



Klinik und Poliklinik für Chirurgie am Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München
Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess

**Die funktionelle Analyse der Interaktion
zwischen der nervalen Invasion und der Angioinvasion
im humanen und murinen Pankreaskarzinom**

Isabel Maria Kröger

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Ihsan Ekin Demir, Ph.D.

2. Priv.-Doz. Dr. Anna Melissa Schlitter

Die Dissertation wurde am 27.10.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.02.2021 angenommen.

Veröffentlichungen:

DGVS Spring Conference 2015, 12.-13. Juni 2015 in Berlin

Posterpräsentation: „**Neurogenesis and angiogenesis in pancreatic cancer behave concordantly and exhibit distinct transcriptional profiles**“

Isabel Kröger, Ihsan Ekin Demir, Steffen Teller, Helmut Friess, Güralp Onur Ceyhan
Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

23rd United European Gastroenterology Week, October 24 - 28, 2015 Barcelona, Spain

Posterpräsentation: „**Neurogenesis and angiogenesis in pancreatic cancer behave concordantly and exhibit distinct transcriptional profiles**“

Isabel Kröger, Ihsan Ekin Demir, Steffen Teller, Helmut Friess, Güralp Onur Ceyhan
Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

36. Jahrestagung Deutscher Pankreasclub e.V., 18.-20. Januar 2016 in Freising

Posterpräsentation: „**Das Neurogenese-Angiogenese-Verhältnis im Pankreaskarzinom ist Interleukin-6- und MMP-9-abhängig**“

Isabel Kröger, Ihsan Ekin Demir, Steffen Teller, Helmut Friess, Güralp Onur Ceyhan
Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

The Official Journal of the International Hepato-Pancreato-Biliary-Association (IHPBA)
April 2016 Vol. 18 Supp. 1 p. e32:

Electronic Poster Abstracts: **Neurogenesis and angiogenesis in pancreatic cancer evolve concordantly via distinct transcriptional profiles**

I.E. Demir, I. Kröger, S. Teller, H. Friess, G.O.Ceyhan

Department of Surgery, Technische Universität München, Germany

DOI: [https://www.hpbonline.org/article/S1365-182X\(16\)30097-1/abstract](https://www.hpbonline.org/article/S1365-182X(16)30097-1/abstract)

Abkürzungsverzeichnis

ADM	azinär-duktale Metaplasie
AFL	atypische flache Läsion
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	basic Fibroblast Growth Facotr
BRAF	Rapidly accelerating fibrosarcoma Typ B
BRCA1 und 2	Breast Cancer 1 und 2
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CDKN2A	Cyklinabhängige-Kinaseinhibitor-2A
CIS	Common insertion sites
CRC	Colorektales Karzinom
CT	Computertomographie
CXC3R1	CXC3-Chemokin-Rezeptor 1 (auch fractalkine Rezeptor)
DHH	Desert Hedgehog
DRG	Dorsal root ganglia (Spinalganglien)
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FAMM	familiäres atypisches Muttermal
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FGF2	Fibroblast growth Factor
FOLFIRINOX	Chemotherapiekombination aus 5FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin
FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
g	Gramm
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GTP	Guanosintriphosphat
H.E.-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HGF	Hepatozyten growth factor
HHL	Hedgehog-Ligand
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
IGF-1	Insulin-like growth factor 1

IHH	Indian Hedgehog
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL6	Interleukin 6
IPMN	intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie
KRAS	K-ras Protoonkogen
MCN	muzinös-zystische Neoplasie
MDK	Midkine (auch neurite growth promoting factor 2)
ml	Milliliter
MMP9	Matrixmetalloproteinase 9
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MVD	Mean vessel density (mittlere Gefäßdichte)
NGF	Nerve Growth factor
NI	neurale Invasion
NP	Plexus myentericus
NRP1	Neuropilin 1
NSC	Neuronale Stammzellen
p16 ^{INK4A}	cyclin-abhängige-Kinaseinhibitor p16
p53	Tumorsuppressor 53
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCA	Pankreaskarzinomzellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PPC1	Plexus pancreaticus capitalis 1
PROK2	Prokineticin 2
PROKR	Prokineticin Rezeptor
PSCs	Pankreatische Sternzellen
PTC	Patched-Rezeptor
Rb	Retinoblastoma-Protein
rpm	rounds per minute
sec.	Sekunden
SHH	Sonic Hedgehog
SMAD4	MAD-Homolog 4
SMO	Smoothened-Rezeptor

TGFβ	Transforming growth factor beta
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TNM-Klassifikation	Tumor, Nodus, Metastasen-Klassifikation
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
UICC	Unione internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZTs	zirkulierende Tumorzellen
αSMA	alpha smooth muscle actin
μl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen.....	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einleitung	8
1.1 Epidemiologie des PDAC.....	8
1.2 Symptomatik, Risikofaktoren und Diagnostik.....	9
1.3 Staging, Grading und Therapie	10
1.4 Konzepte der Karzinogenese und genetische Aberrationen im PDAC	13
1.5 Angiogenese und Angioinvasion.....	16
1.6 Neurogenese und neurale Invasion	19
1.7 Der Hedgehog-Pathway, pankreatische Sternzellen und Desmoplasie im PDAC.....	24
1.8 Humanes Colonkarzinom	26
1.9 Ein PiggyBac-Transpositions-Modell zur Generierung neuartiger pankreatischer Maustumore	28
1.10 Histopathologische Eigenschaften des PDAC	29
1.11 Zentrale Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	29
2. Material	31
2.1 Chemikalien und Reagenzien	31
2.2 Antikörper	32
2.3 Geräte und Software	32
2.4 Zubehör	32
2.5 Gewebe	33
2.6 Ethikvotum und Tierversuchsantrag.....	34
3. Methoden.....	34
3.1 Immunhistochemie.....	34
3.1.1 Pufferherstellung	34
3.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	35
3.1.3 Immunhistochemie-Immunfluoreszenz-Triplefärbung: CD31, S100, CK19.....	35
3.1.4 PGP 9.5-Hämalaun-Färbung der Mausschnitte.....	38
3.2 Mikroskopische Erfassung des gesamten Gewebeschnittes	40
3.3 Erhebung der Gewebefläche und Quantifizierung der Blutgefäße und Nerven.....	41
3.4 Erhebung der neuralen Invasion	41
3.5 RNA-Isolation.....	41
3.6 Quantitative Realtime-PCR-Arrays	42
3.6.1 Neurotrophine&Rezeptoren RT2-Profiler-PCR-Array	43
3.6.2 Angiogenese RT2-Profiler-PCR-Array	43
3.7 Statistische Auswertung.....	43
3.7.1 Triplefärbung.....	43
3.7.2 RT-PCR-Arrays.....	43

4. Ergebnisse	44
4.1 Immunfluoreszenz-Immunhistologische-Triplefärbung	44
4.1.1 Die Korrelationsanalyse der Innervation mit der Vaskularisation und der neuralen Invasion im humanen Pankreaskarzinom.....	44
4.1.2 Die Korrelationsanalyse der Innervation mit der Vaskularisation und der neuralen Invasion im murinen Pankreaskarzinom	49
4.1.3 Die Korrelationsanalyse der Innervation mit der Vaskularisation und der neuralen Invasion im humanen colorektalen Karzinom.....	54
4.2 Transkriptomanalyse.....	58
4.2.1 Transkriptomanalyse gesteigerter Angiogenese im humanen Pankreaskarzinom ...	58
4.2.2 Transkriptomanalyse gesteigerter Angiogenese im humanen Colonkarzinom.....	59
4.2.3 Transkriptomanalyse gesteigerter Neurogenese im humanen Pankreaskarzinom ..	60
4.2.4 Transkriptomanalyse gesteigerter Neurogenese im humanen Colonkarzinom.....	61
4.2.5 Transkriptomanalyse der neuralen Invasion und Vaskularisation im Colonkarzinom	63
5. Diskussion	64
5.1 Humanes Pankreaskarzinom.....	64
5.2 Murines Pankreaskarzinom.....	68
5.3 Humanes Colonkarzinom	68
6. Zusammenfassung.....	71
7. Literaturverzeichnis.....	72
8. Abbildungsverzeichnis	91
9. Tabellenverzeichnis	92
10. Danksagung.....	93

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des PDAC

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit einem Anteil von bis zu 90% der am häufigsten vorkommende solide maligne Tumor der menschlichen Bauchspeicheldrüse. Gut 2/3 der Tumore sind im Bereich des Pankreaskopfes lokalisiert. 20% der Patienten weisen einen Tumor im Bereich des Pankreaskorpus und -schwanz auf, und 10% zeigen einen multifokalen Befall des Organs (Kanji et al., 2013).

Im Jahr 2014 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland 8.550 Männer und 8.580 Frauen am PDAC. Im selben Jahr starben 8.231 Männer und 8.348 Frauen an der Krankheit (Robert Koch Institut, 2017). Die geringe Differenz zwischen der Anzahl der Neuerkrankungen und der Sterbefälle zeigt, dass es sich um eine Erkrankung mit äußerst schlechter Prognose handelt. Dies spiegelt sich auch in den relativen 5-Jahres-Überlebensraten von 9% bei Männern und 10% bei Frauen wider. Somit weist das PDAC die niedrigsten 5- und 10-Jahres-Überlebensraten aller Krebserkrankungen auf (Robert Koch Institut, 2017). Beim PDAC handelt es sich um eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters. So liegt der Altersdurchschnitt der Patienten in der siebten Lebensdekade (Collins et al., 2009).

