tubulin: Anti-Tubulin, beta III isoform, monoclonal mouse antibody, 1:200, Millipore-Merck GmbH (Darmstadt, GER)
- GFAP: Anti-Glial fibrillary Acidic Protein, polyclonal rabbit antibody, 1:300, DAKO (jetzt Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

2. Antikörper:

- goat anti-mouse, Alexa Fluor 488, 1:400, Life technologies, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- goat anti-rabbit, CruzFluor 594, 1:400, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
- Kernfärbung: DAPI, 4',6-Diamidin-2-phenylindol, 1:3000, Thermo Scientific (Waltham, USA)

## **1.6 Spezielle Materialien für die Zellisolation**

### **1.6.1 Isolation der Sternzellen**

#### **Verbrauchsmaterialien und Chemikalien**

- Isofluran: Isofluran CP, cp-pharma (Burgdorf, GER)
- Skalpell: feather disposable scalpel, No. 10, Feather (Osaka, JPN)
- Injektionsspritzen: Micro-Fine U-40 Insulin, 39G x 12,7mm, Becton Dickinson GmbH (Franklin Lakes, USA)
- Einmalspritze: Injekt Solo, 20ml, Braun (Melsungen, GER)
- Präparationsbesteck, neolab (Heidelberg, GER)
- Zellsieb: Cell strainer, 40µm, BD Falcon, BD (Franklin Lakes, USA)
- Polypropylen Tubes: Nalgene, Oak Ridge High-Speed PPCO Centrifuge Tube, 50ml, , Sigma Life Science (St. Loius, USA)
- Nycodenz: Histodenz, nonionic density gradient medium, Sigma Life Science (St. Loius, USA)
- BSA, bovine serum albumin, Sigma Life Science (St. Loius, USA)

### **Enzyme**

- Collagenase P, 1,5 U/mg (aus Clostridium histolyticum), Roche Diagnostics AG (Rotkreuz, CH)
- DNase I (aus Ringerpankreas), Roche Diagnostics AG (Rotkreuz, CH)
- Protease, Typ XIV,  $\geq 3,5$  U/mg (aus Streptomyces griseus), Sigma Life Science (St. Loius, USA)

### **1.6.2 Isolation der *Dorsal Root Ganglia* (DRG)**

#### **Verbrauchsmaterialien und Chemikalien**

- Einmalspritze : Injekt Solo, 5ml, Braun (Melsungen, GER)
- Kanülen gelb: Einmalkanüle, Sterican, G20 (0,90x40mm), Braun (Melsungen, GER)
- Kanülen blau: Einmalkanüle, Sterican, G23 (0,60x30mm), Braun (Melsungen, GER)

### **Enzyme**

- Collagenase Typ 2, 280u/mg (aus Clostridium histolyticum), Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, USA)

### **1.7 Spezielle Materialien für den Migrationassay**

- ECM-Gel: Extracellular cell matrix gel aus Engelbreth Holm Swarm mouse



sarcoma, Sigma Life Science (St. Louis, USA)

- HEPES buffer solution, Sigma Life Science (St. Louis, USA)

## **1.8 Spezielle Materialien für die Immunfluoreszenz**

- Glas-Deckgläser, Coverslips, Thermanox Ø 13mm , Sigma Life Science (St. Louis, USA)

### **Antikörper**

#### 1. Antikörper:

- Neurturin, ab8061, polyclonal antibody IgG, rabbit 1:100, Abcam (Cambridge, GBR)
- Artemin, NBP1-46591 Lot 4513, polyclonal antibody, rabbit 1:100, Novus Biologicals (Littleton, USA)
- $\alpha$ -SMA, Anti-Human Smooth Muscle Actin, monoclonal mouse antibody, 1:100, DAKO (jetzt Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

#### 2. Antikörper:

- goat anti-rabbit, CruzFluor 594, 1:400, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
- goat anti-mouse, Alexa Fluor 488, 1:400, Life technologies, Thermo Scientific (Waltham, USA)
- VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories (Burlingame, USA)

## **1.9 Software**

- AxioVision, V 4.8.2.0 (Göttingen, GER)
- Office 2011 (Word, Excel, PowerPoint), Microsoft (Redmond, USA)
- GraphPad Prism 7, GraphPad Software (La Jolla, USA)
- ImageJ, Version 1.48, National Institutes of Health, USA
- Chemotaxis und Migration Plug-In für Image J von Ibidi (Martinsried, GER)
- analySIS Software, Olympus (Shinjuku, JPN)

## **2 Methoden**

### **2.1 Isolation und Kultivierung von *Dorsal Root Ganglia***

Für die in vitro Versuche mit Primärkulturen aus Nervenzellen wurden

Spinalganglienzellen von neugeborenen Ratten verwendet. In diesen Ganglien befinden sich die Zellkörper der afferenten peripheren sensorischen Nerven, welche über die Radix posterior (bei Tieren Radix dorsalis genannt) ins Rückenmark ziehen. In den Spinalganglien befinden sich neben den Neuronen auch Gliazellen im Verhältnis 1:10 (Delree et al., 1989). Diese werden in der Isolationsmethode zusammen mit den Neuronen gewonnen, so dass sich jeweils eine heterogene Zellpopulation ergibt. Ergebnisse mit der im Folgenden beschriebenen Methode wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits mehrfach publiziert. (Ceyhan et al., 2008)

Für die Isolation der sogenannten *dorsal root ganglia* (DRG) wurden gesunde 1 bis maximal 8 Tage alte Wistar-Ratten verwendet. Nach schneller Dekapitation und kontaminationsfreier Entfernung der gesamten Abdominalorgane wurde eine von kranial beginnende anteriore Laminektomie durchgeführt und der so eröffnete Teil der Wirbelsäule entfernt. Unter dem Lichtmikroskop lassen sich nun die Spinalganglien beidseits lateral des Rückenmarks erkennen und mit Hilfe von Präparierschere und Pinzette herauslösen. Für eine erfolgreiche Isolation ist es wichtig die zu- und abführenden Axone unmittelbar am Ganglion zu durchtrennen, um eine Verunreinigung mit Nervenfasern zu vermeiden. Die so gewonnenen DRG werden in einem auf Eis gekühlten MEM-Medium bis zum Ende der Prozedur gesammelt. Dem Medium (500ml) wurde zuvor 300µl Refobacin (Gentamicin) und 500µl Metronidazol beigegeben. Nach Entfernen des Mediums wurden die Ganglien in 800µl Hank's BSS Medium und 200µl Kollagenase II in einem Eppendorf-Gefäß für 30min bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Dissoziation des Gewebes wurde die Suspension mehrmalig durch sterile Kanülen gezogen (5x20G/0,9mm Kanüle, gefolgt von 3x23G/0,6mm Kanüle). Die nun vereinzelt und suspendierten Zellen wurden für 5min bei 4°C mit 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das zellreiche Pellet wurde nun mit 1ml Neurobasal-Medium resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer-Zellkammer ermittelt. Für den Neuroplastizitätsassay wurden jeweils 10<sup>3</sup> Zellen in 2ml Neurobasal-Medium pro Well in eine 24 Well-Platte ausgesät. Zuvor wurden Coverslips (13mm Durchmesser) in die Well-Platten ausgelegt und mit Poly-D-Lysin beschichtet. Für die Migrationsversuche wurden die Zellen direkt nach dem Zählen weiterverwendet. Die Zellen wurden in Neurobasal-Medium mit 1% FCS, 1% Penicilin/Streptomycin, 2% B-27 und 0,5mM L-Glutamin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 2.2 Isolation und Kultivierung von pankreatischen Sternzellen aus Ratten mit der Nycodenz<sup>®</sup>-Methode

Die Isolation von Sternzellen des Pankreas aus einer gesunden Ratte erfordert eine gewisse Übung und ist eine zeitaufwendige Prozedur, welche bis zu 4h dauert. Das Prinzip der hier verwendeten Methode beruht darauf, dass die nicht-aktivierten bzw. ruhenden Sternzellen sich durch ihre spezifischen zytoplasmatischen Fetteinschlüsse mit Hilfe eines Dichte-Gradienten von den übrigen Zellen der Bauchspeicheldrüse trennen lassen. Der Gradient wird mit Hilfe eines nicht toxischen Nycodenz<sup>®</sup>-Mediums aufgebaut, wodurch die Prozedur ihren Namen erhalten hat. Die Methode zeichnet sich durch eine relativ hohe Reinheit und Homogenität der Zellen aus, da sie im Vergleich zu anderen Isolationsmethoden die Sternzellen von gewöhnlichen Fibroblasten trennen kann. Die Zellen können prinzipiell aus Ratten jeden Alters gewonnen werden, jedoch hat es sich bewährt die Zellen aus neugeborenen Ratten bis zum Alter von 14 Tagen zu verwenden, da sich hier durch das noch kleinere und weichere Pankreas eine bessere Dissoziation des Gewebes und somit eine höhere Ausbeute an Zellen erzielen lässt.

Für die Isolation werden folgende Lösungen benötigt:

### Grey's Balanced Salt Solution (GBSS)

- MgSO<sub>4</sub> 0,0171g/500ml
- KCl 0,185g/500ml
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15g/500ml
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0598g/500ml
- MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,105g/500ml
- NaHCO<sub>3</sub> 1,135g/500ml
- Glucose 0,5g/500ml

Die Substrate werden zweimal abgewogen und in sterilem H<sub>2</sub>O aufgelöst. In eine der beiden Lösungen wird ebenfalls 3,5g/500ml NaCl gegeben (GBSS+NaCl). Nun wird beiden Lösungen in wenigen ml H<sub>2</sub>O aufgelöstes CaCl<sub>2</sub> (0,1126g/500ml) mit einer Pipette topfenweise hinzugegeben. Wird dieser Schritt zu schnell ausgeführt, kommt es zu einem Ausfällen von Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Die kompletten Stammlösungen wurden nun mit einem Vakuumfilter steril filtriert. Diese sollten innerhalb von 4 Tagen verwendet werden, um folgende Lösungen herzustellen:

**Bovine Serum Albumin (BSA) - Lösung (3%):** 0,15g BSA werden in 50ml

GBSS+NaCl aufgelöst.

**Nycodenz** Lösung (28,7%): 2,87g Nycodenz Pulver werden in 10ml GBSS-NaCl gelöst.

**Enzymlösung:** 52mg Collagenase P, 40mg Protease von *Streptomyces griseus* und 70µl Dnase I aus Rinderpankreas werden vorsichtig in 40ml GBSS+NaCl aufgelöst.

Für jede Zellisolation wurden 2 bis 3 gesunde Ratten verwendet, welche nach Betäubung mit Isofluran zunächst dekapitiert wurden. Nach der Eröffnung des Bauchraumes mittels Schere wird das an der Milz hängende Pankreas herauspräpariert und in eine mit gekühlter PBS-Lösung gefüllte Petri-Schale gegeben. Peripankreatisches Fettgewebe und intrapankreatische Gefäße sollten unter dem Mikroskop entfernt werden, um eine Verunreinigung möglichst zu vermeiden. Alle weiteren Schritte der Isolation werden in der Zellkultur unter einer sterilen Abzugshaube fortgeführt. Das entnommene Gewebe wird in die auf 37°C erwärmte Enzymlösung gegeben und diese mit sterilen Einmalspritzen so lange in das Gewebe injiziert bis sich die einzelnen Pankreaslobuli gut separieren lassen. Das Gewebe wird nun geteilt und mit jeweils 20ml Enzymlösung bei 37°C in einem Schüttler für 4min bei 160rpm und 3min bei 120rpm inkubiert. Nach einer mechanischen Zerkleinerung des Gewebes mittels Skalpell erfolgt ein zweiter Inkubationszeitraum von 7min mit 120rpm. Das fast vollständig suspendierte Pankreas wird nun durch Aspiration mit einer 5ml Pipette und einer 1ml Pipette weiter mechanisch aufgetrennt und anschließend durch ein 250µm Nylonnetz in ein 50ml Falcontube filtriert. Um keine Zellen zu verlieren, wird das Netz anschließend mit GBSS+NaCl Lösung erneut gespült und das Falcontube bis auf 45ml aufgefüllt. Das im Netz zurückgebliebene Gewebe wird verworfen und die Zellen bei 4°C für 10min bei 1500rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wird das Zellpellet in 10ml der BSA-Lösung resuspendiert und erneut für 10min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird erneut entfernt und die Zellen in 9,5ml BSA-Lösung resuspendiert. Zu der Lösung werden nun 10ml der Nycodenz-Lösung gegeben. Auf ein starkes Durchmischen wird verzichtet, da die Zellen in der Lösung verklumpen können. Die gesamte Suspension wird nun vorsichtig mit einer auf eine 20ml Spritze gesteckten Einmalpipette unter 6ml der BSA-Lösung pipettiert, welche zuvor in ein Polycarbonat-Tube gegeben wurde. Hierbei ist es wichtig, dass es zu keiner Vermischung der beiden Lösungen kommt, da sich sonst nicht der erforderliche

Gradient aufbauen kann. Anschließend wird die Lösung für 20min bei 4°C mit 2800rpm zentrifugiert. Die Beschleunigung und das Abbremsen der Zentrifuge werden für diesen Schritt auf das Minimum reduziert, so dass es vor und nach der eigentlichen Umdrehungsgeschwindigkeit nicht zu abrupten Einwirkungen auf das Gefäß kommen kann. Es zeigt sich nun im oberen Drittel der Lösung ein leicht trübes Band, in welchem sich die Sternzellen befinden. Die restlichen Zellen haben sich als Pellet abgesetzt. Mit einer Pipette wird diese Zwischenschicht nun entnommen ohne Flüssigkeit aus den angrenzenden Schichten mitzunehmen. Die Zellen werden mit 10ml der BSA-Lösung erneut für 10min bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert, um die Zellen von restlichem Nycodenz zu befreien. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 50%HämF12/50%DMEM Medium + 10%FBS + 1%Penicillin/Streptomycin + 1% Amphotericin B resuspendiert. Die Zellen wurden je nach weiterer Verwendung in verschieden große Petrischalen ausgesät und unter konstanten Bedingungen in 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt, um nicht angehaftete Zellen zu entfernen. Danach erfolgte der Mediumwechsel 2 Mal pro Woche.

Erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80% und wurden nicht in der ersten Passage für Versuche verwendet, wurden das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend je nach Größe der Petrischale mit Trypsin bedeckt (1ml - 10cm Schale, 0,5ml - 6cm Schale). Nach einer Inkubationszeit von 3min bei 37°C + 5%CO<sub>2</sub> konnten die Zellen aus der Schale in ein Falcontube mit Sternzell-Medium im Verhältnis 1:10 für 10min bei 4°C und 1500rpm abzentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde erneut in Medium resuspendiert und erneut in doppelte oder vierfache Anzahl in Petri-Schalen ausgesät.

### **2.3 Zellkultur**

Als einzige nicht primär isolierte Zellen wurde die murine Pankreaskarzinomzelllinie Panc2-Cherry verwendet, welche uns freundlicherweise von Dr. Mark Pines (The Hebrew University of Jerusalem, Israel) überlassen wurde. Die immortalisierte Zelllinie wurde stabil mit dem fluoreszierenden Protein mCherry transduziert, sodass die Zellen bei einer Lichtwellenlänge zwischen 587nm und 610nm fluoreszieren. Die Zellen wurden unter Normalbedingungen mit RPMI-Medium + 5%FCS + 1%Penicillin/Streptomycin + 1% Amphotericin B bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit Trypsin-EDTA gesplittet.

#### **2.4 Stimulation der Sternzellen mit TGF- $\beta$ und Gewinnung von Zellüberständen**

Die frisch isolierten Sternzellen wurde in 3 Petrischalen (60mmx15mm) mit gewöhnlichem Sternzell-Medium 50%HamF12/50%DMEM Medium + 10%FCS + 1%Penicillin/Streptomycin + 1% Amphotericin B ausgesät. Die Versuche wurden im Bereich der ersten Zellpassage durchgeführt, um eine zusätzliche Aktivierung der Sternzellen durch das Splitten zu vermeiden. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht, wurden sie für 24h mit serumfreiem Medium inkubiert. Hierfür wurde das serumhaltige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 3ml 50%HamF12/50%DMEM Medium + 1%Penicillin/Streptomycin + 1% Amphotericin B pro Petrischale bedeckt. Nach 24h Inkubationszeit wurde die Stimulation mit *transformig growth factor -  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) gestartet. Nach mehreren Vorversuchen zur Optimierung, welche nicht in dieser Arbeit erwähnt werden, wurde eine Dosis von 1ng/ml gewählt. Dies entspricht einer Menge von 1 $\mu$ l pro ml Medium. Das bestehende Medium wurde entfernt und die Zellen zum Zeitpunkt „0“ mit 3ml serumfreiem Sternzellmedium + TGF- $\beta$  in oben genannter Konzentration stimuliert. Die Überstände wurden nach 6h, 12h und 24h abgenommen, für 10min bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert, um abgelöste Zellen zu entfernen. Die nun zellfreien Überstände wurden in 500 $\mu$ l Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Ebenso wurden in gleichen Zeitabständen die Zellen geerntet und für weitere Protein- und RNA-Untersuchungen weiterverarbeitet, welche nicht Inhalt dieser Arbeit waren. Der Versuch wurde mit gleichem Vorgehen 3 Mal wiederholt.