Seit 1998 steigt sowohl die absolute Zahl der Neuerkrankungsfälle als auch die der Sterbefälle konstant an (Abb. 1). In der Folge liegen die Prognosen des Robert Koch-Instituts für die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2018 bereits bei 9.500 Männern und 9.500 betroffenen Frauen.

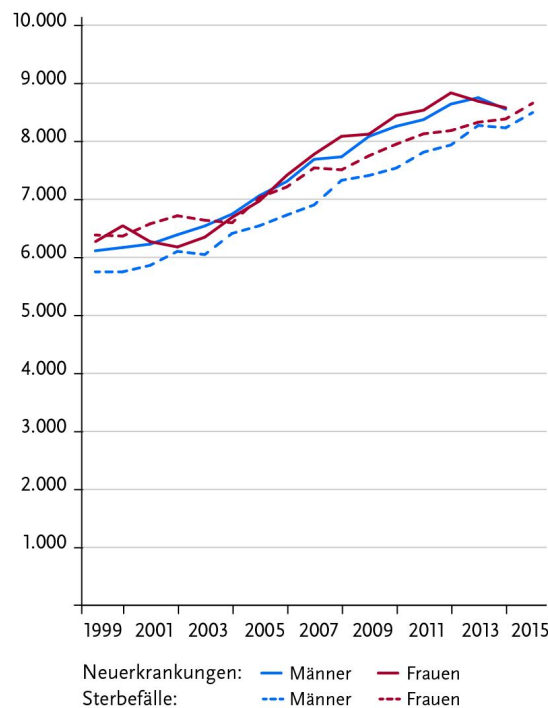


Abbildung 1: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, nach Geschlecht, ICD-10 C25, Deutschland 1999-2014/2015 (Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts, 2017)

Das Lebenszeitrisko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, liegt für Männer und Frauen bei jeweils 1,7% und nimmt mit steigendem Alter zu (Abb. 2) (Robert Koch Institut, 2017). Dementsprechend ist der Großteil der Patienten über 50 Jahre alt und die höchste Inzidenz liegt bei Patienten im Alter zwischen 60 und 80 Jahren vor (Kleeff et al., 2016).

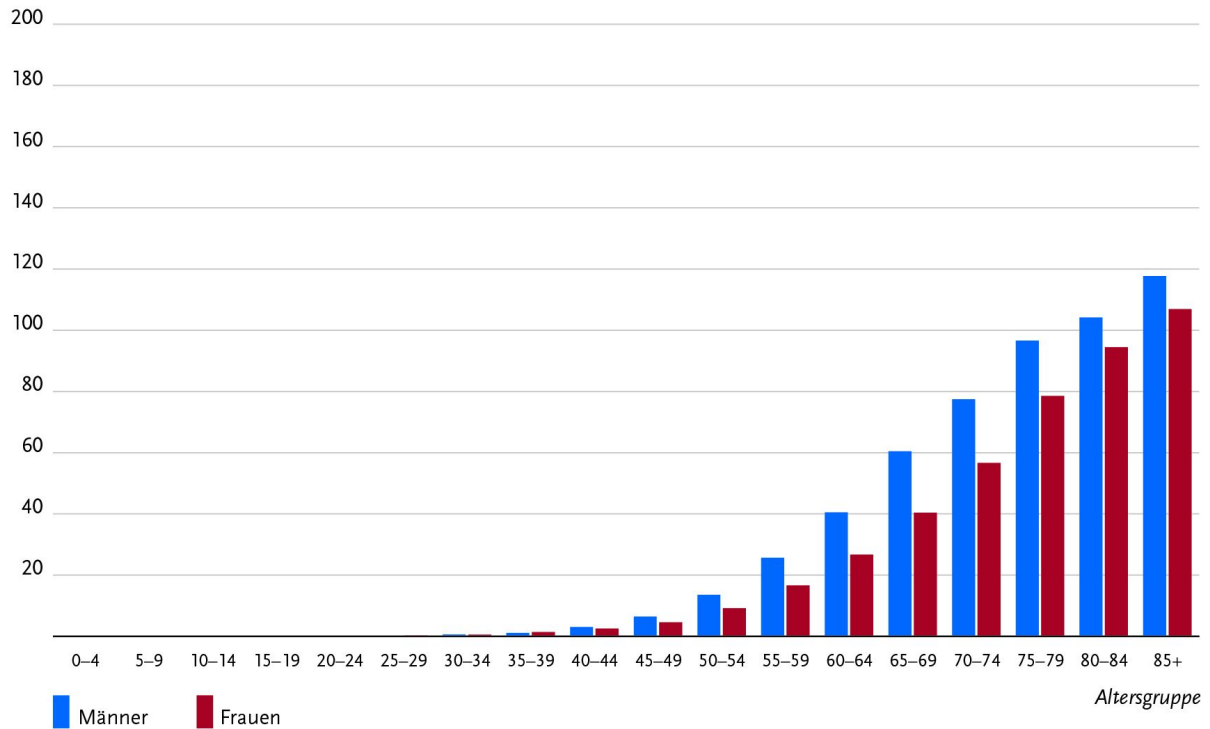


Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, ICD-10 C25, Deutschland 2013-2014 je 100.000 (Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts, 2017)

1.2 Symptomatik, Risikofaktoren und Diagnostik

Leitsymptome eines PDAC sind unter anderem schmerzloser Ikterus, diffuse abdominelle Beschwerden, abends und nachts an Intensität zunehmende epigastrische Schmerzen und Rückenschmerzen, sowie ungewollter Gewichtsverlust und neu aufgetretener Diabetes mellitus Typ II (De La Cruz et al., 2014; Frelove et al., 2006; Olson et al., 2016). Zudem wurden in der Literatur Symptome wie verfrüht einsetzendes Sättigungsgefühl, Fatigue, Bilirubinurie, Steathorroe, Pruritus und Depression im Zusammenhang mit der Erkrankung beschrieben (Collins et al., 2009; Olson et al., 2016). Auch Hyperkoagulabilität und damit verbundene spontane thrombembolische Ereignisse wurden im Rahmen einer PDAC-Erkrankung bei Patienten beobachtet (Khorana et al., 2004).

Risikofaktoren für die Entwicklung eines PDAC sind Tabakrauch, Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2 und das Vorbestehen einer chronischen Pankreatitis. Auch übermäßiger Verzehr von Alkohol, geräucherten und gegrillten Speisen und verarbeiteten Fleischprodukten können das Erkrankungsrisiko erhöhen (Robert Koch Institut, 2015). Zudem tritt das PDAC bei 5-10% aller Patienten familiär gehäuft im Rahmen genetischer Krebs syndrome auf. Zu diesen gehören beispielsweise das HNPCC-Syndrom (DNA-Mismatch-Repair Mutationen), das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom (mit BRCA1/2-Mutationen), das FAMM-

Syndrom (CDKN2A/p16-Mutationen), die hereditäre Pankreatitis (PRSS1-Mutationen) und das Peutz-Jeghers Syndrom (STK11-Mutation) (Kanji et al., 2013).

Weitere 1-3% der PDACs können familiär gehäuft auftreten. Wenn in einer Familie zwei oder mehr erstgradig Verwandte an einem Pankreaskarzinom erkranken, wird vom sogenannten familiären Pankreaskarzinom (FPC) gesprochen. In diesem Fall liegt keines der oben genannten Syndrome vor. Aufgrund der statistischen Häufung kann jedoch von einer erblichen Komponente ausgegangen werden (Seufferlein et al., 2013). Laut aktueller Leitlinien (Stand Oktober 2013) gibt es derzeit keine empfohlene Screeningmethode, um die Entstehung oder das Vorliegen eines PDAC frühzeitig festzustellen.

Die Primärdiagnostik bei Verdacht auf eine intrapankreatische Raumforderung sollte über bildgebende Verfahren erfolgen. Mittel der ersten Wahl stellt hierbei die Oberbauchsonografie dar. Auch Endosonografie, Magnetresonanztomografie mit Magnetresonanztomografie (MRCP) und die Multidetektorcomputertomographie (CT) haben einen hohen Stellenwert in der Diagnostik des PDAC. Die Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) und Bürstenzytologie sind hingegen aufgrund zu niedriger Sensitivität nicht indiziert. Bei Nachweis einer Raumforderung des Pankreas sollte eine Bestimmung des Tumormarkers Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) aus dem peripheren Blut des Patienten erfolgen. Bei CA 19-9 handelt es sich um ein Antigen des Mucin-1-Proteins, das besonders bei Vorliegen eines Pankreaskarzinoms aber auch bei anderen gastrointestinalen Karzinomen häufig erhöht ist (bis >500 U/ml, Normwert: 6–37 U/ml). Es sind jedoch auch falsch positive und in 35% der Fälle falsch negative Werte möglich (Goggins, 2005; Safi et al., 1986). Zur Einschätzung der Resektabilität und zum Staging sollen CT, Endosonografie, Oberbauchsonografie und ein Röntgen Thorax erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013).

1.3 Staging, Grading und Therapie

Laut den S3-Leitlinien von 2013 sollte die chirurgische Resektion – sofern möglich – immer angestrebt werden, da es sich um die einzig potenziell kurative Therapieoption des PDAC handelt. Ziel soll hierbei immer die R0-Resektion sein (Tab. 1).