#### **2.5 Stimulation der Sternzellen durch Hypoxie und Gewinnung von Zellüberständen**

Die Stimulation der Sternzellen durch Exposition in einem hypoxischem Umfeld erfolgte nach einem ähnlichen Schema wie die TGF- $\beta$  Stimulation. Die Zellen wurden hierfür in 2 Petrischalen (10mmx15mm) in serumhaltigem Sternzellmedium bis zur 80%-Konfluenz belassen und anschließend für 24h in serumfreies Medium überführt. Nach einem erneuten Medienwechsel zum Zeitpunkt „0“ wurden die Zellen in eine Hypoxiekammer gestellt und nach 5min Dauerzufuhr von 1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 94%N<sub>2</sub> für 12h und 24h bei 37°C ohne weitere Sauerstoffzufuhr inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, für

10min bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert und nach Aliquotierung in Eppendorfgefäße bei -80°C eingefroren. Als Kontrolle wurden Zellen unter nichthyperoxischen Bedingungen kultiviert und die Überstände eingefroren, um eine unbehandelte Vergleichsgruppe zu erhalten. Die Versuche wurden jeweils in 3 Replikaten durchgeführt.

## **2.6 Messung der Proteinkonzentration der Überstände**

Um für die Behandlung der Nervenzellen im Neuroplastizitätsassay exakt gleiche Proteinkonzentrationen der abgenommenen Überstände verwenden zu können, mussten diese zuvor mit dem Pierce BCA Proteinkit analysiert werden. Hierfür wurden 20µl des Überstandes mit 200µl Bichinoninsäure, welche nach Herstellerangaben zuvor aus 2 Lösungen im Verhältnis 1:50 hergestellt wurde, in eine 96-well Platte pipettiert und für 30min bei 37°C inkubiert. Anhand ebenfalls in die Platte pipettierter definierter Proteinkonzentrationen aus BSA, konnte durch eine photometrische Analyse der Absorption bei 562nm die Proteinkonzentration der Überstände berechnet werden.

## **2.7 Phasen-Kontrastmikroskopie**

Die Sternzellen wurde 24h und 96h nach primärer Isolation, sowie vor und nach Stimulation mit TGF-β mit dem Observer Z1 Mikroskop von Zeiss mittels Phasenkontrast bei 200x Vergrößerung fotografiert, um die morphologischen Veränderungen der Zellen analysieren zu können.

## **2.8 Immunfloreszenz der Sternzellen**

Für Immunfloreszenzfärbungen von primär isolierten Sternzellen wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in mit Coverslips (ø13mm) ausgelegten 24 Well-Platten ausgesät und für 24h mit Sternzellmedium + 10% FCS bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit TGF-β in einer Konzentration von 1ng/ml mit gleichem Medium stimuliert oder unstimuliert inkubiert. Die Stimulation wurde für diesen Versuch nach 24h und 48h wiederholt. Nach 72h wurde das Medium entfernt und die Zellen nach dem Waschen mit PBS für 30min bei 8°C mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss wurden die Proben mit einem Puffer bestehend aus PBS + 0,2%BSA + 0,05% Saponin für 1h geblockt. Nun erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper gegen Neurturin (1:100) bzw. Artemin (1:100) und jeweils α-SMA (1:100) gelöst in gleichem Puffer ebenfalls für 1h. Nach dem dreimaligen Waschen wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden sekundären Antikörper (IgG) lichtgeschützt für 1h behandelt (für Neurturin bzw. Artemin

jeweils: goat-anti rabbit und für  $\alpha$ -SMA: goat-anti mouse). Zum Abschluss wurden die Coverslips nach erneutem 3 maligen Waschens mit einem Tropfen Vectashield mit DAPI benetzt und auf einem Objektträger fixiert. Die fluoreszierenden Zellen wurden anschließend bei 8°C lichtgeschützt gelagert und mit dem Keyence Mikroskop bei einer Vergrößerung von 200x fotografiert.

## **2.9 Neuroplastizitätsassay**

Um den direkten Einfluss der Sternzellen auf das Nervenwachstum zu untersuchen, wurde der in unserem Labor entwickelte Neuroplastizitätsassay verwendet (Demir et al., 2010). Für den Versuch wurden jeweils 10 000 frisch isolierte DRG-Zellen auf Coverslips in 24-Well Platten ausgesät und für 24h mit jeweils 500 $\mu$ l Neurobasal-Medium mit 1% FCS, 1% Penicilin/Streptomycin, 2% B-27 und 0,5mM L-Glutamin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Coverslips wurden zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet. Zeigten sich nach 24h mehr als 50% der Zellen im Lichtmikroskop als nicht vital, wurde dieses Well nicht für den Versuch verwendet. Bei erfolgreicher DRG Isolation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den Überständen der zuvor stimulierten Sternzellen behandelt. Die Proteinmenge der verwendeten Überstände betrug immer 50 $\mu$ g, was einer Konzentration von 100 $\mu$ g/ml Medium entspricht. Um das benötigte Volumen an Medium pro Well zu erhalten, wurden die errechnete Menge des Überstandes mit Neurobasal-Medium ohne FCS auf 500 $\mu$ l aufgefüllt und die Zellen für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> behandelt. Die Zellen wurde mit rPSC-Überständen von 6h, 12h und 24h TGF- $\beta$ -Stimulation, sowie 12h und 24h Hypoxie und Normoxie behandelt. Für eine Positivkontrolle wurden die Zellen mit nerve growth factor (NGF) in einer Konzentration von 10ng/ml in Neurobasal-Medium ohne FCS behandelt, als Negativkontrolle diente Neurobasal-Medium ohne FCS. Es wurden jeweils pro Versuchsansatz 3 Well-Platten pro Probe behandelt. Nach 48h wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 15min fixiert. Die Zellen konnten nach dem Fixieren mit jeweils 500 $\mu$ l PBS bedeckt im Kühlschrank bei 8°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

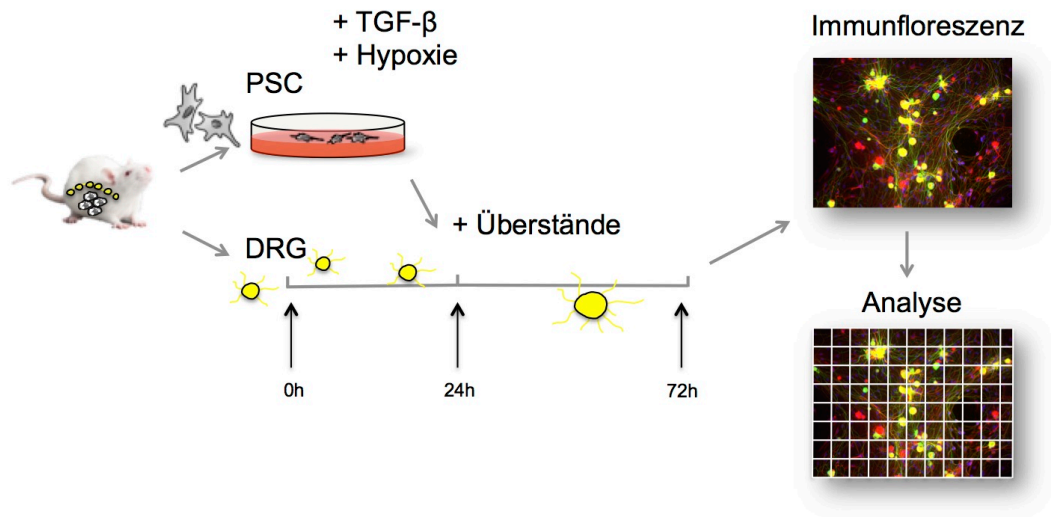
Im nächsten Schritt wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen von  $\beta$ III-Tubulin, GFAP und der Kernfärbung DAPI durchgeführt. Hierfür wurden die auf den Coverslips fixierten Zellen bei Raumluft zunächst 5min mit PBST inkubiert, anschließend für 10min mit 0,5%TritonX100/PBS bedeckt und erneut mit PBST für 5min gewaschen. Nun wurden die Coverslips vorsichtig mit einer Pinzette aus



den 24-Wellplatten entfernt und mit 70µl Normal Goat Serum (NGS) für 30min geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit einem monoklonalem Antikörper gegen  $\beta$ III-Tubulin (1:200, mouse) und einem polyklonalem Antikörper gegen GFAP (1:300, rabbit) in jeweils 50µl PBS pro Coverslip für 90min behandelt. Danach wurden die Coverslips 15x vorsichtig durch Eintauchen in ein Becherglas mit PBST gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörpern gegen mouse (1:400, 594nm, rot, goat) und rabbit (1:400, 488nm, grün, goat) lichtgeschützt für 1h inkubiert. Für die Kernfärbung wurde zusätzlich 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:3000) verwendet. Zuletzt wurden die Coverslips nach dem Waschen mit PBST und destilliertem Wasser mit einem Tropfen Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert.

Die gefärbten Neurone und Gliazellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Hierfür wurden pro Coverslip die 4 am dichtesten bewachsenen Bereiche eines Slides ausgewählt und jeweils eine Aufnahme der Rot-, Grün- und Blaufluoreszenz in 200-facher Vergrößerung gemacht.

Für die Auswertung der Neuritendichte wurde die analySIS Software (Olympus) verwendet und ein quadratisches Raster (50µm x 50µm) über die Bilder gelegt. In den 196 so entstandenen Kästchen wurde die Anzahl der Neuriten, welche die waagerechte Unterkante eines Quadrates kreuzen, pro Quadrat gezählt. Die Neuritendichte entspricht der durchschnittlichen Anzahl pro Feld. Zellkörper wurden nicht als Neuriten gewertet. Zur weiteren Analyse der Gliazelldichte wurden zunächst alle Zellen eines Bildes in der DAPI-Aufnahme gezählt und anschließend die Zellzahl der Neurone subtrahiert. Die Gliazelldichte entspricht somit der durchschnittlichen Anzahl der Gliazellen pro aufgenommenem Bild. Der gesamte Versuch wurde 3 mal durchgeführt. So wurden pro Probe 36 Fotografien ausgewertet (4 Fotos je 3 Coverslips bei 3 Versuchen). Den schematischen Ablauf des Neuroplastizitätsassay zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1 : Schematischer Versuchsablauf des Neuroplastizitätsassays**

## 2.10 Migrationassay

Der dreidimensionale in vitro Migrationassay wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und analysiert die gegenseitige Beeinflussung von Zellarten hinsichtlich verschiedener Aspekte der Migration (Ceyhan et al., 2008). Die zu untersuchenden Zellen werden in 25µl eines Extrazellulären Matrix Gel (ECM-Gel) gebracht und im Abstand von 1mm nebeneinander in eine Petrischale (ø35mm) pipettiert. Für die Migration wird nun ebenfalls aus ECM-Gel eine Brücke zwischen den Gel-Böpseln pipettiert und das gesamte Well mit Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert bis die Migrationfronten mit einem „Time-Lapse Mikroskop“ für einen bestimmten Zeitraum in gewissen Abständen fotografiert wird. Die zu untersuchende Zellpopulation befindet sich in der Mitte des Versuchaufbaues. In jedem Versuch wird eine Migrationsfront hin zu einem leeren ECM-Böpsel mitanalysiert, um eine Vergleichsgruppe (Negativkontrolle) zu erhalten. In dieser Arbeit wurden sowohl primär isolierte Sternzellen in der ersten Passage, Panc2-Cherry und eine Mischpopulation aus PSC und Karzinomzellen (welche im Folgendem als „Tumor“ bezeichnet wird) auf ihre neuronengerichtete Migration zu primär isolierten DRG untersucht und verglichen.

Für die Versuche wurden zunächst die in der Mitte befindlichen Böpsel pipettiert. Hierfür wurde die gewünschte Zellzahl in ein 1,5ml Eppendorf Tube gebracht und bei 4°C und 1000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das in 25µl ECM-Gel resuspendierte Pellet als Tropfen auf den Boden der Petrischale pipettiert. Die rPSC und Panc2-Cherry Zellen wurden jeweils in einer

Menge von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ECM-Tropfen verwendet. Die gemischte Zellpopulation „Tumor“ enthielt 50 000 PSC und 50 000 Panc2-Cherry Zellen, welche vor der Zentrifugation vermischt wurden. Anschließend wurde zu einer Seite ein Böpsel ohne Zellen pipettiert. Auf die andere Seite wurden DRG aufgebracht, welche zuvor isoliert wurden. Die DRG-Menge einer Ratte wurde für 3 Böpsel verwendet, zentrifugiert, in ECM-Gel resuspendiert und pipettiert. Anschließend wurden die Schalen für 15min bei 37°C inkubiert, um das ECM-Gel fest werden zu lassen. Hiernach wurden die Brücken mit 5µl ECM-Gel pipettiert, die gesamte Petrischale erneut für 10min inkubiert und dann mit 2ml Medium (50% Neurobasal-Medium +10%FCS/50% Sternzellmedium + 10%FCS) bedeckt. Nach 24h wurde 50µl HEPES-Puffer pro Schale in das Medium pipettiert, um den pH-Wert konstant zu halten. Im Anschluss wurden jeweils 6 Schalen gleichzeitig in das Time Lapse Mikroskop gestellt und alle 15min für 48h bzw. 42h mittels Phasenkontrast und Fluoreszenzlicht fotografiert.

Die Auswertung erfolgte über Image J mit Hilfe der Plug-Ins Chemotaxis und Migration von IbiDi. Hierfür wurden 30 Zellen pro Front während der Migration auf jedem Bild per Mausclick verfolgt (Cell tracking). Durch die Fluoreszenzbilder konnten in der Mischpopulation „Tumor“ sowohl die PSC als auch die Panc2-Cherry getrennt voneinander analysiert werden. Durch das Programm konnten später folgenden statistisch verwendbaren Parameter der Migration berechnet werden: die euklidische Strecke jeder Zelle, die Geschwindigkeit und Direktionalität der Migration und der sogenannten „Forward Migration Index“ (FMI).

### **3 Tierhaltung**

Für die Versuche wurden gesunde Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar unter tierärztlicher Aufsicht nach den gesetzlich vorgeschriebenen Bestimmungen gehalten. Für die Versuche wurden Jungtiere direkt nach Erhalt der Firma Charles River verwendet. Außerdem wurden Ratten im ZPF verpaart und anschließend Jungtiere aus der eigenen Zucht genutzt.

### **4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Program GraphPad Prism 7 der Firma GraphPad Software durchgeführt. Für die statistische Analyse von zwei Gruppen

wurde der Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Die Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben.

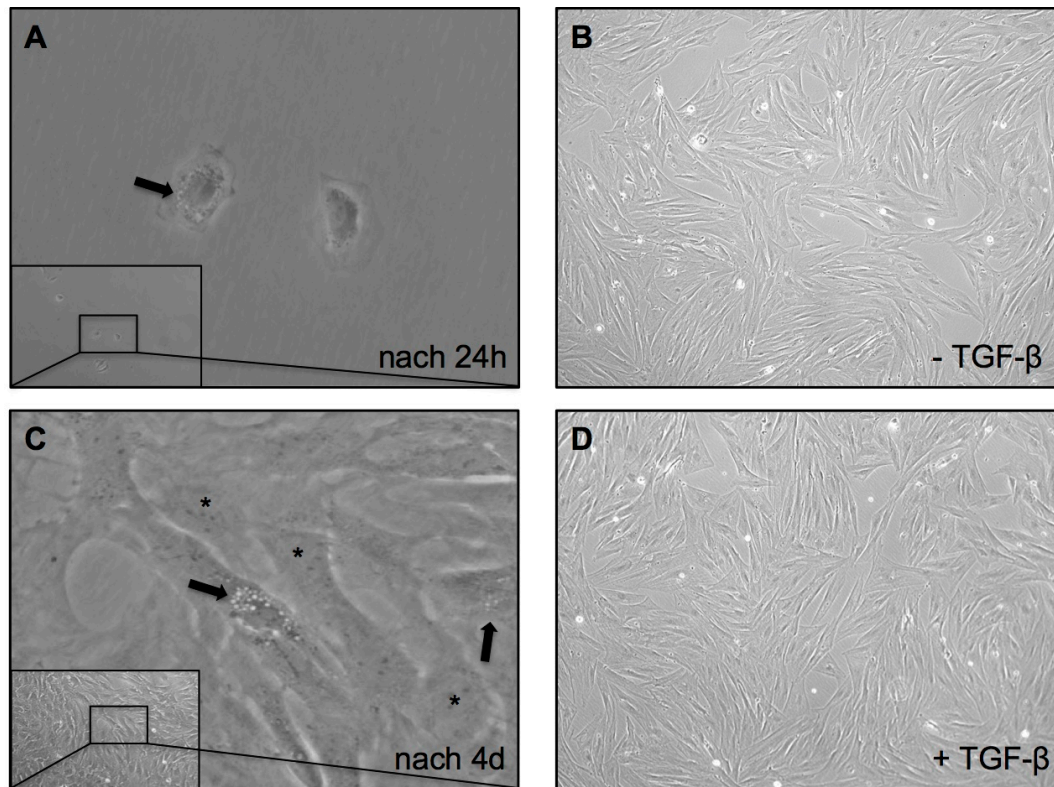
### **III ERGEBNISSE**

#### **1 Zellbiologische Analyse der Sternzellen**

##### **1.1 Morphologische Analyse der Sternzellen nach primärer Isolation und Stimulation mit TGF- $\beta$**

Die aus Ratten primär isolierten Sternzellen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Morphologie unter dem Lichtmikroskop genauer betrachtet, um die Reinheit der Isolation zu verifizieren und eine mögliche Aussage über den Aktivierungsgrad der Zellen treffen zu können. Es zeigte sich 24h nach der Isolation die Morphologie von nicht aktivierten Sternzellen mit abgerundeter Zellform. Deutlich präsentierten sich die typischen Vitamin A enthaltenden Fetteinschlüsse im Zytoplasma (siehe Abbildung 1 A). Nach mehrfacher Zellteilung zeigten die Zellen eine spindelförmige Struktur mit Verlust der Fetteinschlüsse (siehe Abbildung 1 C). Diese morphologischen Veränderungen werden bereits durch den Kontakt mit der Petrischale ausgelöst und bedürfen keiner weiteren Stimulation, so dass hier eine mechanische Aktivierung der Zellen eine Rolle spielt.

Nach mehr als 96h lassen sich nach morphologischen Aspekten keine ruhenden bzw. nicht-aktivierten Sternzellen mehr nachweisen. Eine weitere Stimulation mit TGF- $\beta$  für 24h veränderte die Morphologie der Zellen nicht (siehe Abbildung 1 B und 1 D).

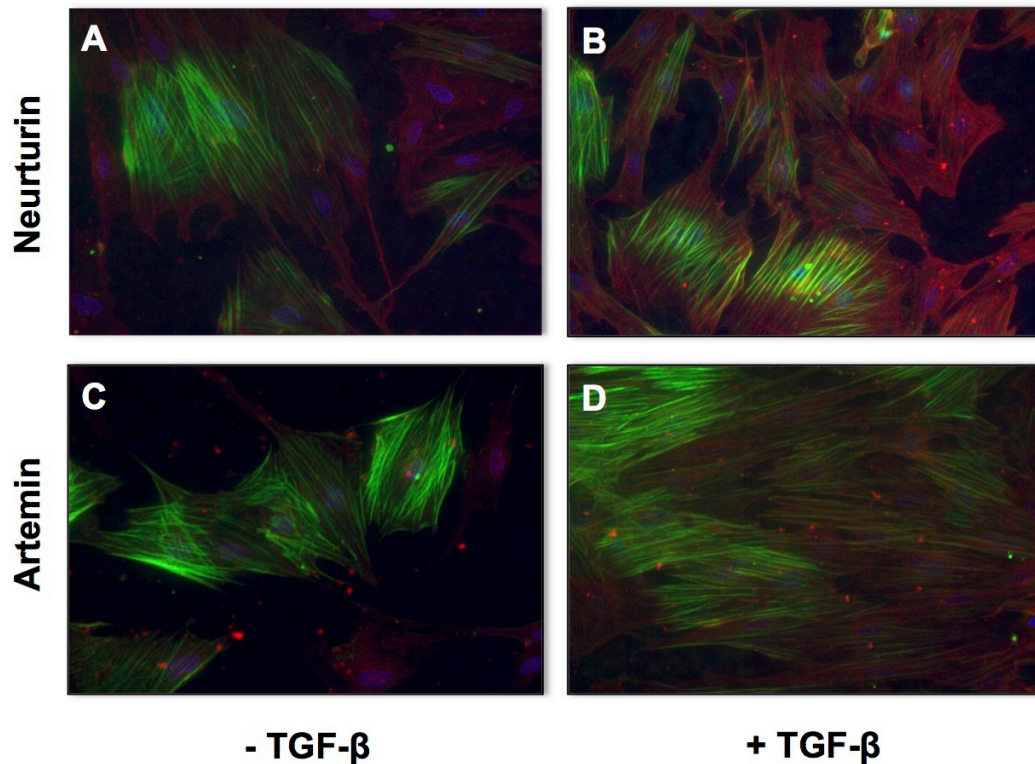


**Abbildung 2:** Lichtmikroskopie von isolierten primären Sternzellen aus Ratten: **A:** Aufnahme 24h nach Isolation von rPSC: es zeigen sich abgerundete Zellen mit im Zytoplasma gelegenen Fetteinschlüssen (schwarzer Pfeil), Übersichtsbild mit 200x Vergrößerung; **C:** Lichtmikroskopie von rPSC nach 4d: die Zellen haben ihre abgerundete Form verloren und stellen sich mehr spindelförmig dar. Die meisten Zellen (exemplarisch mit \* markiert) haben die Fetteinschlüsse bereits verloren. Nur noch wenige Zellen zeigen die sog. „lipid droplets“ (schwarzer Pfeil); Übersichtsbild mit 200x Vergrößerung. **B + D:** rPSC aus identischer Isolation (>4d) ohne nachweisbare „lipid droplets“ wurden für 24h mit (D) und ohne (B) TGF- $\beta$  kultiviert. Morphologisch zeigen sich keine Veränderungen durch die Stimulation.

## 1.2 Expressionsanalyse mittels Immunfluoreszenz nach Stimulation mit TGF- $\beta$

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten eine zunehmende Expression von Artemin und Neurturin nach Stimulation der Sternzellen mit TGF- $\beta$  mittels Westernblot und qPCR nachweisen. Um dies zu bestätigen, führten wir Immunfluoreszenzfärbungen von mit TGF- $\beta$  stimulierten und unstimulierten Sternzellen durch. Die Stimulation erfolgte dreimalig im Abstand von 24h nachdem die Zellen eine Konfluenz von 70% erreicht hatten. Nach Stimulation mit TGF- $\beta$  zeigte sich eine vermehrte zytoplasmatische Anfärbung von Artemin (siehe Abbildung 2 C+D) und Neurturin (siehe Abbildung 2 A+B) im Vergleich zu

unstimulierten Zellen in der Immunfloreszenzfärbung.



**Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbung der rPSC mit Neurturin und Artemin:** A+B: Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der Immunfluoreszenz von Neurturin nach 72h Stimulation mit TGF- $\beta$  (A ohne TGF- $\beta$  ; B mit TGF- $\beta$  , Färbung: ■ Neurturin: rot, ■  $\alpha$ -SMA: grün, ■ DAPI:blau) C+D: Nach Stimulation der rPSC mit TGF- $\beta$  für 72h kommt es zu einer verstärkten Anfärbbarkeit von Artemin im Vergleich Zellen ohne TGF- $\beta$  Stimulation (C ohne TGF- $\beta$ ; D mit TGF- $\beta$ , Färbung: ■ Artemin: rot, ■  $\alpha$ -SMA: grün, ■ DAPI:blau); Vergrößerung 40x.

## 2 Einfluss der Sternzellen auf die Neuroplastizität

### 2.1 Analyse der Neuritendichte von *Dorsal Root Ganglia* unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen

Um einen direkten Einfluss der Sternzellen auf Nervenzellen nachzuweisen, führten wir den in unserem Labor etablierten Neuroplastizitätsassay durch. Aus Ratten isolierte primäre Sternzellen wurden zunächst mit TGF- $\beta$  behandelt, um eine Stimulation und Aktivierung der Zellen zu erreichen. Um einen vom Aktivierungsgrad abhängigen Einfluss zu untersuchen, wurden die Sternzellen für 6h, 12h oder 24h stimuliert. Der entnommene Zellüberstand wurde für die

Behandlung der DRG verwendet (Versuchsaufbau siehe Abbildung 1).

Die gemessene Neuritendichte der DRG wird als Nervenfasern pro  $2500\mu\text{m}^2$  angegeben. Als Positivkontrolle wurden die DRG mit dem neuronalen Wachstumsfaktor NGF behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte DRG, welche in Neurobasalmedium (NB) kultiviert wurden. Repräsentative Bilder der Auswertung zeigt Abbildung 4 A.

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der Neuritendichte nach Behandlung der DRG mit den Überständen der TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollprobe in allen 3 Stimulationszeiten (6h:  $2,87\pm 0,2647$ ,  $p=0,0028$  ; 12h:  $2,887\pm 0,214$  ,  $p=0,0001$ ; 24h:  $3,487\pm 0,2876$ ,  $p<0,0001$  vs. NB/Negativkontrolle  $1,97\pm 0,2094$ , Einheit: Nervenfasern/ $2500\mu\text{m}^2$ , Mann-Whitney U Test, Abbildung 4 B). Es ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Neuritendichtezunahme zwischen den unterschiedlichen Stimulationszeiten der Sternzellen nachweisen. Interessanterweise zeigten die Nervenfasern in der 24h TGF- $\beta$  Gruppe eine höhere Neuritendichte als die der Positivkontrolle, welche sich jedoch als nicht statistisch signifikant darstellte (NGF:  $3,245\pm 0,2928$  vs. 24h TGF- $\beta$   $3,487\pm 0,2876$ , Einheit: Nervenfasern/ $2500\mu\text{m}^2$ , Abbildung 4 B). Um den spezifischen Einfluss der Stimulation der Sternzellen durch TGF- $\beta$  zu untersuchen, wurden ebenfalls DRG mit Überständen von nicht stimulierten Sternzellen behandelt und mit den zuvor gewonnenen Ergebnissen verglichen. Es wurden Behandlungszeiten für 12h und 24h ausgewählt. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Neuritendichte bei Behandlung mit TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen im Vergleich zu unstimulierten Sternzellen, sodass die vorherige Stimulation der Sternzellen das neurotrophe Potenzial der Zellen erhöht (12h - TGF- $\beta$ :  $2,344\pm 0,1456$  vs. 12h + TGF- $\beta$ :  $2,877\pm 0,214$  ,  $p=0,0432$ , unpaired t-Test und 24h - TGF- $\beta$ :  $2,748\pm 0,1711$  vs. 24h + TGF- $\beta$ :  $3,487\pm 0,2876$ ,  $p=0,0305$ , unpaired t-Test, Einheit: Nervenfasern/ $2500\mu\text{m}^2$ ). Erneut stellte sich die Neuritendichte jeder der untersuchten Gruppen signifikant erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle (Behandlung ohne Sternzellüberstand) dar (NB vs. 12h - TGF- $\beta$   $p=0,0197$ ; NB vs. 12h + TGF- $\beta$   $p=0,0001$ ; NB vs. 24h - TGF- $\beta$   $p=0,0005$ ; NB vs. 24h + TGF- $\beta$   $p<0,0001$ , Mann-Whitney U Test).



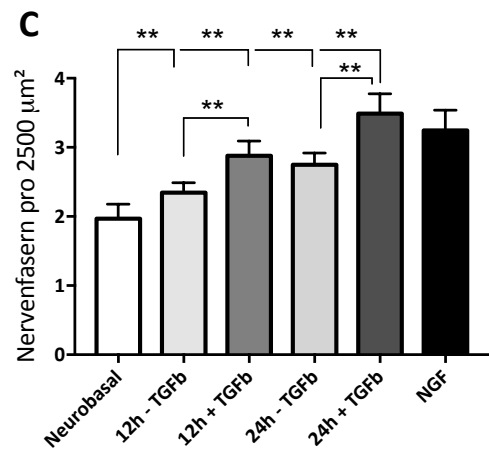
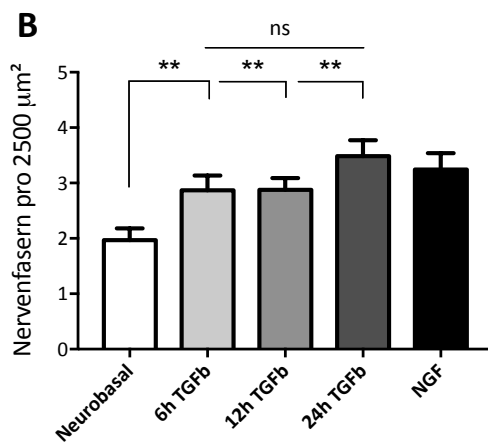
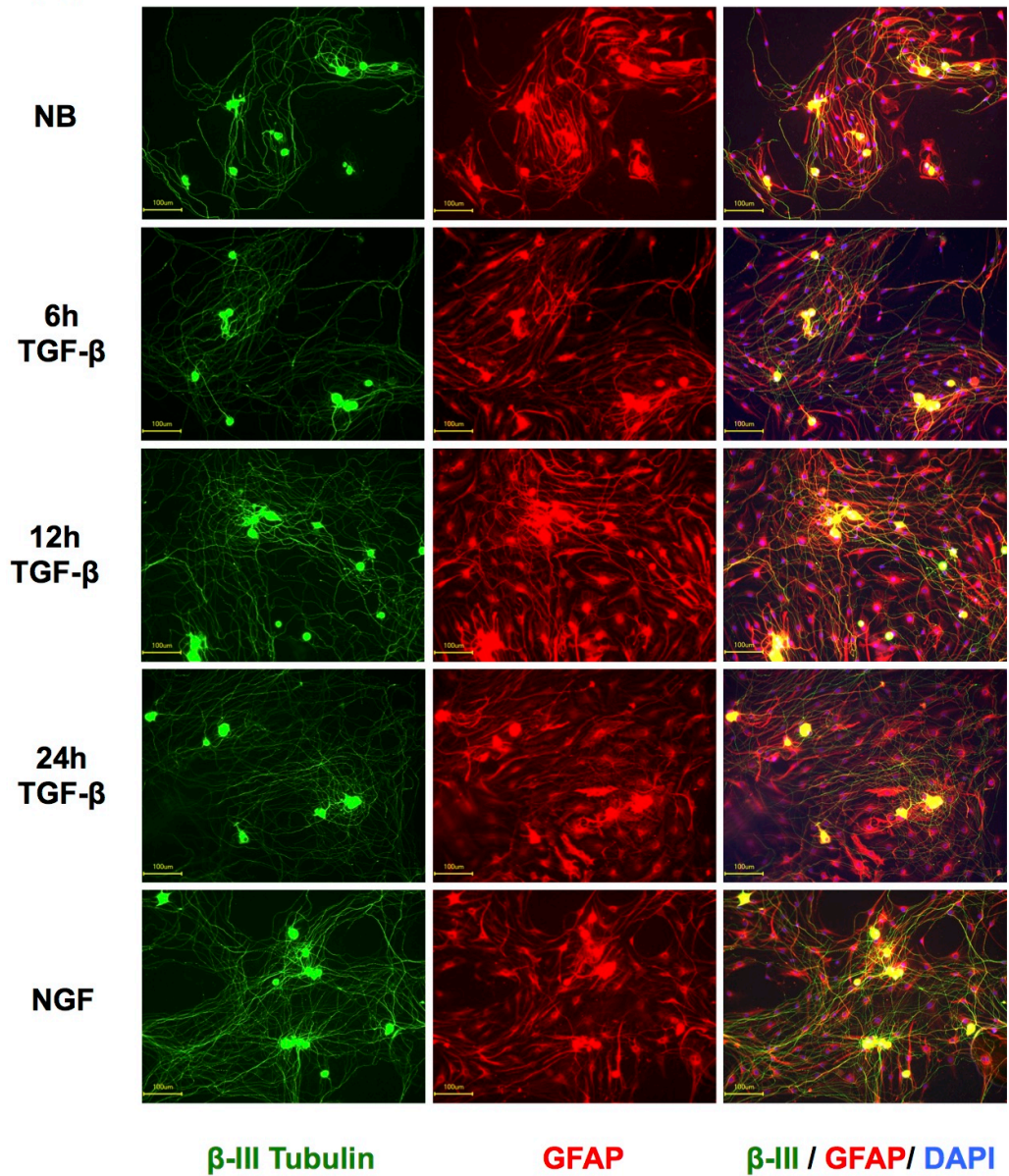
**A**