Tabelle 1: Einteilung des postoperativen Resektionsstatus

R=Residualtumor (postoperativ)	
RX	Residualtumor kann nicht bestimmt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor
R2	Sichtbarer Residualtumor

(Ettrich et al., 2016)

Eine Resektion kann trotz Infiltration der Nachbarorgane oder der Vena portae, V. mesenterica superior und V. lienalis möglich sein. Die Infiltration des Truncus coeliacus sowie der Arteria mesenterica superior (zumindest ab >180 ° Ummauerung) sowie nachgewiesene Fernmetastasen machen eine R0-Resektion zum derzeitigen Stand unmöglich und sprechen somit gegen eine chirurgische Therapie.

Kann eine operative Therapie erfolgen, richtet sich die Art der Operation nach der Tumorlokalisation. Bei einem Karzinom im Bereich des Pankreaskopfes erfolgt eine Duodenopancreatektomie (Operation nach Kausch-Whipple), die mit oder ohne Erhalt des Pylorus erfolgen kann. Bei Tumoren im Pankreasschwanz ist eine Pankreaslinksresektion indiziert. Karzinome im Bereich des Corpus können über eine subtotale Pankreaslinksresektion

entfernt werden, machen jedoch in manchen Fällen auch eine totale Duodenopancreatektomie nötig. Im Rahmen der Operation sollten nach Möglichkeit mindestens 15 regionale Lymphknoten entfernt werden, um ein zuverlässiges Staging im Rahmen des pathologischen Befundes zu gewährleisten (Tol et al., 2014). Das Resektat wird ebenfalls pathologisch untersucht und dabei die Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation der UICC vollzogen und der Differenzierungsgrad der Tumorzellen bestimmt (Seufferlein et al., 2013). (Tab. 2, 3, 4)

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinom nach AJCC/UICC (Stand 2016)

TNM Klassifikation	
T = Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht erfasst werden
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor auf das Pankreas beschränkt, $\leq 2\text{cm}$ in der größten Ausdehnung
T2	Tumor auf das Pankreas beschränkt, $>2\text{cm}$ und $\leq 4\text{cm}$ in der größten Ausdehnung
T3	Tumor auf das Pankreas beschränkt, $>4\text{cm}$ in der Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, A. hepatica communis und/oder A. mesenterica superior
N = regionale Lymphknoten	
NX	regionale Lymphknoten können nicht erfasst werden
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	≥ 1 und ≤ 3 befallene Lymphknoten
N2	≥ 4 befallene Lymphknoten
M = Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	vorliegende Fernmetastasen

(Cong et al., 2018)

Tabelle 3: Stadieneinteilung des PDAC nach AJCC/UICC

UICC Stadieneinteilung und Überleben			
Stadium	Resektabilität	Medianes Überleben (Monate)	5-Jahres-Überleben (%)
0 (Tis, N0, M0)	Carcinoma in situ, resektabel	Keine Daten	Keine Daten
IA (T1, N0, M0)	lokal beschränkt, resektabel	24-42	31-39
IB	Lokal beschränkt, resektabel	20-26	22-27
IIA (T2, N0, M0)	lokal invasiv, resektabel, eventuell borderline resektabel wenn T3 überschritten	15-30	16-25
IIB (T1-3, N1, M0)	lokal invasiv, resektabel, eventuell borderline resektabel wenn T3 überschritten	12-21	8-10
III (T4, jedes N, M0)	lokal fortgeschritten, borderline resektabel oder nicht resektabel	11-14	0-7
IV (jedes T, jedes N, M1)	Fernmetastasen, palliativ	5-12	0-4

(Hartwig et al., 2013)

Tabelle 4: Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grading)

Grading	
GX	Keine Beurteilung des Differenzierungsgrades
G1	Gut differenziert (<5 Mitosen)
G2	Mäßig differenziert (6-10 Mitosen)
G3	Wenig differenziert (> 10 Mitosen)

(Hruban et al., 2007)

Nach dem Stand der Leitlinien zum humanen PDAC von 2013 sollen nach erfolgter R0-Resektion möglichst innerhalb von 6 Wochen eine adjuvante Chemotherapie über 6 Monate mit Gemcitabin oder Folinsäure und 5-Fluoruracil nach dem Mayo-Protokoll erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013). Im Rahmen der ESPAC-4-Studie um Neoptolemos et al. konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Kombination von Gemcitabin und Capecitabin als intensiviertere Therapie zu einem verlängerten Gesamtüberleben von 16,3% auf 28,8% gegenüber der Gemcitabin-Monotherapie führte (Neoptolemos et al., 2017; Oncotrends, 2018). Im Rahmen der anschließend durchgeführten PRODIGE-24/CCTG-PA.6-Studie von Conroy et al. 2018 erfolgte die postoperative Chemotherapie innerhalb von 12 Wochen nach R0 oder R1-Resektion nach einem modifizierten FOLFIRINOX-Schema, bestehend aus Oxaliplatin, Leucovorin, Irinotecan und 5-FU. Unter diesem Therapieschema zeigte sich ein verlängertes Gesamtüberleben von 30,4% im Gegensatz zur Gemcitabin-Monotherapie mit 17,7% und einem statistisch signifikanten Überlebensvorteil von 19,6 Monaten gegenüber der Monotherapie (Conroy et al., 2018; Oncotrends, 2018). Somit ist in naher Zukunft mit einer Modifikation der Therapieempfehlungen zu rechnen.

Nach R1-Resektionen sollte nach den Empfehlungen der Leitlinie von 2013 ebenfalls eine 6-monatige additive Chemotherapie erfolgen. Eine adjuvante oder additive Radiochemotherapie wird derzeit nicht empfohlen. Bei lokal fortgeschrittenem, inoperablem PDAC können sowohl Chemo- als auch Radiochemotherapie zum Downsizing des Tumors erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013).

Da das Pankreaskarzinom meist erst im fortgeschrittenen Stadium symptomatisch wird, ist für circa 80% der Patienten eine kurative Therapie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht mehr möglich (Kleeff et al., 2016; Stathis et al., 2010). In diesen Fällen erfolgt die palliative Therapie. Hier wird eine Gemcitabin-Monotherapie als Erstlinientherapie empfohlen. Es ist jedoch bei Patienten mit Fernmetastasen auch möglich, Gemcitabin mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Anti-EGFR-Antikörper) kombiniert einzusetzen. Diese Therapie sollte jedoch bei ausbleibendem Hautausschlag innerhalb von 8 Wochen beendet werden. Bei günstigem Risikoprofil des Patienten kann auch die Therapie mit FOLFIRINOX, einer Kombination aus 5FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin erwogen werden. Diese Therapie verursacht jedoch häufigere und stärkere Nebenwirkungen. Seit 2013 kann auch Nab-Paclitaxel in Kombination mit Gemcitabin beim metastasierten Pankreaskarzinom eingesetzt werden. Diese Therapie zeigte ein statistisch signifikantes verlängertes medianes progressionsfreies Überleben von 5,5 Monaten im Vergleich zu 3,7 Monaten im Rahmen der Monotherapie. Die Kombinationstherapie kann in Deutschland zum gegenwärtigen Zeitpunkt im Rahmen eines off-label-uses erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013; Seufferlein et al., 2013).

1.4 Konzepte der Karzinogenese und genetische Aberrationen im PDAC

Es besteht ein überwiegender Konsens, dass das PDAC aus nichtinvasiven Vorläuferläsionen entsteht. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind drei verschiedene Vorläuferläsionen identifiziert. Es handelt sich hierbei um die Pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) (Crnogorac-Jurcevic et al., 2013; Hruban et al., 2004; Takaori, 2007). Bei den MCNs und den IPMNs handelt es sich um makroskopisch sichtbare, in der Regel große zystische Veränderungen des Pankreas, die häufig als radiologischer Zufallsbefund im Rahmen einer Bildgebung entdeckt werden. In der Folge werden diese Pankreaszysten zunächst als Inzidentalome bezeichnet (Salvia et al., 2004; Singh et al., 2007).

MCNs sind mucinsezernierende zystische epitheliale Neoplasien, die meist im Corpus- und Schwanzbereich des Pankreas liegen. Sie haben keine Verbindung zum Gangsystem und kommen überwiegend bei Frauen vor (90% aller MCNs) (Wilentz et al., 2000a). Es handelt sich meist um solitäre Zysten, die mit Schleim oder hämorrhagischem Sekret gefüllt sein können. Mikroskopisch zeigt sich ein muzinproduzierendes Säulenepithel mit variierendem Ausmaß an Atypien und typischerweise ein ovarialartiges Stroma (Zamboni et al., 1999). Die Zellen können Hormonrezeptoren für Östrogene und Progesteron exprimieren. Es werden 3 MCN-Typen unterschieden: das muzinöse Zytadenom, die MCN mit moderater Dysplasie und die MCN mit Carcinoma in situ. Circa ein Drittel der resezierten MCNs zeigen eine invasive Komponente mit typischerweise tubulärer Morphologie des Epithels wie auch im PDAC (Klimstra, 2005; Singh et al., 2007).