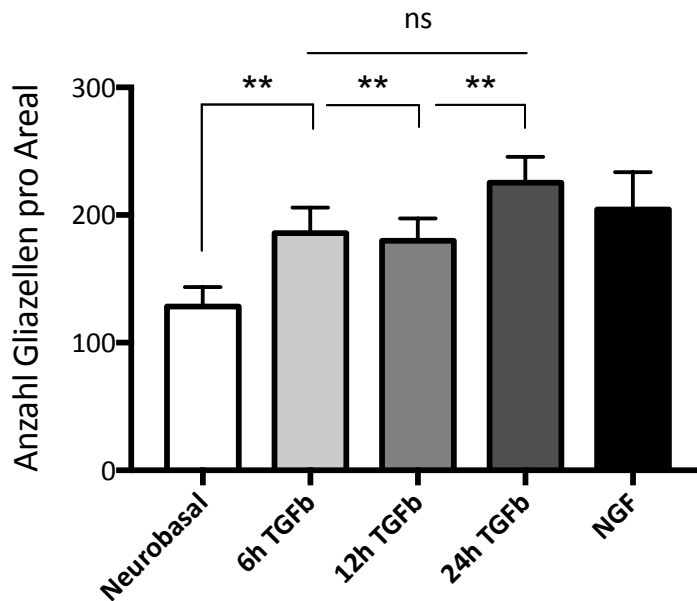
Abbildung 4: Neuroplastizitätsassay mit 6h, 12h und 24h TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellüberständen. A) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen. Die waagrechten

Spalten zeigen die unterschiedlichen Behandlungen der DRG mit NB (Neurobasal/Negativkontrolle), Überständen von 6h, 12h und 24h TGF- $\beta$ -stimulierten rPSC und NGF (nerve growth factor/Positivkontrolle). Senkrecht erste Spalte: Immunfluoreszenzfärbung mit  $\beta$ -III Tubulin (■ grün, Neuriten), mittlere Spalte: GFAP (■ rot, Gliazellen), rechte Spalte: „overlay“-Aufnahme von  $\beta$ -III Tubulin, GFAP und zusätzlicher Kernfärbung mit DAPI (■ blau), die Maßstabsskala zeigt 100 $\mu$ m. **B)** Auswertung der Neuritendichte: Es zeigt sich eine statistisch signifikante (\*\*\*) Zunahme der Neuriten nach Behandlung durch die rPSC-Überstände im Vergleich zur unbehandelten Probe mit Neurobasalmedium (NB vs. 6h  $p=0,0028$ , NB vs. 12h  $p=0,0001$ , NB vs. 24h  $p<0,0001$ , Mann-Whitney U Test). Innerhalb der verschiedenen Stimulationszeiten zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns = nicht signifikant). **C)** Auswertung der Neuritendichte nach Behandlung von mit 12h bzw. 24h mit (+) oder ohne (-) TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der Neuritendichte durch die Stimulation der Sternzellen mit TGF- $\beta$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle im Zeitintervall 12h bzw. 24h ( $p=0,0432$  bzw.  $p=0,0305$ ; unpaired t-Test).

## 2.2 Analyse der Gliazell-dichte von Dorsal Root Ganglia unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen

Ein möglichen Einfluss der Sternzellen auf das Wachstum von Gliazellen wurde ebenfalls im Neuroplastizitätsassay untersucht. Hierfür konnte der bereits im vorhergehenden Abschnitt präsentierte Assay hinsichtlich der Gliazell-dichte ausgewertet werden. Die Anzahl der Gliazellen pro Fläche/Bild wurde durch die Subtraktion der Nervenzellkörper von der Gesamtzellzahl errechnet. Die Gesamtzellzahl wurde auf Immunfluoreszenzfärbungen mit DAPI-Kernfärbung ausgezählt. Die Neuronenanzahl wurde auf  $\beta$ -III Tubulin gefärbten Immunfluoreszenzaufnahmen ermittelt (Abbildung 4A, erste senkrechte Spalte). Der Wert wird als Anzahl der Gliazellen pro Fläche bzw. Bild angegeben.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Gliazell-dichte nach Behandlung der DRG durch die Überstände der für 6h, 12h und 24h TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle (6h:  $185,8\pm 19,92$ ,  $p=0,0012$ ; 12h:  $179,9\pm 17,39$ ,  $p=0,0004$ ; 24h:  $225,3\pm 20,37$ ,  $p<0,0001$  vs. Neurobasal/Negativkontrolle  $128,4\pm 15,21$  Zellen pro Areal; Mann-Whitney U Test). Analog zu der Neuritendichte zeigte sich keine Signifikanz unter den verschiedenen TGF- $\beta$ -Stimulationszeiten. Auch in diesem Versuch fiel eine über dem Wert der Positivkontrolle liegende Gliazell-dichte nach der Behandlung mit der 24h TGF- $\beta$  stimulierten Probe auf (NGF:  $204,4\pm 29,3$  vs. 24h:  $225,3\pm 20,37$  Zellen pro Areal), welche sich jedoch ebenfalls nicht als signifikant erwies (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Auswertung des Neuroplastizitätsassays mit 6h, 12h und 24h TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellen hinsichtlich der Gliazellichte.** Es zeigt sich eine statistisch signifikante (\*\*) Zunahme der Gliazellendichte pro Areal/Bild nach Behandlung durch die rPSC-Überstände im Vergleich zur unbehandelten Probe mit Neurobasalmedium (NB vs. 6h  $p=0,0012$ , NB vs. 12h  $p=0,0004$ , NB vs. 24h  $p<0,0001$ , Mann-Whitney U Test). Innerhalb der verschiedenen Stimulationszeiten zeigt sich kein signifikanter Unterschied (ns = nicht signifikant) der Gliazellichte.

### 2.3 Analyse der Neuriten- und Gliazellichte von *Dorsal Root Ganglia* unter dem Einfluss von hypoxischen Sternzellen

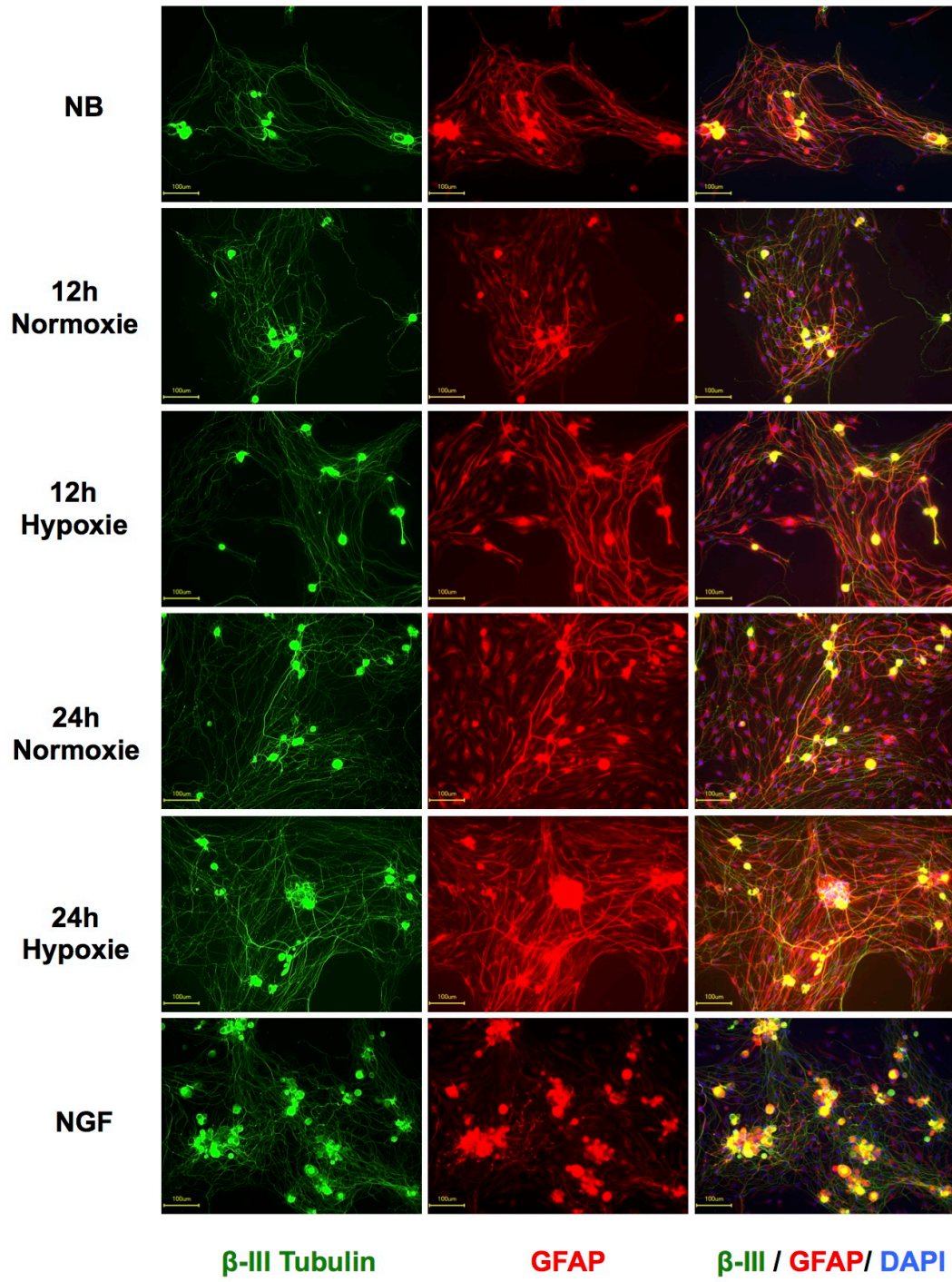
Die Sternzellen sind im Pankreaskarzinom durchgehend hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Um die Frage zu beantworten, ob dieses besondere Milieu die Interaktion der Stern- und Nervenzellen beeinflusst, wurden die Sternzellen zunächst 12h und 24h hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellüberstände (konditioniertes Medium) für die Behandlung der DRG im Neuroplastizitätsassay verwendet. Zum direkten Vergleich wurden die DRG ebenfalls mit Zellüberständen von 12h und 24h unter normoxischen Bedingungen kultivierten Sternzellen behandelt. Als Negativ-, bzw. Positivkontrollen dienten erneut unbehandelte (mit Neurobasalmedium) bzw. mit NGF behandelte DRG. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem bereits erwähnten Neuroplastizitätsassay (schematischer Aufbau des Versuches: Abbildung 1). Es erfolgte eine Analyse sowohl der Neuritendichte, als auch der Gliazellichte.

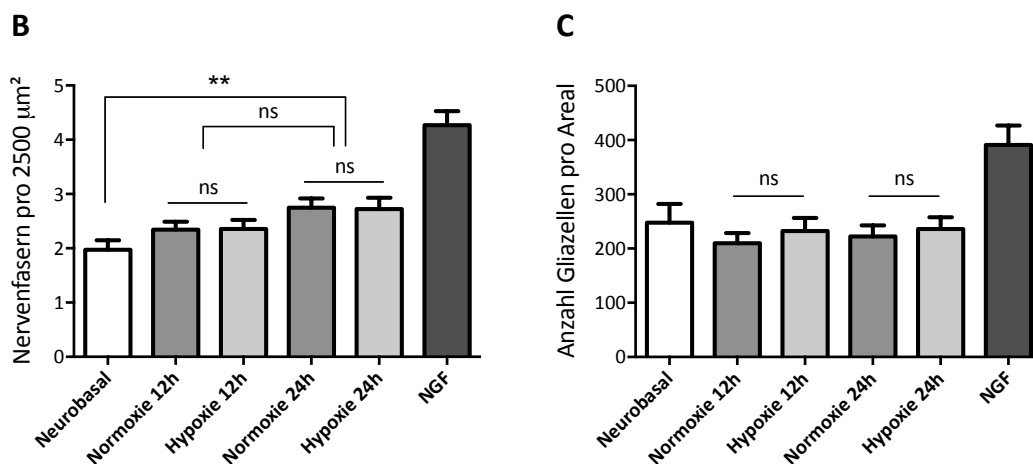
Interessanterweise zeigten die Zellüberstände der hypoxischen Sternzellen keinen

relevanten Einfluss auf die Neuritendichte der DRG im Vergleich zu Zellüberständen von unter normoxischen Bedingungen kultivierter Sternzellen. Sowohl nach 12h (Normoxie:  $2,344 \pm 0,1456$  vs. Hypoxie  $2,356 \pm 0,1682$  Nervenfasern pro  $2500 \mu\text{m}^2$ ) als auch nach 24h (Normoxie  $2,748 \pm 0,1711$  vs. Hypoxie  $2,721 \pm 0,2094$  Nervenfasern pro  $2500 \mu\text{m}^2$ ) war kein signifikanter Unterschied durch die kultivierenden Bedingungen zu erfassen. Eine verlängerte Behandlung und Kollektion des konditionierten Mediums der rPSC führte unabhängig des Sauerstoffgehaltes zu einer Zunahme der Neuriten (Neuritendichte nach 24h Hypoxie oder Normoxie > Neuritendichte nach 12h Hypoxie oder Normoxie). Jedoch ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen. Die Behandlung der rPSC für 24h (sowohl unter normoxischen und auch hypoxischen Bedingungen) ergab eine signifikante Zunahme der Neuriten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollprobe (24h Hypoxie  $2,721 \pm 0,2094$  bzw. 24h Normoxie  $2,748 \pm 0,1711$  vs. Neurobasalmedium/unbehandelte Probe  $1,975 \pm 0,1748$  Nervenfasern pro  $2500 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0,0076$  bzw.  $p=0,0013$ , Mann-Whitney U Test, Abbildung 6 A+B). Hinsichtlich der Gliazelldichte konnte gezeigt werden, dass weder hypoxische noch normoxische Bedingungen der rPSC zu einer relevanten Veränderung der Zelldichte führen. Auch zeigte sich keine Zunahme der Gliazelldichte durch eine verlängerte Gesamtbehandlungsdauer der rPSC (Neurobasal:  $247,5 \pm 34,8$ ; 12h Normoxie:  $209,9 \pm 18,77$ ; 12h Hypoxie:  $232,4 \pm 24,15$ ; Normoxie 24h:  $222,3 \pm 20,5$ ; 24h Hypoxie:  $236 \pm 21,85$ ; NGF:  $391,2 \pm 35,47$  Gliazellen pro Areal; Abbildung 6 A+C)



**A**





**Abbildung 6: Neuroplastizitätsassay mit 12h bzw. 24h hypoxisch und normoxisch kultivierten rPSC:** **A)** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen. Die waagrechten Spalten zeigen die unterschiedlichen Behandlungen der DRG mit NB (Neurobasal/Negativkontrolle), Überständen von 12h Normoxie, 12h Hypoxie, 24h Normoxie und 24h Hypoxie ausgesetzten rPSC und NGF (nerve growth factor/Positivkontrolle). Senkrecht erste Spalte: Immunfluoreszenzfärbung mit  $\beta$ -III Tubulin (■ grün, Neuriten), mittlere Spalte: GFAP (■ rot, Gliazellen), rechte Spalte: „overlay“-Aufnahme von  $\beta$ -III Tubulin, GFAP und zusätzlicher Kernfärbung mit DAPI (■ blau), die Maßstabsskala zeigt 100µm. **B)** Auswertung der Neuritendichte: Es zeigen sich keine Unterschiede (ns=nicht signifikant) zwischen den Kultivierungsbedingungen (Normoxie vs. Hypoxie bei 12h und 24h). Eine Behandlung der rPSC für 24h (normoxisch oder hypoxisch) führt zu einer nicht signifikanten Zunahme der Neuritendichte im Vergleich zu 12h (24h: Normoxie  $2,748 \pm 0,1711$  und Hypoxie  $2,721 \pm 0,2094$  vs. 12h: Normoxie  $2,344 \pm 0,1456$  und Hypoxie  $2,356 \pm 0,1682$  Nervenfasern pro  $2500\mu\text{m}^2$ ). Nach 24h Behandlung (Normoxie und Hypoxie) zeigt sich eine signifikante Zunahme der Neuritendichte im Vergleich zu der unbehandelten Neurobasalprobe (NB:  $1,975 \pm 0,1748$  Nervenfasern pro  $2500\mu\text{m}^2$ ,  $p=0,0013$  (24h Normoxie) und  $p=0,0076$  (24h Hypoxie), Mann-Whitney U Test). (\*\*= $p < 0,05$ ) **C)** Auswertung der Gliazellendichte: Es ergeben sich keine nachweisbaren Unterschiede der Gliazellendichte sowohl zwischen den Kultivierungsbedingungen als auch hinsichtlich der Kultivierungszeit (12h und 24h).