IPMNs sind intraduktal gelegene muzinproduzierende papilläre Neoplasien. Sie kommen bei Männern etwas häufiger vor (60%) und treten meist im Corpusbereich des Pankreas auf (75% der IPMNs) (Singh et al., 2007). Man unterscheidet Haupt- und Seitengang-IPMN, abhängig von ihrer Lagebeziehung zum Pankreashauptgang. Seitengang-IPMNs haben ein geringes Entartungsrisiko, wogegen Hauptgang-IPMN in 25-50% der Fälle mit einem invasiven Karzinom assoziiert vorliegen (Kobari et al., 1999; Sohn et al., 2004; Sugiyama et al., 2003). Mikroskopisch werden anhand der Morphologie der Epithelzellen 4 Subtypen unterschieden: Der intestinale, der pankreatobiliäre, der gastrisch-foveoläre und der onkozytäre Typ. Hauptgang-IPMNs sind meistens vom intestinalen Typ und Seitengang-IPMN meist gastrisch-foveolär. Die anderen beiden Typen sind selten. Muzinexpressionsprofile legen nahe, dass IPMNs vom intestinalen Typ zum muzinös-zystischen Karzinom werden können, wohingegen IPMNs vom pankreatobiliären Typ zum PDAC fortschreiten können (Takaori, 2007).

Die am häufigsten vorkommenden Vorläuferläsionen des PDAC sind die PanINs (Haugk, 2010; Kleeff et al., 2016). Sie entstehen in den kleinen Pankreasgängen und bestehen aus intraduktalen neoplastischen Proliferaten kubischer oder zylindrischer, teils muzinhaltiger Zellen, die in unterschiedlichem Ausmaß papilläre Formationen bilden können (Hruban et al., 2004). Mit steigendem Ausmaß zytologischer und architektonischer Atypien werden diese Läsionen in 3 Grade eingeteilt: PanIN1 bestehen aus einem hyperplastischen Gangepithel ohne nukleäre Atypien. PanIN2 zeigen bereits niedriggradige Dysplasien mit möglicher Pseudostratifizierung des Epithels und die PanIN 3 hochgradige Dysplasien und atypische Mitosen. PanIN 3 werden mit einem Carcinoma in situ gleichgestellt (Crnogorac-Jurcevic et al., 2013) (Singh et al., 2007) (S. Abb. 3). Niedriggradige PanIN-Läsionen sind auch bei asymptomatischen Patienten häufig. Ein Drittel aller resezierten oder im Rahmen von Autopsien untersuchten Patienten, die älter als 60 Jahre waren, zeigten PanIN1, jedoch nur 3% höhergradige PanIN 3 (Kern et al., 2002). Der Arbeitsgruppe um LaConti gelang es, an einem p48Cre/LSL-KRAS^{G12D}-Maustumormodell analog zur humanen Progressionstheorie die Entwicklung eines murinen PDAC über frühe und späte pankreatische intraepitheliale Neoplasien nachzuweisen (LaConti et al., 2015).

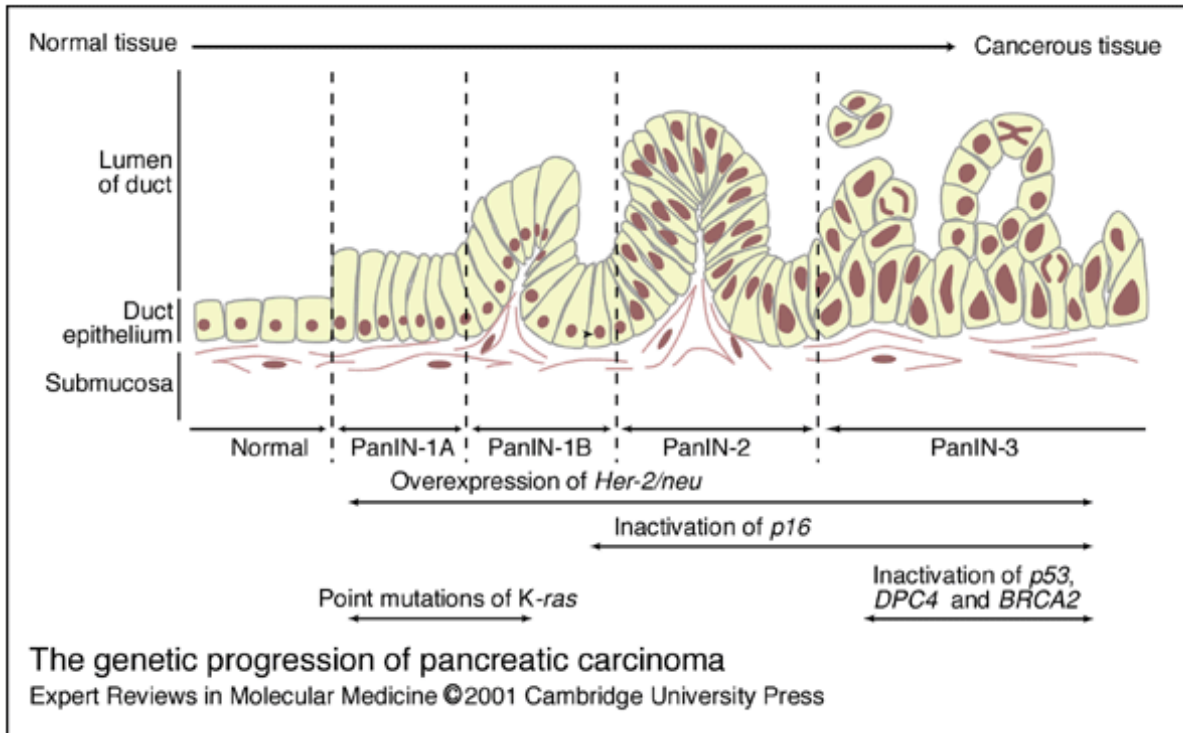


Abbildung 3: PanIN-Progression über Akkumulation genetischer Mutationen und morphologischer Aberrationen zum invasiven Karzinom im zeitlichen Verlauf (Arnold et al., 2001), überarbeitete Abbildung nach (Hruban et al., 2000), adaptiert von (Wilentz et al., 2000b), Illustration Jennifer L. Parsons

Alle drei nichtinvasiven Entitäten können über eine mehrschrittige Akkumulation genetischer und morphologischer Aberrationen in ein invasives Karzinom übergehen (Koorstra et al., 2008; Singh et al., 2007). Bezüglich der PanIN-Läsionen wurden Parallelen zu Vorläuferläsionen anderer Karzinome wie der Cervix uteri und der Adenom-Karzinom-Sequenz im Colon gezogen (Klimstra et al., 1994). Bei Resektaten wegen eines PDAC werden im angrenzenden Gewebe nahezu immer PanINs nachgewiesen (Hruban et al., 1999). Follow-up Untersuchungen zeigten außerdem, dass postoperativ verbliebene höhergradige PanIN-Läsionen bei Patienten zum invasiven Karzinom fortschreiten können (Doi et al., 2003; McCarthy et al., 2001; Takaori et al., 2003).

Eine alternative Hypothese zur Karzinogenese des PDACs duktales Ursprungs wurde anhand der Metaplasie-Dysplasie-Sequenz aufgestellt (Murtaugh et al., 2007): Es konnte gezeigt werden, dass aus Zellen des azinären bzw. zentroazinären zellulären Kompartiments des Pankreas über azinär-duktales Metaplasie (ADM) im Mausmodell und humanen Gewebeschritten ohne den Zwischenschritt der PanIN-Läsion zur Entstehung eines PDACs führen können. Das Morphologische Korrelat der Vorläuferläsion bezeichnet man hier als atypische flache Läsion (AFL) (Aichler et al., 2012; Esposito et al., 2012, 2014).

Ein bedeutendes Argument, das die Hypothese der duktales Karzinogenese über PanIN, IPMN und MCN-Läsionen stützt, ist, dass in den Vorläuferläsionen die gleichen genetischen Aberrationen identifiziert wurden, die auch im PDAC vorliegen. Es wurden vier Gene identifiziert, die im PDAC hochfrequent mutiert vorliegen: das K-Ras-Protoonkogen, das Cyklin-abhängige-Kinaseinhibitor-2A-Gen (CDKN2A), das Tumorsuppressorgen p53 und das SMAD4-Gen (Makohon-Moore et al., 2013).

Das KRAS-Gen codiert die GTPase K-Ras, die Effektorkaskaden von Rezeptortyrosinkinase aktiviert. Zu diesen gehören beispielsweise die Raf-MEK-Map-Kinase-Kaskade, die Phosphoinositid-3Kinase Kaskade und den Ral-GDS-Signalweg (Campbell et al., 1998; Vincent et al., 2011). Mutationen des KRAS-Gens führen zur wachstumsfaktorunabhängigen

Aktivierung der untergeordneten Signalkaskaden, da die Hydrolyse von GTP durch K-ras nicht mehr erfolgt und K-ras somit konstitutiv aktiviert vorliegt (Hezel et al., 2006). In der Folge kommt es zu verstärkter Proliferation, metabolischen Veränderung, erhöhter antiapoptischer Resistenz, verstärkter Zellmigration und Metastasierung (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

CDKN2A codiert für den cyclin-abhängige-Kinaseinhibitor p16 (p16^{INK4A}). P16 bindet und inaktiviert die Cyclin-D-abhängige Kinase 4- und 6-Komplexe und inaktiviert so das Retinoblastoma-Protein (Rb), indem es dessen Phosphorylierung durch CDK4/6 inhibiert. Somit wird die Transkription von zellzyklusregulatorischen Proteinen verhindert und es kommt zum Zellzyklusarrest während der G1-S-Transition (Hezel et al., 2006; Liggett et al., 1998). Loss-of-function-Mutationen wurden in 80-95% der sporadischen PDACs gefunden (Hustinx et al., 2005; Rozenblum et al., 1997). Im Rahmen dieser Mutationen kommt es zum Verlust der replikationshemmenden und somit tumorsuppressiven Wirkung von p16.