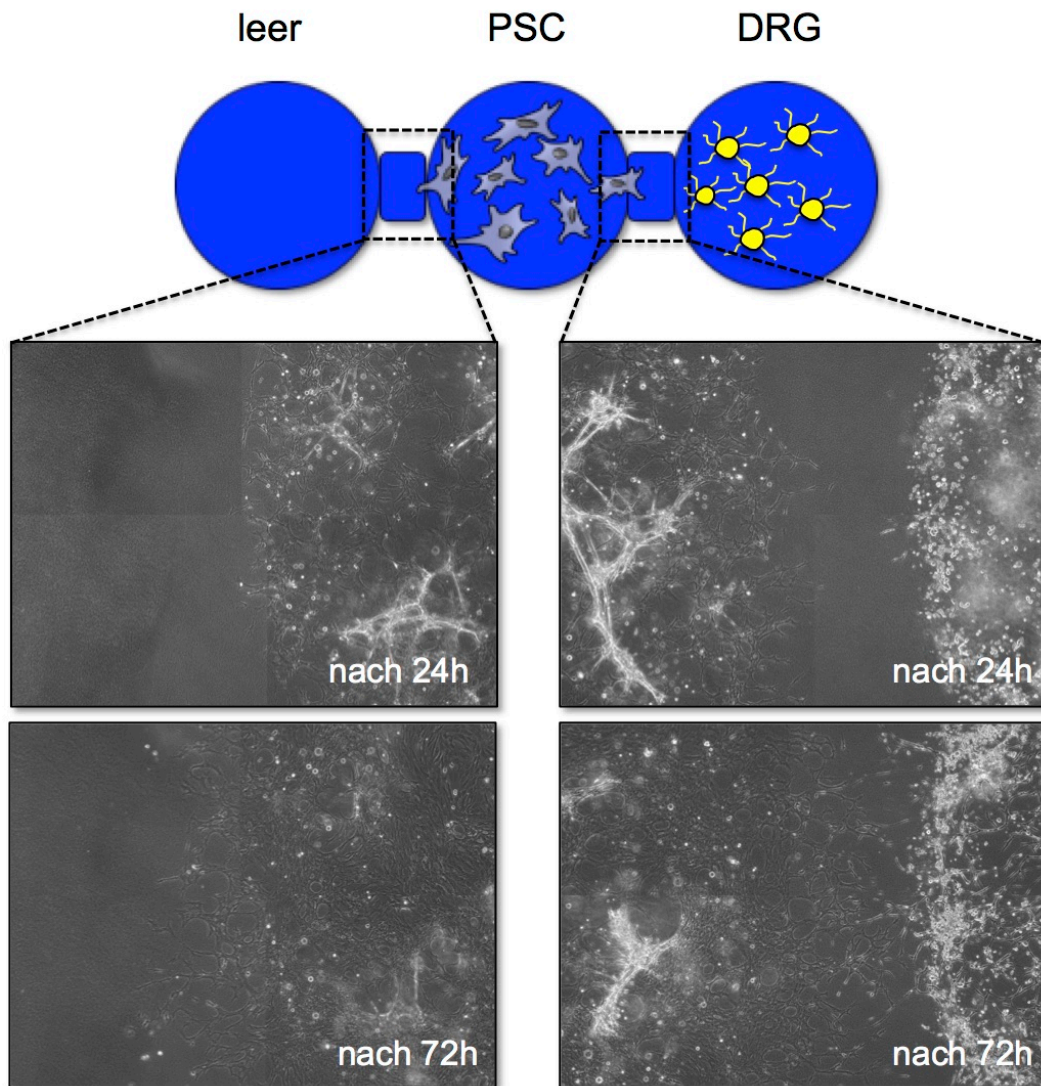
### 3 Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit von Sternzellen

#### 3.1 Einfluss von Dorsal Root Ganglia auf die Migration der Sternzellen

Nachdem wir einen relevanten und nachweisbaren Einfluss der Sternzellen auf die Ausbildung der Neuriten von Nervenzellen im Neuroplastizitätsassay nachweisen konnten, wurde in einem in unserer Arbeitsgruppe entwickeltem Migrationassay ein möglicher Einfluss der Nervenzellen auf die Migrationseigenschaften der Sternzellen untersucht. Hierfür wurden die isolierten Sternzellen (rPSC) im 3D-Migrationassay mit primär isolierten DRG konfrontiert (Versuchsaufbau siehe Abbildung 6). Als Negativ- und Migrationskontrolle diente ein ohne Zellen

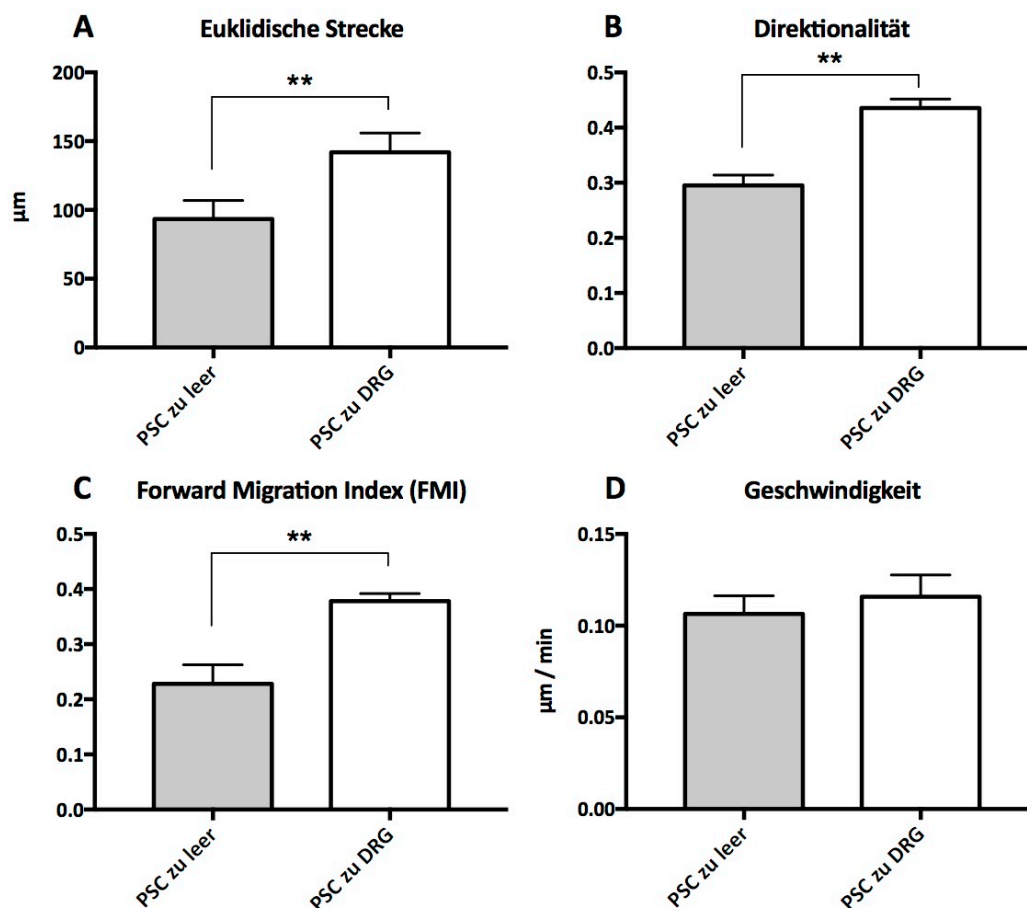
pipetierter Böpsel aus ECM-Gel. Die beiden Migrationsfronten wurde 24h nach Beginn des Versuches für 48h (alle 15min) fotografiert.

Die Sternzellen legten während der Migration in Richtung der DRG eine größere euklidische Strecke im Vergleich mit der leeren Kontrollseite zurück ( $141,9 \pm 14,06 \mu\text{m}$  zu  $93,42 \pm 13,51 \mu\text{m}$ ,  $p=0,0317$ , Mann-Whitney U Test, siehe Abbildung 7A). Als euklidische Distanz wird die Nettostrecke von Start- bis Endpunkt jeder migrierender Zelle definiert. Ebenso zeigten die Sternzellen eine signifikant erhöhte Direktionalität in ihrer Migration. Die Migration war somit in Richtung der plazierten DRG im Vergleich zur leeren Kontrollseite direkter abgelaufen ( $0,4358 \pm 0,016$  zu  $0,2952 \pm 0,01889$ ,  $p=0,0079$ , Mann-Whitney U Test, siehe Abbildung 7B). Berechnet wird die Direktionalität als Quotient aus euklidischer zur akkumulierten (gesamten zurückgelegten) Distanz und besitzt somit keine Einheit. Auch zeigten die Sternzellen einen signifikant erhöhten Forward Migration Index (FMI) in ihrer Migration hin zu den DRG im Vergleich zur leeren Kontrollseite ( $0,378 \pm 0,01377$  zu  $0,2282 \pm 0,0343$ ,  $p=0,0079$ , Mann-Whitney U Test, Abbildung 7C). Der FMI beschreibt wie zielgerichtet eine Migration stattfindet und wird über die zurückgelegte Strecke und den tatsächlichen Endpunkt berechnet. Hinsichtlich der Geschwindigkeit der Migration zeigte sich kein Unterschied an beiden Fronten (Leere Front:  $0,1064 \pm 0,009872 \mu\text{m}/\text{min}$ ; DRG-Front:  $0,1158 \pm 0,01191 \mu\text{m}/\text{min}$ , Abbildung 7D).



**Abbildung 7: Versuchsaufbau Migrationassay mit rPSC und DRG, sowie exemplarische Bilder bei Beginn (nach 24h) und Ende des Versuchs (nach 72h):** Die linken beiden Bilder zeigen die Migrationsfront der rPSC in Richtung des leeren Kontrollböpsel nach 24h bzw. 72h. Auf den beiden Bildern der rechten Seite wird die Migrationsfront in Richtung der DRG nach 24h bzw. 72h gezeigt. Es lässt sich bereits hier (ohne spezielle Auswertung) eine verstärkte Migration in Richtung der DRG im Vergleich zum leeren Böpsel nach 72h erkennen.





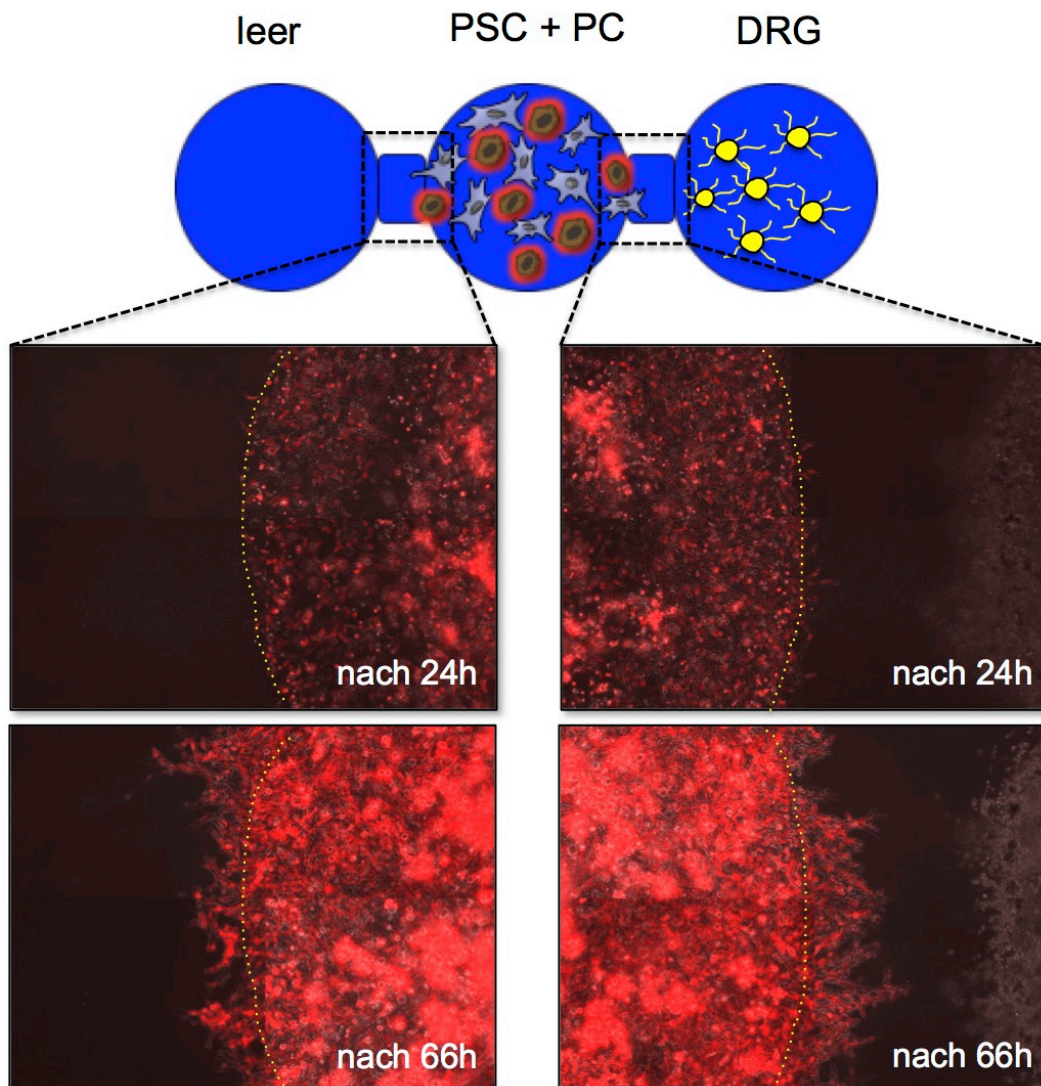
**Abbildung 8: Auswertung des Migrationassays der PSC mit Konfrontation von DRG und leerem ECM-Gel Böpsel hinsichtlich verschiedener Charakteristika der Migration. A) Euklidische Strecke :** Die zurückgelegte euklidische Strecke der PSC ist in Richtung der DRG im Vergleich zur leeren Kontrollseite signifikant erhöht ( $p=0,0317$ ). **B) Direktionalität:** Die PSC zeigen in Richtung der DRG eine signifikant erhöhte Direktionalität ( $p=0,0079$ ). **C) Forward Migration Index (FMI):** Ebenfalls lässt sich ein erhöhter Forward Migration Index statistisch signifikant nachweisen ( $p=0,0079$ ). **D) Geschwindigkeit:** Hinsichtlich der Wanderungsgeschwindigkeit zeigen die beiden Migrationsfronten keinen Unterschied. Alle Wahrscheinlichkeiten wurde mit dem Mann-Whitney U Test berechnet (\*\*= $p<0,05$ ).