Das P53-Gen codiert den Tumorsuppressor p53, der Wachstumsstopp und Seneszenz in der betreffenden Zelle auslösen kann (Morton et al., 2010). Im PDAC liegt es in 50-75% aller Fälle mutiert vor (Makohon-Moore et al., 2013; Morton et al., 2010). Bei diesen Mutationen handelt es sich in über 50% der Fälle um Missense-Mutationen, die zum Funktionsverlust des Proteins führen (Rozenblum et al., 1997). Es können aber auch gain-of-function Mutationen vorliegen, die zur Expression eines stabilen, andersartig aufgebauten mutierten p53-Protein führen. Diese mutierten p53-Proteine können dann die Funktionen von Onkoproteinen übernehmen, akkumulieren und somit das Tumorzellwachstum fördern (Muller et al., 2014). Damit einhergehend wurde die Anhäufung von mutierten p53 im Mausmodell und im humanen PDAC mit dem häufigeren Auftreten von Metastasen in Verbindung gebracht (Morton et al., 2010).

Das SMAD4-Gen ist ein Tumorsuppressorgen und codiert für den Transkriptionsfaktor SMAD4, der Effekte des TGF β - und des BMP-Signalwegs vermittelt. Das Protein ist an multiplen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel an Zellproliferation, Differenzierung, Motilität, Zelltod, Formierung extrazellulärer Matrix und Inhibition von Angiogenese über verminderte VEGF-Expression (Liu, 2001). In 55% der PDAC-Fälle liegt das Gen mutiert und inaktiviert vor (Makohon-Moore et al., 2013). Der Verlust der SMAD4-Expression führt zum Ausfall der SMAD4-vermittelten suppressiven Signale wie zum Beispiel der Angiogeneseinhibition. Die Expression von SMAD4 im humanen PDAC korreliert mit einer besseren Prognose für die Patienten (Liu, 2001).

Yachida et al. konnten für diese 4 Hauptmutationen des PDAC einen additiven Effekt nachweisen: Patienten, deren Tumoren 3 der genannten Mutationen zeigten hatten eine deutlich schlechtere Prognose und höhere Metastasenlast bei Autopsie im Vergleich zu Patienten, deren Tumor lediglich ein oder zwei der Mutationen aufwies (Yachida et al., 2012). KRAS-Mutationen sind eines der frühesten genetischen Ereignisse in der Progression humaner PanINs: Lohr et al. fanden in 36% der PanIN-1, in 44% der PanIN-2 und in 97% der PanIN-3-Läsionen mutiertes K-ras (Lohr et al., 2005). Im Mausmodell zeigte aktiviertes K-ras ebenfalls eine PanIN-Bildung (Moskaluk et al., 1997). Auch in den MCNs konnte eine schrittweise zunehmende Häufigkeit von KRAS-Mutationen mit steigendem Stadium festgestellt werden (10%, 33% und 89%) (Jimenez et al., 1999). Auch die Häufigkeit von p16-Loss-of-function-Mutationen steigt mit Progression der PanIN-Läsionen an. So wurde die Mutation in 20% der PanIN-1, in 55% der PanIN-2 und in 71% der PanIN-3-Läsionen gefunden (Rulyak et al., 2003). Der Verlust von p53 kommt meist erst in den späteren PanIN-Läsionen und den invasiven MCN-Anteilen vor (Iacobuzio-Donahue et al., 2000; Jimenez et al., 1999; Makohon-Moore et al., 2013). Der Verlust von SMAD4 ist auf das PanIN Stadium 3 beschränkt und erfolgt somit wie der p53 Verlust spät in der Karzinogenese des humanen PDAC (Liu, 2001). Auch für IPMNs und invasive Komponenten der MCNs konnte ein SMAD4-Loss gezeigt werden (Iacobuzio-Donahue et al., 2000; Jimenez et al., 1999; Takaori et al., 2003).

Weitere Mutationen, die in späten PanIN-Läsionen nachgewiesen wurden, sind der Verlust des BRCA2-Tumorsuppressors und der Verlust der Telomerintegrität (Goggins et al., 2000; Meeker et al., 2004). In über 90% der PanIN-Läsionen wurde eine Telomerdysfunktion beobachtet, die über chromosomale Instabilität zu einer neoplastischen Transformation führen kann (Callen et al., 2004; Rodier et al., 2005).

1.5 Angiogenese und Angioinvasion

Die Bildung neuer Blutgefäße kann durch zwei Mechanismen erfolgen: Einerseits kann es über die Proliferation und Migration vorbestehender Endothelzellen zur Neubildung von Blutgefäßen kommen. Dieser Prozess wird als (Neo-)Angiogenese bezeichnet (Folkman, 1995; Folkman et al., 1992; Sage et al., 1994). Des Weiteren wurden endotheliale Progenitorzellen (EPCs) identifiziert, die – aus dem Knochenmark mobilisiert – migrieren und eine Gefäßneubildung induzieren können. Dieser Vorgang wird Vaskulogenese genannt (Folkman et al., 2009; Nolan et al., 2007; Zhang et al., 2009).

Der Prozess der Neoangiogenese ist für solide Tumoren sehr wichtig, da diese für ihr Bestehen, ihren Progress und ihre Metastasierung von einer verstärkten Durchblutung abhängig sind. Diese Kernthese wurde bereits 1971 von Judah Folkman aufgestellt (Folkman, 1971). Physiologischerweise besteht bezüglich der Angiogenese ein Gleichgewicht aus pro- und antiangiogenetischen Faktoren, sodass es nur im Rahmen von (Organ-)Wachstum und Wundheilung zu einer verstärkten Gefäßneubildung kommt. Im Rahmen einer Tumorerkrankung nehmen jedoch proangiogenetische Faktoren Überhand. Die Tumorzellen fördern einerseits selbst die Neoangiogenese, indem sie mit Blutgefäßen über Mediatoren interagieren. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen andere Zellen, wie beispielsweise Makrophagen und Mastzellen stimulieren, proangiogenetische Faktoren zu sezernieren. Des Weiteren können Tumorzellen über Interaktion mit der Extrazellulärmatrix proangiogenetische Prozesse in Gang setzen. Somit wird die Vaskularisation des Tumors verstärkt und die Perfusion verbessert, was zu einer besseren Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und somit zu Wachstum des Tumors führt (Folkman, 1992). Wichtige Faktoren, die angiogenesefördernd wirken sind basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Transforming growth factor beta (TGF- β), Hypoxia inducible Factors (HIFs), NF-kappaB and Insuline like growth factor 1 (IGF-1) (Folkman et al., 1992; Nagaraju et al., 2015; Zhao et al., 2016).

Im Pankreaskarzinom spielen die Mitglieder der VEGF-Familie eine bedeutende Rolle bezüglich der Angiogenese (Hotz et al., 2002). So konnte ein erhöhter VEGF-A-Spiegel mit einer gleichzeitig vorliegenden höheren Blutgefäßdichte nachgewiesen werden (Itakura et al., 1997). VEGF-C liegt im PDAC überexprimiert vor (Tang et al., 2001). Die zugehörigen Rezeptoren VEGFR-1 und 2 und die VEGFR-Rezeptortyrosinkinase PTK 787 haben ebenfalls bedeutende Rollen bezüglich der Angiogenese im PDAC (Hoshida et al., 2002; Ogawa et al., 2002; Solorzano et al., 2001). Auch die Expression von proangiogenetisch wirkendem Hypoxia inducible factor alpha (HIF α) wurde im humanen PDAC verstärkt nachgewiesen und stellte einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen dar (Akakura et al., 2001). Die Aktivität der EGFR-Tyrosinkinase spielt für die Angiogenese im PDAC eine weitere wichtige Rolle. Ihre Hemmung konnte die Angiogenese im PDAC signifikant vermindern (Bruns et al., 2000). Desweiteren konnte eine verstärkte Expression von TGF- β , hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor Rezeptor (EGFR) und Insuline like growth factor (IGF) als proangiogenetische Mediatoren im PDAC identifiziert werden (Korc, 2003) (Abb. 4).

Die Gefäße im Tumor unterscheiden sich jedoch von tumorunabhängigen Gefäßen. Sie weisen aufgrund einer abnormen Gefäßarchitektur eine mangelnde Funktionalität auf

(Carmeliet, 2005). Sie sind häufig unorganisiert, mit fehlerhaftem Endothel und nicht durchgängiger Perizytenbedeckung ausgekleidet, was zu fragilen und undichten Gefäßen führt (Armstrong et al., 2004; Craven et al., 2016a; Heinemann et al., 2014; Mahadevan et al., 2007). Des Weiteren liegen die Gefäße aufgrund des erhöhten interstitiellen Drucks häufig kollabiert vor, was zu einer verminderten Perfusion führt (Jacobetz et al., 2013; Longo et al., 2016; Provenzano et al., 2012). Dies wird als ein zentraler Grund für das mangelnde Ansprechen des PDAC auf Radio- und Chemotherapie angesehen (Komar et al., 2009).