### 3.2 Einfluss von Dorsal Root Ganglia auf die Migration der Sternzellen in Abhängigkeit von Pankreaskarzinomzellen

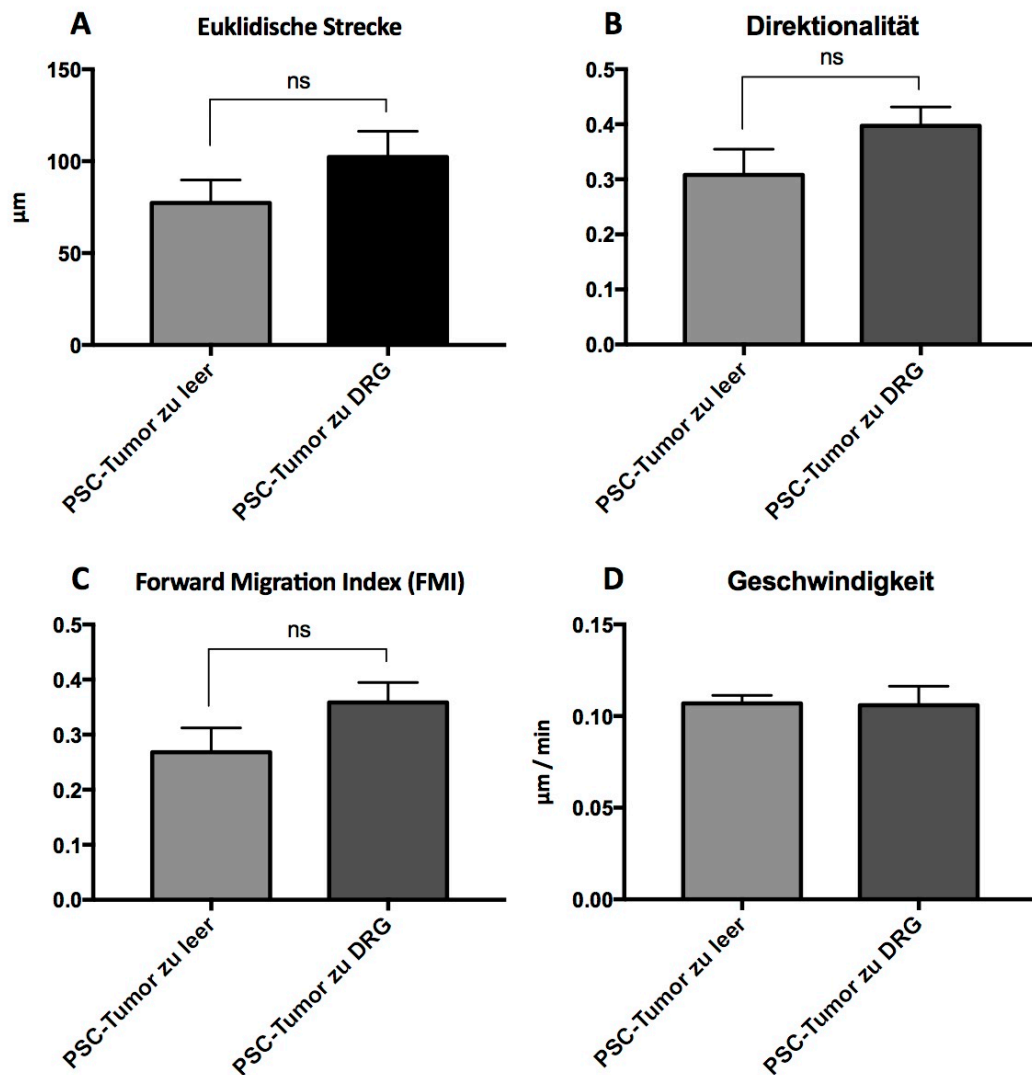
Auf der Grundlage der gewonnenen Ergebnisse und dem somit nachgewiesenem positiven Einfluss der Nervenzellen auf die Migrationsfähigkeit der Sternzellen, versuchten wir in einem weiteren Migrationassay die Bedingungen im Pankreaskarzinom zu imitieren. Hierfür wurden die Sternzellen mit Pankreaskarzinomzellen (Panc2-Cherry) im Verhältnis 50:50 vermischt und zusammen im mittleren Böpsel des Migrationassays plaziert. Konfrontiert wurde die Mischzellpopulation ebenfalls mit DRG und einem leeren Kontroll-Böpsel aus ECM-Gel (Versuchsaufbau siehe Abbildung 8). Die beiden Migrationsfronten

wurden 24h nach Beginn des Versuchs für 42h (alle 15min) fotografiert. Da die Tumorzellen einen fluoreszierenden Farbstoff besitzen, wurden alle Bilder mit einem Lichtmikroskop unter Durchlichtbedingungen und unter Fluoreszenz aufgenommen. Durch die beiden Aufnahmen war später eine exakte Auswertung der beiden unterschiedlichen Zellpopulationen möglich. In unserem Versuch wurden alle nicht fluoreszierenden Zellen als PSC gewertet und 30 Zellen pro Front für die Analyse ausgewertet. Die PSC der Tumor-/Sternzellmischpopulation werden in den weiteren Ausführungen als PSC-Tumor bezeichnet.

Die PSC-Tumor zeigten eine größere zurückgelegte euklidische Strecke in Richtung der konfrontierten DRG im Vergleich zur Kontrollfront. Die Ergebnisse stellten sich jedoch nur als Tendenz dar und waren nicht signifikant ( $102,3 \pm 14,07 \mu\text{m}$  zu DRG vs.  $77,363 \pm 12,5 \mu\text{m}$  zu leerem Gel, Abbildung 9A). Ebenso verhielt es sich in der Auswertung der Direktionalität und des FMI. Es zeigte sich eine erhöhte Direktionalität ( $0,3974 \pm 0,03421$  zu DRG vs.  $0,308 \pm 0,0466$  zu leerem Gel, Abbildung 9B), sowie ein deutlich erhöhter FMI ( $0,3586 \pm 0,03627$  zu DRG vs.  $0,2682 \pm 0,04396$  zu leerem Gel, Abbildung 9C) der Migration in Richtung der DRG. Beide Ergebnisse waren jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant (Mann-Whitney U Test). Die Migrationsgeschwindigkeit beider Migrationsfronten war nahezu gleich ( $0,106 \pm 0,01037 \mu\text{m}/\text{min}$  zu DRG vs.  $0,107 \pm 0,004359 \mu\text{m}/\text{min}$  zu leerem Gel, Abbildung 9D).



**Abbildung 9: Versuchsaufbau Migrationassay mit Mischzellpopulation aus rPSC und fluoreszierenden Panc2-Cherry Pankreaskarzinomzellen (PC) in Konfrontation mit DRG und leerem ECM-Gel, sowie exemplarische Bilder bei Beginn (nach 24h) und Ende des Versuchs (nach 66h):** Oben wird der Versuchsaufbau mit den beiden Zellpopulationen rPSC mit Panc2-Cherry (Verhältnis 50:50) und DRG gezeigt. Unten zeigen die Bilder exemplarisch die Migrationsfront der Mischpopulation in Fluoreszenzaufnahme. Rot fluoreszierend die Panc2-Cherry, schwach dazwischen die rPSC (nicht fluoreszierend) nach 24h bzw. 66h. Links: Migrationsfront in Richtung des leeren ECM-Gels. Rechts: Migration in Richtung der DRG.



**Abbildung 10: Auswertung Migrationassays der rPSC (PSC-Tumor) aus der Mischpopulation (rPSC:Panc2-Cherry 50:50) mit Konfrontation von DRG und leerem ECM-Gel Böpsel hinsichtlich verschiedener Charakteristika der Migration. A) Euklidische Strecke:** Die zurückgelegte euklidische Strecke der PSC-Tumor ist in Richtung der DRG im Vergleich zur leeren Kontrollseite erhöht, jedoch ohne Signifikanz (ns=nicht signifikant, Mann-Whitney U Test). **B) Direktionalität:** Die PSC zeigen in Richtung der DRG eine erhöhte Direktionalität ohne statistische Signifikanz. **C) Forward Migration Index (FMI):** Ebenfalls lässt sich ein erhöhter, jedoch nicht signifikanter Forward Migration Index nachweisen. **D) Geschwindigkeit:** Hinsichtlich der Wanderungsgeschwindigkeit zeigen die beiden Migrationsfronten keinen Unterschied.

## IV DISKUSSION

Die Tumor-Nerv-Interaktionen im Pankreaskarzinom haben in den letzten Jahren verstärkt das Interesse der Forschung geweckt, da das Wachstum der Tumorzellen in und entlang der Nervenzellen als ein entscheidender Faktor für das hohe Auftreten eines Lokalrezidives nach einer vollständigen Tumorresektion angesehen wird (Zhang et al., 2013). Bis zu 100% der Tumore zeigen eine neurale Invasion. Dies unterscheidet das Pankreaskarzinom von anderen Tumorentitäten und stellt gleichsam einen Grund für die schlechte Prognose des Karzinoms dar (Liu and Lu, 2002). Neben einer neuralen Invasion von Tumorzellen zeigten sich mehrere neuroplastische Veränderungen im Pankreaskarzinom: eine Hypertropie der Nerven, eine erhöhte neuronale Dichte und ein Befall der Nerven mit inflammatorischen Zellen (Neuritis) (Ceyhan et al., 2009a). Diese Erkenntnisse zeigten sich nach immunhistochemischer Analyse des Pankreasgewebes von Patienten mit einem Karzinom. Auch in vitro Untersuchungen konnten Veränderungen der Nervenzellen durch den Einfluss von Karzinomzellen nachweisen (Ceyhan et al., 2010). Hierfür wurden *dorsal root ganglia* und myenterische Plexuszellen - isoliert aus neugeborenen Ratten - sowohl mit Tumorzellüberständen, als auch mit Tumorgewebeextrakten behandelt. Hier zeigte sich eine erhöhte Neuritendichte nach erfolgter Behandlung. Es konnten nerve growth factor (NGF) und Artemin als zwei neurotrophe Faktoren identifiziert werden, welche hierbei eine Rolle spielen. Beide Faktoren sind im Pankreaskarzinom hochreguliert (Ceyhan et al., 2006; Zhu et al., 2002). In einer wegweisenden Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe konnte ein direkter Zusammenhang der neuralen Invasion mit dem Grad der Desmoplasie im Pankreaskarzinom gezeigt werden (Ceyhan et al., 2009a). Aus diesem Grund haben wir in dieser Arbeit die stromaproduzierenden Sternzellen und ihren Einfluss auf die Tumor-Nerv-Interaktion untersucht. Bereits 2007 konnte Artemin in humanen Sternzellen, welche aus Patienten mit einer chronischen Pankreatitis isoliert wurden, nachgewiesen werden (Ceyhan et al., 2007). Jedoch wurde für die Isolation der Sternzellen die sogenannte „outgrowth“-Methode verwendet. Hierfür wird ein Pankreasgewebestück in einer Petrischale fixiert und mit Medium bedeckt. Alle überlebenden Zellen, die aus dem Gewebe herauswachsen, was Tage bis Wochen dauern kann, werden als Sternzellen klassifiziert. Letztendlich handelt es sich hier um eine Isolationsmethode, die zu keiner homogenen Zellpopulation führt. Neben Sternzellen, welche in diesem Modell zwangsläufig als aktivierte Sternellen

angesehen werden müssen, finden sich in der Zellpopulation weitere Fibroblasten. Mit der in unserer Arbeit verwendeten Isolationsmethode unter Zuhilfenahme eines Nycodenz-Gradienten lässt sich eine qualitativ hochwertige Zellpopulation isolieren. Wir konnten in diesen Zellen erstmalig Artein und den weiteren neurotrophen Faktor Neurturin mittels Immunfluoreszenzfärbung nachweisen. In bisher noch nicht veröffentlichten Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe, welche Teil einer weiteren Dissertation sind, konnten diese beiden Faktoren ebenfalls mittels Westernblot und qPCR nachgewiesen werden (Dischl, 2017). Hierdurch bestätigte sich weiter die Annahme eines neurotrophen Potenzials der Sternzellen. Neurturin ist im Pankreaskarzinom neben den Nerven und den Tumorzellen auch im umgebenden Stroma hochreguliert (Wang et al., 2014). Wir können somit erstmalig den direkten Nachweis von Neurturin und Artein spezifisch in Sternzellen nachweisen. Die ausführlichen Expressionsanalysen finden sich in der bereits angesprochenen weiteren Dissertation.

Eine faszinierende Eigenschaft der Sternzelle ist ihre Fähigkeit der Veränderung von einer ruhenden Zelle hin zu einer aktivierten matrixproduzierenden Zelle. Die Aktivierung kann durch unterschiedlichste Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ 1, PDGF), Signalstoffe (Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1, IL6 und IL8) oder Milieueigenschaften (oxidativer Stress, Kontakt zu anderen Zellen) erfolgen (Erkan et al., 2012). Ebenso ist eine autokrine Aktivierung durch die Sternzellen selbst möglich (Masamune and Shimosegawa, 2009). Bereits der Kontakt mit einer Petrischale nach Isolation der PSC führt innerhalb von wenigen Tagen zu einer Aktivierung der Zellen, was die Möglichkeiten von zellbiologischen Analysen von inaktivierten Sternzellen stark begrenzt. Inaktivierte Sternzellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren scheint nach unseren Erfahrungen nicht möglich. So zeigen sich bereits 48h nach primärer Isolation der Zellen starke morphologische Veränderungen. In wieweit sich diese unvermeidbare Aktivierung auf die Expression von neurotrophen Faktoren der Zelle auswirkt, ist bisher noch nicht umfassend untersucht worden.

Haas et al. konnten 2009 mittels PCR, Westernblot und Immunfloreszenz zeigen, dass Sternzellen nach einer Stimulation mit TGF- $\beta$  eine vermehrte Expression des nervalen Wachstumsfaktors NGF aufweisen. Die Versuche wurden mit immortalisierten humanen Sternzellen (ihPSC) und primär isolierten Sternzellen (prPSC) aus Ratten durchgeführt. Es zeigte sich eine stimulationsabhängige Expressionszunahme des NGF nach 1h, 6h und 24h Stimulation mit TGF- $\beta$  in beiden Zelllinien. Eine vermehrte Expression durch eine alleinige Kultivierung ließ

sich nur bei prPSC nach 3, 5 und 7 Tagen nachweisen. Die immortalisierten humanen Sternzellen zeigten ohne Stimulation keine vermehrte Expression von NGF (Haas et al., 2009). Unter der Annahme, einen Effekt in Abhängigkeit des Aktivierungszustandes der Sternzellen nachweisen zu können, wurde unsere Sternzellen für die Versuche für 6h, 12h und 24h mit TGF- $\beta$  stimuliert. Morphologisch konnten wir durch eine Stimulation für 24h keine Veränderung mehr nachweisen. Jedoch führten wir die Stimulation ca. 4 Tage nach primärer Isolation durch, jenachdem wann die Zellen in unserem Versuchsaufbau eine 70%ige Konfluenz erreicht hatten. Um einen möglichen Einfluss einer Stimulation auf die Expressionseigenschaften der Sternzellen deutlicher zu machen, wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzfärbungen drei mal hintereinander für 24h mit TGF- $\beta$  behandelt. Qualitativ ließ sich hier nach der Stimulation eine erhöhte Expression von Neurturin und Artemin nachweisen. Der initiale Nachweis von Neurturin und Artemin mittels qPCR und Westernblotanalyse wurde mit einer Stimulation von 6h, 12h und 24h durchgeführt. Hier zeigte sich eine quantitative Zunahme der Expression in Abhängigkeit der Zeit, sodass für die weiteren Versuche diese Stimulationszeiten beibehalten wurden.

Ein wesentlicher Nachteil eines Proteinnachweises mittels Immunfluoreszenz oder Westernblot und einer Expressionsanalyse mittels qPCR ist die Tatsache, dass hierdurch nur eine Produktion des Stoffes nachgewiesen werden, jedoch keine Aussage über die Sekretion und eine Wirkung auf die umliegenden Zellen gemacht werden kann.

Um diesen direkten Nachweis einer Beeinflussung der Nervenzellen zu erlangen, wurden DRG direkt mit den Zellüberständen zuvor stimulierter Sternzellen behandelt. Nach Auswertung zeigte sich eine deutliche und signifikante Zunahme der Neuritendichte durch die Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Hieraus lässt sich ableiten, dass Sternzellen wirksame Faktoren in ihre Umgebung sezernieren, die einen wachstumsfördernden Effekt auf Nervenzellen ausüben. Einen Einfluss der unterschiedlichen Stimulationszeiten (6h, 12h oder 24h TGF- $\beta$ ) der Sternzellen vor dem Start des Assays konnte jedoch nicht gezeigt werden. Auf Grund dieser Erkenntnis müssen sich nun mehrere Fragen gestellt werden. Läuft die Sekretion neurotropher Faktoren in die Umgebung der Sternzellen unabhängig von der Aktivierung bzw. der Stimulation ab? Letztendlich konnte bisher nur gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren exprimiert und gebildet werden. In vitro-Versuche, die eine Wirkung dieser

untersucht haben, wurden noch nicht durchgeführt. Weiter muss gemutmaßt werden, dass die Sternzellen bereits 6h nach einer Behandlung mit TGF- $\beta$  so aktiviert sind, dass keine weitere Zunahme der Sekretion von neurotrophen Faktoren bewirkt werden kann. Für die Beantwortung der ersten Frage wurden die DRG mit nicht stimulierten rPSC-Überständen (12h und 24h) behandelt (siehe Abbildung 4C). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Neuritenzunahme nach Behandlung mit einer stimulierten Sternzellprobe im Vergleich zu unstimulierten Probe, sodass hiermit von einer abhängigen bzw. vermehrten Sekretion durch die TGF- $\beta$  Stimulation ausgegangen werden kann. Warum jedoch die Sekretion nicht im gleichen Maß wie die Expression der Faktoren ansteigt, kann noch nicht abschließend geklärt werden. Hierfür werden noch ergänzende Untersuchungen, wie zum Beispiel eine Analyse des Sekretoms, also aller löslichen Proteine, die von einer Zelle in den Extrazellulärraum sezerniert werden, benötigt. Für die ausführliche Expressionsanalyse neurotropher Faktoren der Sternzellen verweisen wir auf eine weitere Dissertation aus unserer Arbeitsgruppe (Dischl, 2017). Eine mögliche Erklärung ist auch ein Abbau bzw. eine Inaktivierung von TGF- $\beta$  im Zellmedium über einen längeren Zeitraum. Somit würde eine längere Stimulationszeit auch keinen größeren Einfluss auf die Sternzellen bewirken können. Vielleicht sind jedoch auch bereits nach 6h alle Rezeptoren mit TGF- $\beta$  besetzt und somit aktiviert, dass eine längere Behandlung hier keine Veränderung bewirken kann.

Die Aktivierung der Sternzellen stellt einen komplexen Mechanismus dar. Die im Pankreaskarzinom bestehenden hypoxischen Bedingungen werden ebenfalls als ein Triggerfaktor für die Aktivierung der Sternzellen angesehen (Masamune and Shimosegawa, 2009). Unter hypoxischen Bedingungen exprimieren die Sternzellen vermehrt  $\alpha$ -SMA, was als ein Aktivierungsmerkmal angesehen werden kann. Ebenfalls werden vermehrt extrazelluläre Matrixproteine wie Periostin, Typ I Kollagen und Fibronectin sezerniert (Erkan et al., 2009), sodass wir unter diesen Bedingungen ebenso eine vermehrte Freisetzung von neurotrophen Faktoren vermuteten. Interessanterweise zeigte sich jedoch in unserem Neuroplatizitätsassay kein Unterschied in der Neuritendichte der DRG nach einer Behandlung mit hypoxischen oder normoxischen Sternzellüberständen. Sowohl nach 12h, als auch nach 24h war kein messbarer Effekt durch die hypoxische Behandlung der PSC auf die Neuronen detektierbar. Jedoch zeigte sich, dass eine Behandlung der DRG mit für 24h angesammelten Sternzellüberständen eine signifikante Zunahme der



Neuritendichte bewirkte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 5C). Nach 12h Behandlung zeigte sich dieser Effekt noch nicht. Dies lässt sich durch eine vermehrte Sekretion neurotropher Faktoren unabhängig von einem hypoxischen Milieu, allein durch das verlängerte Zeitintervall interpretieren. Die Hypoxie scheint somit keinen modulierenden Effekt über die Sternzellen auf die Nervenzellen zu haben. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass nicht eindeutig zu analysieren ist, in wieweit die Sternzellen vor dem Herstellen der hypoxischen Umgebung bereits aktiviert waren. Für die Versuche wurden Zellen in der ersten Passage verwendet, um eine mögliche mechanische Aktivierung durch das Zellsplitting zu vermeiden. Eine andere Arbeitsgruppe, welche ebenfalls Sternzellen unter hypoxischen Bedingungen hinsichtlich ihrer Beeinflussung von Karzinomzellen untersuchte, verwendete die Zellen in den Passagen 2 bis 4 (Eguchi et al., 2013). Nach 24h unter hypoxischen Bedingungen konnte eine erhöhte Expression von *connective tissue growth factor* (CTGF) nachgewiesen werden. Dieser Nachweis zeigt, dass auch nach längerer Zeit und in bereits passagierten Zellen durch hypoxische Bedingungen eine Veränderung im Zellstoffwechsel prinzipiell erreicht werden kann. Unsere Stimulation mit Hypoxie hatte keinen Einfluss auf die Neuroplastizität der Nervenzellen, sodass wir glauben, dass die Interaktion von Stern- und Nervenzellen nicht durch dieses besondere Milieu beeinflusst wird.

Hypoxie im Pankreaskarzinom entsteht zu einem Teil durch die massive Produktion extrazellulärer Matrixproteine und dem hierdurch erhöhten Gewebedruck. Somit kommt dem hypoxischen Milieu nicht am Beginn der Tumorentstehung, sondern erst im weiteren Verlauf - bei fortschreitender Gewebeveränderung - die größte Bedeutung zu. Letztlich ist die Rolle der Sternzellen noch nicht ausreichend geklärt, jedoch spielt die Aktivierung der Sternzellen eher in einem frühen Stadium der Tumorgenese eine Rolle. Möglicherweise entfalten die Sternzellen erst im weiteren Verlauf ihr komplettes neurotrophes Potenzial. Dies wäre eine alternative Erklärungsmöglichkeit, warum in unserem Versuchsaufbau kein Effekt der Hypoxie nachzuweisen war.

Neben den Neuronen beinhalten die für unsere Versuche isolierten DRG weitere Zellarten wie Satelliten (Glia-) Zellen, Schwannzellen und Fibroblasten (Ng et al., 2010). Diese werden in der Aufarbeitung der DRG mit isoliert. In den letzten Jahren haben die peripheren Gliazellen in Bezug auf die neurale Invasion von Tumorzellen an Bedeutung gewonnen. Eine neue Untersuchung konnte zeigen, dass womöglich

in einem nicht invasiven Stadium bereits Schwannzellen eine Affinität hin zu den Tumorzellen besitzen und somit die Invasivität der Tumorzellen erst initiieren oder weiter vorantreiben (Demir et al., 2014). Die Aktivierung der Sternzellen, welche vermutlich ebenfalls einen frühen Schritt in der Tumorgenese darstellt, könnte somit in der Schwannzell-Tumorbeziehung eine weitere Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeit auch der Einfluss der Sternzellen auf die Gliazellen untersucht. Als Gliazellen werden alle Zellen - mit Ausnahme der Neuronen - zusammengefasst, welche sich aus den DRG isolieren lassen. Interessanterweise zeigte sich eine erhöhte Gliazellendichte nach einer Behandlung der Zellen mit TGF- $\beta$ -stimulierten Sternzellüberständen, jedoch nicht wenn hypoxisch behandelte Sternzellüberstände verwendet wurden. Unterschiedliche Stimulationszeiten mit TGF- $\beta$  zeigten keinen Effekt auf die Zelldichte. Somit zeigt sich hier erneut, dass die unterschiedliche Behandlung und Aktivierung der Sternzellen auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zellsyntheseleistung besitzt. Aktivierte Sternzellen stellen vermutlich nicht eine homogene Gruppe dar, sondern verhalten sich je nach Aktivierungsweise unterschiedlich. Um diese These weiter zu beweisen, sind jedoch weitere Analysen der Zellen und Aktivierungswege nötig, welche nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Im Gegensatz zur bereits angesprochenen Analyse der Neuritendichte, zeigt eine Kultivierung der Sternzellen für 24h im Vergleich zu 12h - unabhängig vom Milieu (Normoxie oder Hypoxie) - und eine anschließende Behandlung der DRG keine Veränderung der Gliazellendichte. Die diskutierte Akkumulation sezernierter Faktoren spielt somit in der Beeinflussung der Gliazellen keine wesentliche Rolle.

Eine Eigenschaft maligner Zellen ist die Fähigkeit sich aus der Umgebung zu lösen und zu migrieren. Dies spielt einerseits in der Entstehung von Metastasen eine Rolle, andererseits kommt der Migration auch in der neuralen Invasion von Tumorzellen eine Bedeutung zu. Pankreaskarzinomzellen zeigen eine verstärkte Migration zu co-kultivierten Nervenzellen (Ceyhan et al., 2008). Migration - letztlich Fortbewegung aus eigener Kraft - ist jedoch nicht nur eine Eigenschaft bösartiger Zellen, sondern auch die Fähigkeit vieler gutartiger Zellen und ein wichtiger Bestandteil vieler physiologischer Vorgänge im Körper (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass migrierende Pankreaskarzinomzellen eine erhöhte Expression von NGF und Artemin aufweisen (Ceyhan et al., 2008). Nachdem wir beide Faktoren ebenfalls in den Sternzellen nachweisen konnten, untersuchten wir

das Migrationverhalten der Sternzellen. Wir verwendeten für die Untersuchungen der Migration den in unserer Arbeitsgruppe entwickelten 3-D-Migrationassay, welcher eine Konfrontation verschiedener Zellarten erlaubt. Ein großer Nachteil in der Erforschung des Migrationsverhaltens von Zellen sind die vielen verschiedenen angewendeten Untersuchungsmethoden. Die Migration von Sternzellen wurde bereits in unterschiedlichen Versuchsansätzen untersucht, jedoch noch nie in Abhängigkeit von Nervenzellen. Viele Arbeitsgruppen verwenden *Boyer Chambers* (sogenannter *Transwell Assay*), um die Migration zu untersuchen (Masamune et al., 2005; Zha et al., 2014). Hierbei werden Zellen auf eine mit Kollagen Typ I beschichtete Einlage ausgesät. Die Zellen, die in einer bestimmten Zeit durch die 8µm großen Poren hindurch wachsen bzw. migrieren, werden auf der Unterseite der Einlage mittels Färbung nachgewiesen. Die von uns verwendete Methode lässt eine gleichwertige Beeinflussung von zwei Zellarten zu, da die Zellen auf einer horizontalen Ebene plaziert sind. Ebenso können weitere Parameter der Migration gemessen werden und nicht nur registriert werden, ob eine Zelle die Membran überwunden hat. Weiterhin lässt sich die Morphologie der Zellen während der Migration sehr genau beobachten. Zusammen mit dem zeitlichen Verlauf der Migration können so weitere Rückschlüsse gezogen werden.

Bekannt ist, dass Sternzellen eine verstärkende Wirkung auf die Migration und Invasivität der Pankreaskarzinomzellen ausüben (Hwang et al., 2008). Pankreaskarzinomzellen wiederum zeigen eine zielgerichtete Migration hin zu Nervenzellen (Dai et al., 2007; Gil et al., 2010). Interessanterweise konnten wir erstmalig zeigen, dass Sternzellen selbst eine zielgerichtete Migration hin zu Nerven- und Gliazellen (DRG) aufweisen. Die Zellen legten in Richtung der DRG eine größere Strecke zurück und zeigten eine direktere und zielgerichtetere Migration im Vergleich zur Kontrollseite. Was lässt sich hieraus schlussfolgern?

Wenn Sternzellen eine Tendenz zeigen, sich in Richtung der Nervenzellen zu bewegen, kann dies zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen im perinervalen Gewebe führen. Dies wiederum würde vermutlich eine vermehrte Infiltration der Nerven mit einer schlechteren Prognose nach sich ziehen. Auch wenn bisher noch nicht genauer untersucht, kann vermutet werden, dass Sternzellen erst nach ihrer Aktivierung die Eigenschaft und Tendenz zur Migration erwerben und so Tumorzellen in Richtung der Nerven „locken“ könnten.

Um die Verhältnisse in Tumor detaillierter nachzustellen, wurde der Migrationassay mit einer Tumorzellpopulation (50:50 Tumorzellen:Sternzellen)

durchgeführt. Auf Grund der Fluoreszenz der Tumorzellen ließ sich die Migration der Sternzellen isoliert analysieren. Die Tumorzellen und Sternzellen scheinen sich in der Migration allein unter morphologischen Gesichtspunkten zu beeinflussen und sich gegenseitig voranzutreiben. Sternzellen migrieren vorraus gefolgt von den Tumorzellen, welche die gleiche Strecke verwenden. Das gleiche zeigt sich auch umgekehrt, jedoch scheint es häufiger so zu sein, dass Sternzellen sich einen Weg durch die extrazelluläre Matrix suchen und die Tumorzellen diesem bereits gemachten Weg gerne „nachfolgen“. Bildlich erinnert die Migration an ein gegenseitiges aneinander entlanghangeln.

Erstaunlicherweise zeigte sich jedoch keine zielgerichtetere oder direktere Migration der im „Tumor“ befindlichen Sternzellen hin zu den Nervenzellen als zur verglichenen „leeren“ Front. Nachdem die Sternzellen alleine eine erhöhte Affinität zu den DRG gezeigt hatten, war dies zunächst von uns auch in der Mischpopulation erwartet worden. Mehrere Erklärungen hierfür sind zu diskutieren. Möglich ist, dass eine Stimulation oder Beeinflussung der Sternzellen durch die Tumorzellen den Effekt der nervalen Affinität puffert oder verschleiert. Die Tumorzellen, die in direktem Kontakt mit den Sternzellen stehen, können so eine direktere und effizientere Beeinflussung ausüben, als die Nevenzellen, welche noch über eine ECM-Brücke getrennt sind. Somit ist bereits der Einfluss der kokultivierten Tumorzellen so groß, dass die Beeinflussung durch die DRG irrelevant wird. Um dies weiter zu untersuchen, wären unterschiedliche Verhältnisse in der Zellzusammensetzung nötig, um den Effekt der Tumorzellen auf die Sternzellen in diesem Assay genauer darstellen zu können. Eine weitere Überlegung wäre, dass die Tumorzellen Sternzellen bereits so stark aktivieren bzw. verändern, dass keine vermehrte Migrationstendenz zu Nerven mehr besteht. Dies hieße in der Folge, dass eine Affinität hin zu Nervenzellen womöglich durch einen anderen Modus der Aktivierung getriggert wird. Weiterhin kommt dann auch wieder der nicht aktivierte Zustand der Sternzellen - also letztendlich im gesunden Pankreasgewebe - vermehrt in den Fokus. Welche Funktion oder Aufgabe Sternzellen in diesem Zustand besitzen, ist bisher noch nicht genau geklärt. Durch die Expression von neurotrophen Faktoren könnten ihnen, neben einer Funktion zur Aufrechterhaltung des extrazellulären Gewebes, auch regenerative Aufgaben hinsichtlich der Nerven im Pankreas zugesprochen werden.

Durch die in unserer Arbeit gewonnenen Ergebnisse lässt sich erstmals ein positiver Effekt der Sternzellen auf die Neuroplastizität mit einer vermehrten

Neuritenbildung nachweisen, welcher durch eine Stimulation bzw. Aktivierung der Zellen mit TGF- $\beta$  aber nicht mit Hypoxie verstärkt wird. Somit können die Sternzellen nach und nach in das komplexe, sich gegenseitig beeinflussende System der neuronalen Invasion aufgenommen werden und dürften in Zukunft noch weitere Aufmerksamkeit hinsichtlich ihrer Beeinflussung von und durch Nervenzellen erhalten. Interessant wäre weiterhin, die spezifischen Einflüsse der Sternzellen auf periphere Gliazellen zu untersuchen, da diese nach neuen Erkenntnissen möglicherweise noch vor der Tumorinvasivität in Abhängigkeit von NGF eine Affinität zu Vorstufen des Pankreaskarzinom aufweisen (Demir et al., 2014). Auch könnten weitere Faktoren neben den hier untersuchten Neurturin und Artemin und dem bekannten NGF eine Rolle in der Interaktion von Nerven und Sternzellen im Pankreaskarzinom spielen, sodass in diesem Bereich noch viele neue Erkenntnisse zu erwarten sind.

## V ZUSAMMENFASSUNG

Eine interessante Eigenschaft des Pankreaskarzinoms ist die ausgeprägte Stromareaktion. In wieweit diese als Freund oder als Feind in der Behandlung der Erkrankung angesehen werden muss, ist noch nicht endgültig geklärt. So könnte die Desmoplasie einerseits einen „Schutzmechanismus“ des Tumors darstellen und diesen für Chemotherapeutika schwer zugänglich machen, andererseits scheint die Stromareaktion jedoch auch ein aggressiveres Tumorwachstum zu begrenzen. Verantwortlich für den fibrotischen Umbau des Gewebes sind die Sternzellen des Pankreas. Eine Zunahme des Stroma geht mit einer erhöhten neuralen Invasion von Tumorzellen einher. Die Infiltration der Nerven mit Tumorzellen stellt einen entscheidenden prognostischen Faktor der Erkrankung dar und ist maßgeblich für die hohe Inzidenz von Lokalrezidiven verantwortlich. Die gegenseitige Beeinflussung von Stern- und Nervenzellen im Pankreaskarzinom wurde bisher noch nicht genauer untersucht.

Wir konnten in dieser Arbeit erstmalig nachweisen, dass Sternzellen neurotrophe Faktoren - Artemin und Neurturin - exprimieren. In unserem etablierten Neuroplastizitätsassay zeigten Nervenzellen unter dem Einfluss von Sternzellen eine erhöhte Dichte der ausgebildeten Neuriten. Durch eine vorherige Aktivierung der Sternzellen mit TGF- $\beta$  verstärkte sich dieser Effekt noch. Das im Tumorgewebe bestehende hypoxische Milieu hatte auf die Interaktion von Stern- und Nervenzellen keinen entscheidenden Einfluss. Somit kommt es möglicherweise durch die Sternzellen zu einer Hypertrophie der Nerven im Pankreas mit folgender Schmerzzunahme. Weiterhin kann durch die Sekretion neurotropher Faktoren die neurale Tumordinfiltration vermehrt werden.