Die Überexpression proangiogenetischer Mediatoren wie HIF- α und VEGF-A im PDAC sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Buchler et al., 2003; Shibaji et al., 2003). Somit scheint ein proangiogenetischer Phänotyp das PDAC in seinem Progress zu fördern und möglicherweise aggressiver zu machen. Trotzdem konnten klassische Angiogenesehemmer wie Bevacizumab, ein Anti-VEGF-Antikörper, oder Sunitinib, ein Rezeptortyrosinkinasehemmer, keinen Tumorregress induzieren (Longo et al., 2016). Dieser Sachverhalt zeigt eine komplexe Wechselwirkung bezüglich Angiogenese und PDAC auf.

Ein weiteres Phänomen, das im PDAC beobachtet wurde, ist die Angioinvasion. Hierbei kommt es durch invasives Verhalten zum Eindringen von Tumorzellen durch Bindegewebe und die Schichten der Gefäßwände in die Blutgefäße (Hruban et al., 2014) (Abb. 4 d-f). Auffälligerweise liegen die neoplastischen Drüsenläppchen im PDAC in unmittelbarer Nähe von muskulären Gefäßen, wohingegen sie im normalen Pankreas durch viele Azinuszellen vom Gefäßsystem getrennt sind. Diese räumliche Nähe im Karzinom kann den Mechanismus der Angioinvasion vermutlich begünstigen (Sharma et al., 2004). Es wird angenommen, dass es durch Angioinvasion zur Entstehung von zirkulierenden Tumorzellen (ZTs) kommt. ZTs sind Tumorzellen, die sich vom Primärtumor oder Metastasen gelöst haben, in Kapillaren, normale Gefäße und tumorinduzierte Neogefäße invadieren, im peripheren Blut gefunden und isoliert werden konnten, und eine Ursache für Fernmetastasen in anderen Organen sind (Cen et al., 2012). Die Angioinvasion ist also ein nötig für die Metastasierung von Tumoren und somit Grundlage für eine der zentralen Eigenschaften maligner Tumore.

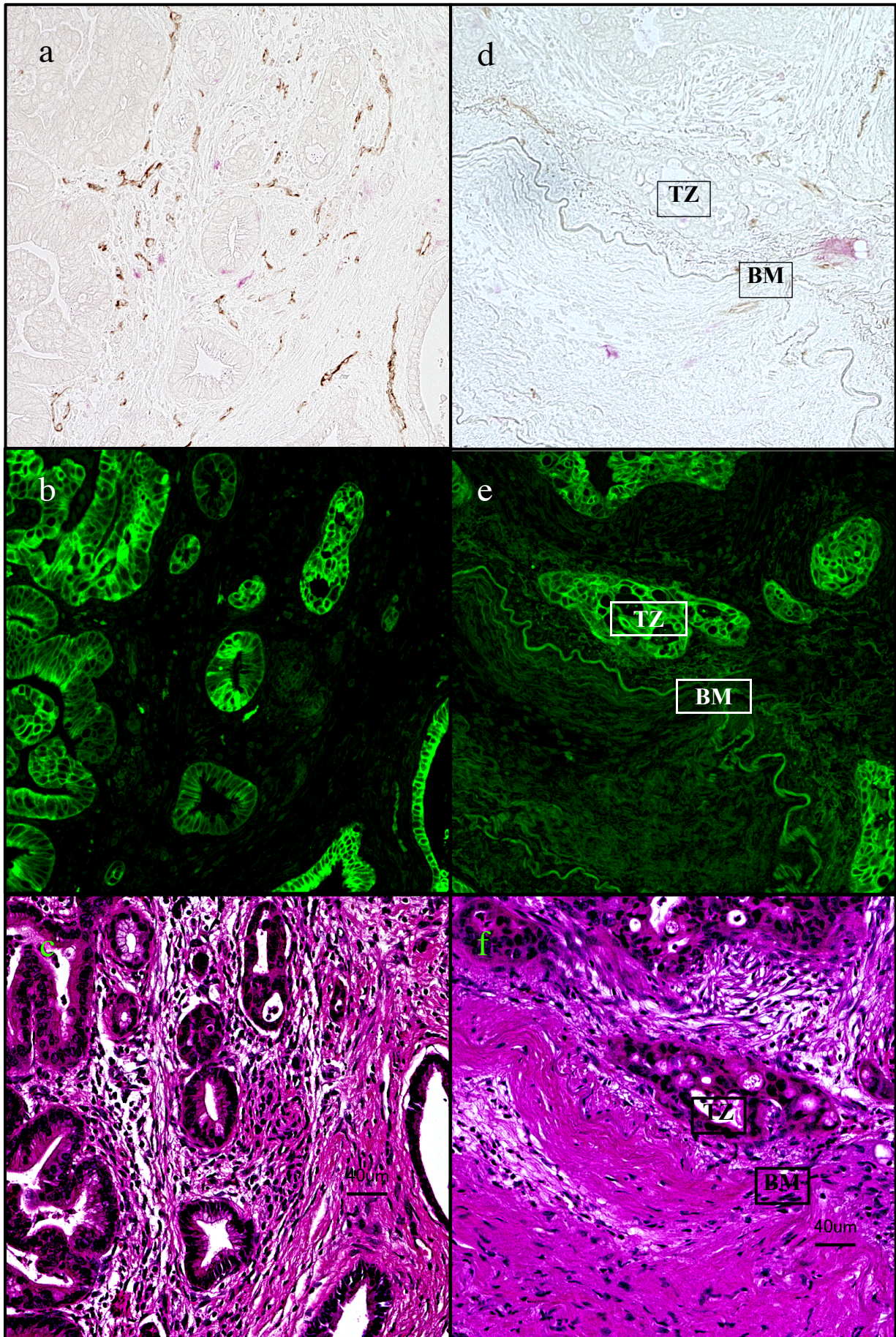


Abbildung 4: Blutgefäße und Tumorzellen im PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und H.E.-Färbung, a-c: normal, d-f: beginnende Angioinvasion (TZ: Tumorzellen, BM: Basalmembran des Blutgefäßes), eigene Färbungen

1.6 Neurogenese und neurale Invasion

Der Begriff der Neurogenese beschreibt den Entstehungsprozess von Neuronen. Lange Zeit wurde angenommen, dass dieser Prozess lediglich im Rahmen der Embryogenese stattfindet. Mittlerweile weiß man jedoch, dass auch eine adulte Neurogenese über neurale Stammzellen (NSCs) maßgeblich unter Einfluss des NOTCH- BMP- und SHH-Pathways stattfinden kann (Engler et al., 2018). Durch Vermehrung und Differenzierung dieser NSCs können in Säuger- tiergehirnen – unter dem Einfluss physiologischer und pathologischer Aktivitäten – alle Arten neuronaler Zellen gebildet werden (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) (Gage, 2000; Zhao et al., 2008). Faktoren, die die adulte Neurogenese positiv beeinflussen sind unter anderem Epidermal growth factor (EGF), Basic fibroblast growth factor (FGF2), Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Nerve growth factor (NGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin like growth factor 1 (IGF1) und Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Kuhn et al., 1997; Paratcha et al., 2006; Warner-Schmidt et al., 2006). Für IGF1 konnten Yuan et al. zeigen, dass über den MEK/ERK-Pathway mittels vermehrter Expression von Phospho-Erk 1 und 2 und Phospho-Akt auch in adulten Mäusen die Proliferation und Differenzierung von NSCs gefördert wurde (Yuan et al., 2015).

Die Nerven im PDAC zeigen eine Vielzahl struktureller Veränderungen gegenüber den Nerven im normalen Pankreas (Abb. 5): Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass im Pankreaskarzinom eine erhöhte Nervendichte, eine gesteigerte Neuritenausprossung, eine ausgeprägte Hypertrophie der Nerven, sowie eine perineurale Gliazellaktivierung auftritt. Diese Phänomene betitelten wir als „neurale Plastizität“ und die beobachtete Akkumulation verschiedener Immunzellen (vor allem zytotoxische T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen) als „pankreatische Neuritis“ (Demir et al., 2013). Auch das Innervationsmuster ändert sich im Karzinom. Der sympathische Anteil nahm deutlich ab, während der parasympathische Anteil gleichblieb. Dieses Phänomen wird auch als „neural remodeling“ bezeichnet (Ceyhan et al., 2009).

Im humanen Pankreaskarzinom konnte zudem eine ausgeprägte und komplexe Nerv-Tumor-Interaktion festgestellt werden: Der Pankreaskopf ist der am stärksten innervierte Teil des Organs und gleichzeitig am häufigsten vom Karzinom betroffen (He et al., 2016). Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Interaktion zwischen Nerven und Tumorzellen zur Tumorprogression beiträgt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten proliferationsfördernde Mediatoren identifizieren: Zhu et al. zeigten, dass die NGF-Expression in PDAC Zellen verstärkt vorliegt und der zugehörige High-affinity Rezeptor TrkA im Perineurium pankreatischer Nerven exprimiert wird (Zhu et al., 1999). Biankin et al. konnten eine Anreicherung von Axon-Guidance-Genen, die für die neurale Migration und Anordnung während der Embryogenese nötig sind, feststellen (Biankin et al., 2012). Für deren Transkripte Netrin und Slit konnte ein Einfluss auf Zunahme von Überleben, Invasion, Angiogenese und Krebszellwachstum nachgewiesen werden (Mehlen et al., 2011). Zum Nachweis neuraler Plastizität wurden von Demir et al. Neuronen aus dem Myenterischen Plexus (MP) und den Spinalganglien (DRG) neugeborener Ratten einerseits in Überständen aus gesundem Pankreas (NP) und Pankreaskarzinom (PCA) kultiviert und mit Gewebeextrakten von NP und PCA behandelt. Es zeigte sich eine dichtere Vernetzung der Nervenzellen: ein stärkeres Neuritenwachstum, eine zunehmende Neuritendichte und eine Perikaryonhypertrophie. Das intrapankreatische Microenvironment induziert also in-vitro Neuroplastizität (Demir et al., 2010b).

Ein häufig beobachtetes Phänomen, das aus der Nerv-Tumorzell-Interaktion resultiert, ist die neurale Invasion (NI) (Abb. 6). Laut Liu et al. ist diese definiert als das Einwachsen von Tumorzellen in einen Nerv mit dem Befall des mittleren Perineuriums (Liu et al., 2002). Durch die NI wird die Integrität des Perineuriums gestört, Axone werden aus ihrer Schwann-zellumhüllung frei, pankreatische Krebszellen nehmen die Position des Perineuriums ein und es kommt zur Schädigung des Nervens mit konsekutivem neuropathischem Schmerz. Über

die Interaktion von TGF α der Nerven und dem EGF-Rezeptor auf den Krebszellen kommt es zu Wachstumsvorteil für die Krebszellen. Sie wachsen häufig in einem kontinuierlichen Strang in die Nerven ein, ordnen sich dabei entlang der Nerven und auch zirkulär um diese an. Dadurch kommt es zum Verlust der Barrierefunktion des Perineuriums und somit zur gegenseitigen Beeinflussung von Nerv und Tumor (Bockman et al., 1994; Demir et al., 2010b; Kayahara et al., 2007). Auch Hruban et al. konnten nachweisen, dass die Epithelzellen des PDAC die Fähigkeit besitzen, bindegewebliche Strukturen und das Perineurium zu invadieren (Hruban et al., 2014). Sogar die kleinsten Läsionen zeigen schon häufig perineurale Invasion (Hezel et al., 2006). Das Phänomen der neuralen Invasion ist allerdings nicht pankreaskarzinomspezifisch. NI wurde in verschiedenen Tumorentitäten gefunden: Tumore im Kopf-Hals-Bereich, der Prostata, der Mamma und verschiedener gastrointestinaler Tumore (v.a. des Colons, Rektums, Magens und gastroösophagealen Übergangs) zeigen ebenfalls das Phänomen der NI. Im Humanen Pankreaskarzinom ist der Anteil invadierter Nerven jedoch besonders hoch: es finden sich bis zu 100% Invasion (Gil et al., 2010; Liebl et al., 2014).

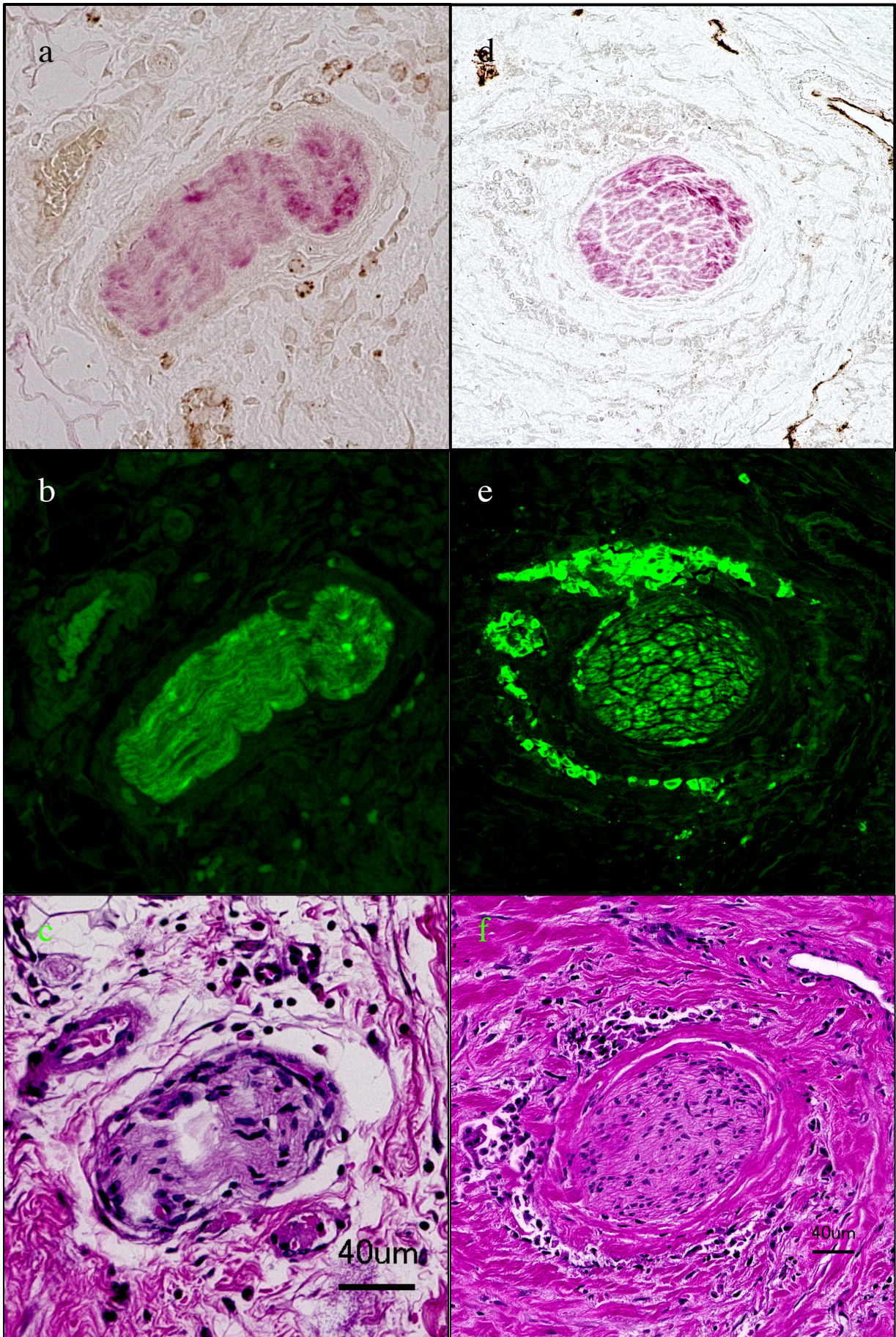


Abbildung 5: Nerven im humanen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und H.E., a-c: normal, d-f: Beginn perineuraler Invasion (Nerv-Tumor-Interaktion), eigene Färbungen