Weiterhin beschäftigten wir uns mit der Migrationsfähigkeit der Sternzellen und konnten zeigen, dass Sternzellen zu den Nervenzellen zielgerichtet migrieren. Durch eine Ansammlung der Sternzellen in der Nähe von Nervenzellen werden so möglicherweise Tumorzellen in diesen Bereich des Gewebes gelockt und können dadurch schneller und häufiger die Nerven infiltrieren. In wieweit auch eine Metastasierung der Erkrankung durch diesen Mechanismus verursacht wird, bedarf dringend weiterer Untersuchungen.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ergeben sich noch weitere interessante Fragestellungen. Auch wenn eine Depletion des Tumorstroma bisher noch keinen wegweisenden Erfolg erbrachte, könnte durch eine gezielte Depletion oder eine

Reprogrammierung der Sternzellen und Überführung in ihren Ruhezustand eine entscheidende Einflussnahme auf die neurale Invasion erreicht werden. Bisher stehen hierfür noch keine spezifischen Therapieoptionen zur Verfügung. In weiteren dringend erforderlichen Untersuchungen sollten Tumorzellen intensiver einbezogen werden, um die Interaktion von Stern- mit Nervenzellen in Bezug auf die Tumorgenese analysieren zu können und somit weitere Schritte im Verständnis und der Behandlung dieser bösartigen Erkrankung machen zu können.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

Apte, M.V., Haber, P.S., Applegate, T.L., Norton, I.D., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., and Wilson, J.S. (1998). Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43, 128-133.

Apte, M.V., Haber, P.S., Darby, S.J., Rodgers, S.C., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., and Wilson, J.S. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44, 534-541.

Apte, M.V., and Wilson, J.S. (2012). Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 27 *Suppl* 2, 69-74.

Asai, K., Tamakawa, S., Yamamoto, M., Yoshie, M., Tokusashi, Y., Yaginuma, Y., Kasai, S., and Ogawa, K. (2006). Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation. *Liver Int* 26, 595-603.

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

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

Barreto, S.G., and Windsor, J.A. (2016). Justifying vein resection with pancreatoduodenectomy. *Lancet Oncol* 17, e118-124.

Basturk, O., Hong, S.M., Wood, L.D., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Brosens, L.A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R.H., *et al.* (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol* 39, 1730-1741.

Bockhorn, M., Uzunoglu, F.G., Adham, M., Imrie, C., Milicevic, M., Sandberg, A.A., Asbun, H.J., Bassi, C., Buchler, M., Charnley, R.M., *et al.* (2014). Borderline resectable pancreatic cancer: a consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery* 155, 977-988.

Bockman, D.E., Buchler, M., and Beger, H.G. (1994). Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology* 107, 219-230.

Canto, M.I., Harinck, F., Hruban, R.H., Offerhaus, G.J., Poley, J.W., Kamel, I., Nio, Y., Schulick, R.S., Bassi, C., Kluijdt, I., *et al.* (2013). International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut* 62, 339-347.

Ceyhan, G.O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I.E., Hinz,



U., Muller, M.W., Giese, T., Buchler, M.W., Giese, N.A., *et al.* (2009a). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology* *136*, 177-186 e171.

Ceyhan, G.O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Erkan, M., Park, W., Hinz, U., Giese, T., Muller, M.W., Buchler, M.W., Giese, N.A., *et al.* (2007). The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis. *Gut* *56*, 534-544.

Ceyhan, G.O., Demir, I.E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Muller, M.W., Giese, N.A., Friess, H., and Schafer, K.H. (2008). Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *374*, 442-447.

Ceyhan, G.O., Demir, I.E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M.W., Buchler, M.W., Friess, H., and Schafer, K.H. (2009b). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* *104*, 2555-2565.

Ceyhan, G.O., Giese, N.A., Erkan, M., Kerscher, A.G., Wente, M.N., Giese, T., Buchler, M.W., and Friess, H. (2006). The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion. *Ann Surg* *244*, 274-281.

Ceyhan, G.O., Schafer, K.H., Kerscher, A.G., Rauch, U., Demir, I.E., Kadihasanoglu, M., Bohm, C., Muller, M.W., Buchler, M.W., Giese, N.A., *et al.* (2010). Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg* *251*, 923-931.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., *et al.* (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* *364*, 1817-1825.

Crippa, S., Salvia, R., Warshaw, A.L., Dominguez, I., Bassi, C., Falconi, M., Thayer, S.P., Zamboni, G., Lauwers, G.Y., Mino-Kenudson, M., *et al.* (2008). Mucinous cystic neoplasm of the pancreas is not an aggressive entity: lessons from 163 resected patients. *Ann Surg* *247*, 571-579.

Dai, H., Li, R., Wheeler, T., Ozen, M., Ittmann, M., Anderson, M., Wang, Y., Rowley, D., Younes, M., and Ayala, G.E. (2007). Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach. *Hum Pathol* *38*, 299-307.

Delree, P., Leprince, P., Schoenen, J., and Moonen, G. (1989). Purification and culture of adult rat dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci Res* *23*, 198-206.

Demir, I.E., Boldis, A., Pfitzinger, P.L., Teller, S., Brunner, E., Klose, N., Kehl, T., Maak, M., Lesina, M., Laschinger, M., *et al.* (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst* *106*.  
Demir, I.E., Ceyhan, G.O., Rauch, U., Altintas, B., Klotz, M., Muller, M.W., Buchler, M.W., Friess, H., and Schafer, K.H. (2010). The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* *22*, 480-490, e112-483.

Dischl, D. (2018). Interaktion der Nerven- und Stellatumzellen beim Pankreaskarzinom und der chronischer Pankreatitis (Doktorarbeit an der Technische Universität München, Medizinische Fakultät, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Klinikum rechts der Isar).

Eguchi, D., Ikenaga, N., Ohuchida, K., Kozono, S., Cui, L., Fujiwara, K., Fujino, M., Ohtsuka, T., Mizumoto, K., and Tanaka, M. (2013). Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor. *J Surg Res* 181, 225-233.

Erkan, M., Adler, G., Apte, M.V., Bachem, M.G., Buchholz, M., Detlefsen, S., Esposito, I., Friess, H., Gress, T.M., Habisch, H.J., *et al.* (2012). StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 61, 172-178.

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

Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A.M., and Kloppel, G. (2012). [New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]. *Pathologe* 33 Suppl 2, 189-193.

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

Farrell, J.J. (2015). Prevalence, Diagnosis and Management of Pancreatic Cystic Neoplasms: Current Status and Future Directions. *Gut Liver* 9, 571-589.

Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D.S., Cook, N., and Tuveson, D.A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18, 4266-4276.

Furukawa, T., Kloppel, G., Volkan Adsay, N., Albores-Saavedra, J., Fukushima, N., Horii, A., Hruban, R.H., Kato, Y., Klimstra, D.S., Longnecker, D.S., *et al.* (2005). Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Arch* 447, 794-799.

Gil, Z., Cavel, O., Kelly, K., Brader, P., Rein, A., Gao, S.P., Carlson, D.L., Shah, J.P., Fong, Y., and Wong, R.J. (2010). Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J Natl Cancer Inst* 102, 107-118.

Haas, S.L., Fitzner, B., Jaster, R., Wiercinska, E., Gaitantzi, H., Jesnowski, R., Lohr, J.M., Singer, M.V., Dooley, S., and Breitkopf, K. (2009). Transforming growth factor-beta induces nerve growth factor expression in pancreatic stellate cells by activation of the ALK-5 pathway. *Growth Factors* 27, 289-299.

Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20, 1218-1249.

Huttner, F.J., Fitzmaurice, C., Schwarzer, G., Seiler, C.M., Antes, G., Buchler, M.W., and Diener, M.K. (2016). Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment

of periampullary and pancreatic carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2, CD006053.

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

Infinity-Pharmaceuticals. Infinity Reports Update from Phase 2 Study of Saridegib Plus Gemcitabine in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer, Pressemitteilung, Webseite: <http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=121941&p=iro-l-newsArticle&ID=1653550>, abgerufen 22.05.2017, (veröffentlicht 27.01.2012).

Kamisawa, T., Wood, L.D., Itoi, T., and Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *Lancet* 388, 73-85.

Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., *et al.* (2016). Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16022.

Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.

Li, X., Wang, Z., Ma, Q., Xu, Q., Liu, H., Duan, W., Lei, J., Ma, J., Wang, X., Lv, S., *et al.* (2014). Sonic hedgehog paracrine signaling activates stromal cells to promote perineural invasion in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 20, 4326-4338.

Liebl, F., Demir, I.E., Mayer, K., Schuster, T., D'Haese, J.G., Becker, K., Langer, R., Bergmann, F., Wang, K., Rosenberg, R., *et al.* (2014). The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Ann Surg* 260, 900-907; discussion 907-908.

Liu, B., and Lu, K.Y. (2002). Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 1, 469-476.

Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., and Negri, E. (2014). European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol* 25, 1650-1656.

Mantoni, T.S., Lunardi, S., Al-Assar, O., Masamune, A., and Brunner, T.B. (2011). Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling. *Cancer Res* 71, 3453-3458.

Masamune, A., Satoh, M., Kikuta, K., Suzuki, N., and Shimosegawa, T. (2005). Endothelin-1 stimulates contraction and migration of rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 11, 6144-6151.

Masamune, A., and Shimosegawa, T. (2009). Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol* 44, 249-260.

Nakao, A., Harada, A., Nonami, T., Kaneko, T., and Takagi, H. (1996). Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas* 12, 357-361.

Neoptolemos, J.P., Palmer, D.H., Ghaneh, P., Psarelli, E.E., Valle, J.W., Halloran, C.M., Faluyi, O., O'Reilly, D.A., Cunningham, D., Wadsley, J., *et al.* (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, 1011-1024.

Ng, K.Y., Wong, Y.H., and Wise, H. (2010). The role of glial cells in influencing neurite extension by dorsal root ganglion cells. *Neuron Glia Biol* 6, 19-29.

Nielsen, M.F., Mortensen, M.B., and Detlefsen, S. (2016). Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol* 22, 2678-2700.

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

Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., *et al.* (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461.

Ozdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S.V., *et al.* (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25, 719-734.

Pandol, S., Gukovskaya, A., Edderkaoui, M., Dawson, D., Eibl, G., and Lugea, A. (2012). Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol* 27 *Suppl* 2, 127-134.

Phillips, P.A., Yang, L., Shulkes, A., Vonlaufen, A., Poljak, A., Bustamante, S., Warren, A., Xu, Z., Guilhaus, M., Pirola, R., *et al.* (2010). Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17397-17402.

Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., Von Hoff, D.D., and Hingorani, S.R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 418-429.

Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., and Matrisian, L.M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913-2921.

Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W., *et al.* (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25, 735-747.

Rustgi, A.K. (2014). Familial pancreatic cancer: genetic advances. *Genes Dev* 28, 1-7.

Sherman, M.H., Yu, R.T., Engle, D.D., Ding, N., Atkins, A.R., Tiriach, H., Collisson, E.A., Connor, F., Van Dyke, T., Kozlov, S., *et al.* (2014). Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell* 159, 80-93.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 66, 7-30.

Solomon, S., Das, S., Brand, R., and Whitcomb, D.C. (2012). Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J* 18, 485-491.

Takahashi, T., Ishikura, H., Motohara, T., Okushiba, S., Dohke, M., and Katoh, H. (1997). Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol* 65, 164-170.

Vasen, H., Ibrahim, I., Ponce, C.G., Slater, E.P., Matthai, E., Carrato, A., Earl, J., Robbers, K., van Mil, A.M., Potjer, T., *et al.* (2016). Benefit of Surveillance for Pancreatic Cancer in High-Risk Individuals: Outcome of Long-Term Prospective Follow-Up Studies From Three European Expert Centers. *J Clin Oncol* 34, 2010-2019.

Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., *et al.* (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 369, 1691-1703.

Vonlaufen, A., Phillips, P.A., Xu, Z., Goldstein, D., Pirola, R.C., Wilson, J.S., and Apte, M.V. (2008). Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. *Cancer Res* 68, 7707-7710.

Wang, K., Demir, I.E., D'Haese, J.G., Tieftrunk, E., Kujundzic, K., Schorn, S., Xing, B., Kehl, T., Friess, H., and Ceyhan, G.O. (2014). The neurotrophic factor neurturin contributes toward an aggressive cancer cell phenotype, neuropathic pain and neuronal plasticity in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 35, 103-113.

Wilson, J.S., Pirola, R.C., and Apte, M.V. (2014). Stars and stripes in pancreatic cancer: role of stellate cells and stroma in cancer progression. *Front Physiol* 5, 52.

Wood, L.D., and Hruban, R.H. (2012). Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer J* 18, 492-501.

Xu, Z., Vonlaufen, A., Phillips, P.A., Fiala-Beer, E., Zhang, X., Yang, L., Biankin, A.V., Goldstein, D., Pirola, R.C., Wilson, J.S., *et al.* (2010). Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol* 177, 2585-2596.

Yan, H., Newgreen, D.F., and Young, H.M. (2003). Developmental changes in neurite outgrowth responses of dorsal root and sympathetic ganglia to GDNF, neurturin, and artemin. *Dev Dyn* 227, 395-401.

Zha, M., Li, F., Xu, W., Chen, B., and Sun, Z. (2014). Isolation and characterization of islet stellate cells in rat. *Islets* 6, e28701.

Zhang, J.F., Hua, R., Sun, Y.W., Liu, W., Huo, Y.M., Liu, D.J., and Li, J. (2013). Influence of perineural invasion on survival and recurrence in patients with resected

pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 14, 5133-5139.

Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M.W., and Friess, H. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Carcinog* 35, 138-147.

## VII ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1:</i> Schematischer Versuchsablauf des Neuroplastizitätsassay .....	34
<i>Abbildung 2:</i> Lichtmikroskopie von primär isolierten Sternzellen aus Ratten.....	38
<i>Abbildung 3:</i> Immunfluoreszenzfärbung der rPSC mit Neurturin und Artemin ..	39
<i>Abbildung 4:</i> Neuroplastizitätsassay mit 6h, 12h und 24h TGF- $\beta$ stimulierten Sternzellen.....	41
<i>Abbildung 5:</i> Neuroplastizitätsassay mit 12h bzw. 24h hypoxischen und normoxischen kultivierten rPSC .....	46
<i>Abbildung 6:</i> Versuchsaufbau Migrationassay mit rPSC und DRG, sowie exemplarische Bilder bei Beginn (nach 24h) und Ende des Versuchs (nach 72h) .....	48
<i>Abbildung 7:</i> Auswertung des Migrationassays der PSC mit Konfrontation von DRG und einem leerem ECM-Gel Böpsel hinsichtlich verschiedener Charakteristika der Migration. ....	49
<i>Abbildung 8:</i> Versuchsaufbau Migrationassay mit Mischzellpopulation aus rPSC und fluoreszierenden Panc2-Cherry Pankreaskarzinomzellen (PC) in Konfrontation mit DRG und leerem ECM-Gel, sowie exemplarische Bilder bei Beginn (nach 24h) und Ende des Versuchs (nach 66h).....	51
<i>Abbildung 9:</i> Auswertung Migrationassays der rPSC (PSC-Tumor) aus der Mischpopulation (rPSC:Panc2-Cherry 50:50) mit Konfrontation von DRG und einem leerem ECM-Gel Böpsel hinsichtlich verschiedener Charakteristika der Migration. ....	52

## VIII DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp Ceyhan für die Möglichkeit in seinem Labor und seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen bedanken. Ich bin sehr dankbar für deine durchgehend motivierenden Worte und das Vertrauen, das du in mich hast. Ich bin froh durch diese interessante und fordernde Erfahrung den Weg in die Wissenschaft und das Fach Chirurgie gefunden zu haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Helmut Friess, dass ich in seiner Klinik meine Dissertation durchführen durfte. Seit Beginn meiner Arbeit als Assistenzarzt unter seiner Leitung ist er mir als Arzt zum Vorbild geworden.

Ich bedanke mich auch bei meinem Betreuer Dr. Steffen Teller für die geduldige und liebevolle Betreuung meiner gesamten Arbeit.

Mein Dank geht auch an PD Dr. Ekin Demir, der mir durch seine besondere Herangehensweise und Freude an der Grundlagenforschung eine große Inspiration war und weiterhin ist. Durch seine Anregungen und Gespräche hat er diese Arbeit wegweisend beeinflusst.

Mein besonderer Dank gilt auch der gesamten AG Ceyhan insbesondere Ulrike Bourquain für die liebevolle Hilfe, Dominik Dischl für die Einarbeitung und den Austausch und Lea Krauß für die gegenseitige Motivation und gemeinsame Zeit im Labor.

Zuletzt möchte ich mich noch herzlich bei meinen Eltern bedanken. Durch euer Interesse an meiner Forschung und dem ständigen Nachfragen habt ihr wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.