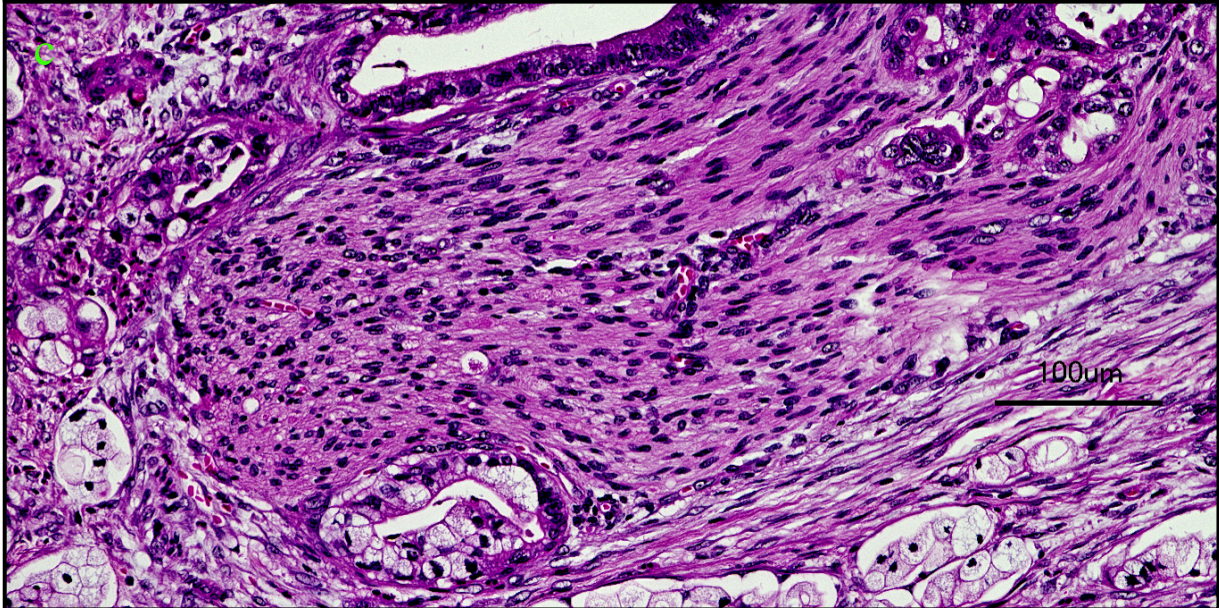
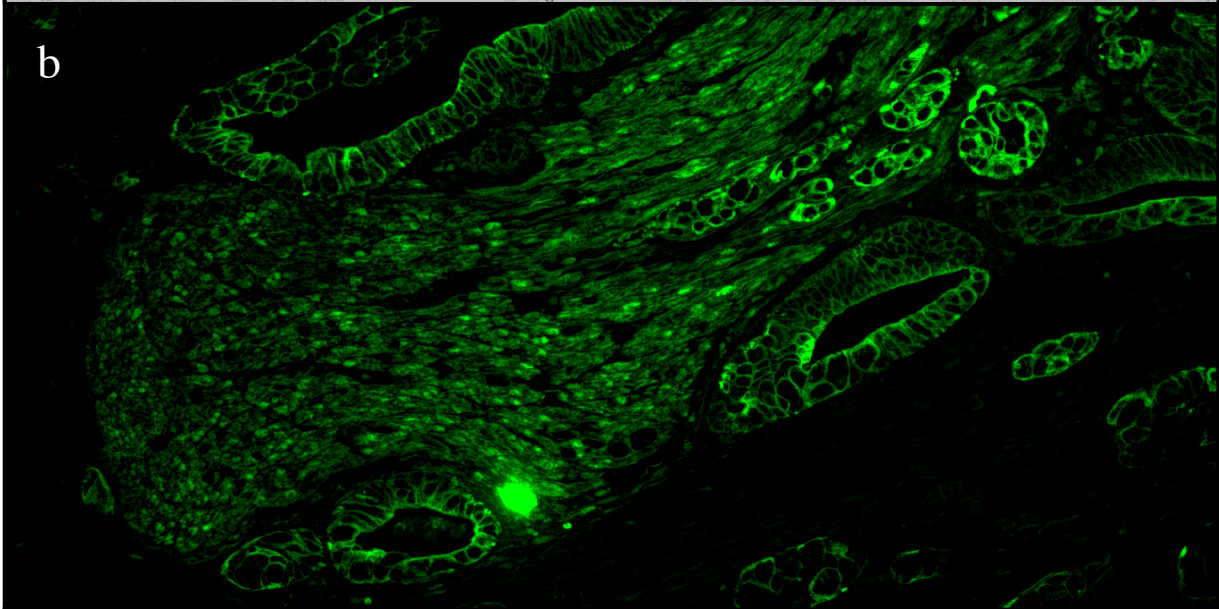
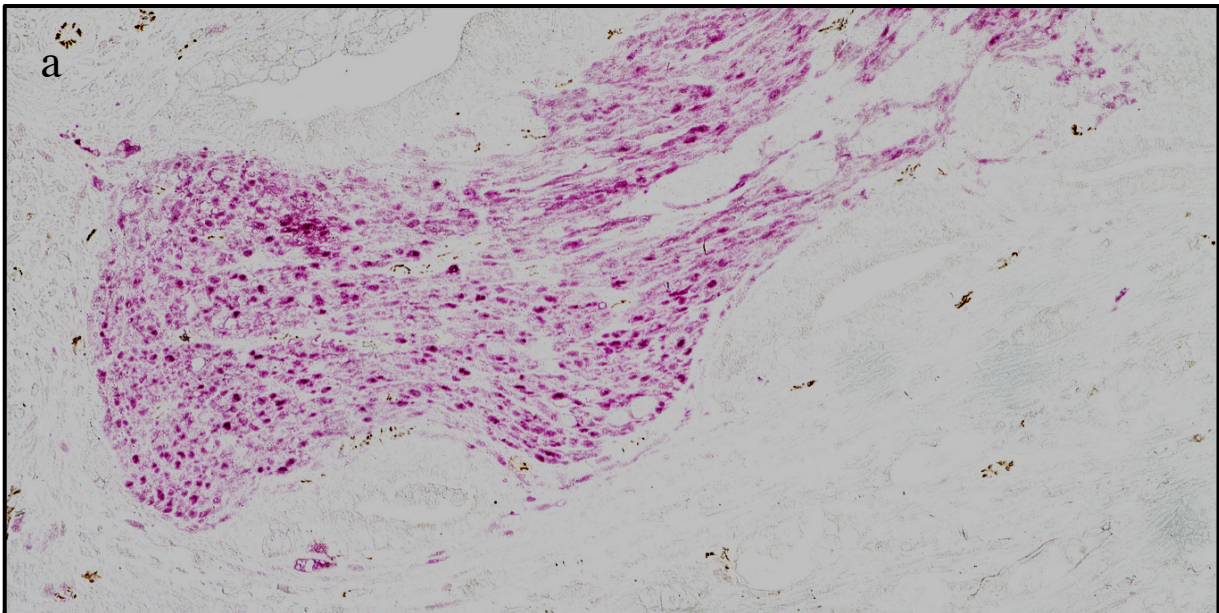


Abbildung 6: Nerv im Längsschnitt im humanen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und H.E.-Färbung, a-c: massive endoneurale Invasion, eigene Färbung

Während Bockmann et al. 1994 noch annahmen, dass die Ausbreitung des PDAC im Endoneurium der Nerven einen „Weg des geringsten Widerstandes“ für die Tumorausbreitung darstellt, und der Forschungsstand eine Migration und Invasion von den Tumorzellen ausgehend nahelegte, konnten Demir et al. 20 Jahre später zeigen, dass die Schwannzellen der peripheren Nerven zu PanIn-Läsionen, Pankreas- und Colontumorzellen als erstes migrieren, noch bevor die Tumorzellen migrierten. Somit ist von einer komplexen und reziproken Interaktion zwischen Nerv und Tumor auszugehen (Demir et al., 2014). Dennoch hat auch das PDAC Einfluss auf das Auftreten neuraler Invasion: Über Expression von EGFR-, NGF und MUC4 fördert es die Frequenz neuraler Invasion (Bergmann et al., 2009; Wang et al., 2015). Neueste Ergebnisse zeigen zudem eine bedeutende Rolle des sympathischen Nervensystems im PDAC: Ein erhöhter Sympathikustonus führte über hohe Katecholaminspiegel zu einer verstärkten Sekretion der Neurotrophine NGF und BDNF, was zu über die Induktion der Axogenese zu einem verstärkten adrenergen Stimulus mit Akkumulation von Norepinephrin führte. Dieser permanente adrenerge Stimulus fördert signifikant die Tumorinnervation und verstärkt das Tumorstadium im murinen PDAC. Die erhöhten NGF-Spiegel führten zu einer verstärkten NI bei den Tieren (Renz et al., 2018).

Die neurale Invasion im PDAC korreliert mit einer Vielzahl weiterer Eigenschaften und Faktoren. Mit steigendem Anteil invadierter Nerven steigen der Desmoplasieanteil, die Schwere der Neuropathie und das Ausmaß neuropathischer Schmerzen (Demir et al., 2014; Demir et al., 2010a; Demir et al., 2012). Zudem dient die NI als Indikator für einen aggressiveren Tumorphänotyp und als Prädiktor für das gehäufte Auftreten von Lokalrezidiven und ein kürzeres Überleben (Bapat et al., 2011; Bergmann et al., 2009; Demir et al., 2012; Liebl et al., 2014). In verschiedenen Ansätzen konnte neurale Invasion auch im Tiermodell generiert werden. Pour et al. wiesen NI in syrischen Hamstern als häufigsten Invasionsweg (vor lymphatischer oder Angioinvasion) nach und Gil et al. injizierten Tumorzellen in murine N. ischiadici und konnten im Rahmen der NI eine Nervenschädigung mit funktionellen Ausfällen bei den Tieren zeigen (Gil et al., 2007; Pour et al., 1991). Imoto et al. gelang es, am Mausmodell durch neurale Invasion induzierte Kachexie hervorzurufen (Imoto et al., 2012).

Auch Na'ara et al. konnten 2016 in in-vitro-Modellen mit murinen und humanen Tumorzellen neurale Migration und Invasion in DRGs zeigen und folgerten, dass neurotrophe Krebszellen solider Tumoren in-vivo über neurale Invasion disseminieren und unidirektional entlang der Nerven zum ZNS migrieren können (Na'ara et al., 2016).

Im Rahmen der neuralen Invasion beim PDAC kann es bereits bei kleinsten Tumorknoten zum Befall retropankreatisch gelegener Nervenplexus kommen (Kayahara et al., 1991). Hiervon betroffen sind vor allem der Plexus coeliacus und der Plexus myentericus, die beide dorsal des Pankreas lokalisiert sind. Patel et al. identifizierten durch Auswertung von kontrastmittelgestützten Multidetektorcomputertomographie-Schnittbildern abhängig von der Tumorklassifikation vier Hauptwege für die extrapankreatische Invasion von Nervenplexus. Der am häufigsten betroffene Invasionsweg läuft über den Plexus pancreaticus capitalis 1 (PPC1) in das rechte Ganglion Coeliacum des Plexus Coeliacus. Alternativ kann die Tumorausbreitung über den Plexus pancreaticus capitalis 2 über das zugehörige Ganglion mesentericum superius in den Plexus mesentericus superior, über den anterioren Weg entlang der cranial-ventralen Gefäßversorgung über die Arteria gastroduodenalis ins rechte Ganglion coeliacum und über den „Mesenterialwurzelweg“ über die A. pancreaticoduodenalis posterior inferior zum Ganglion mesentericum erfolgen (Abb. 7).

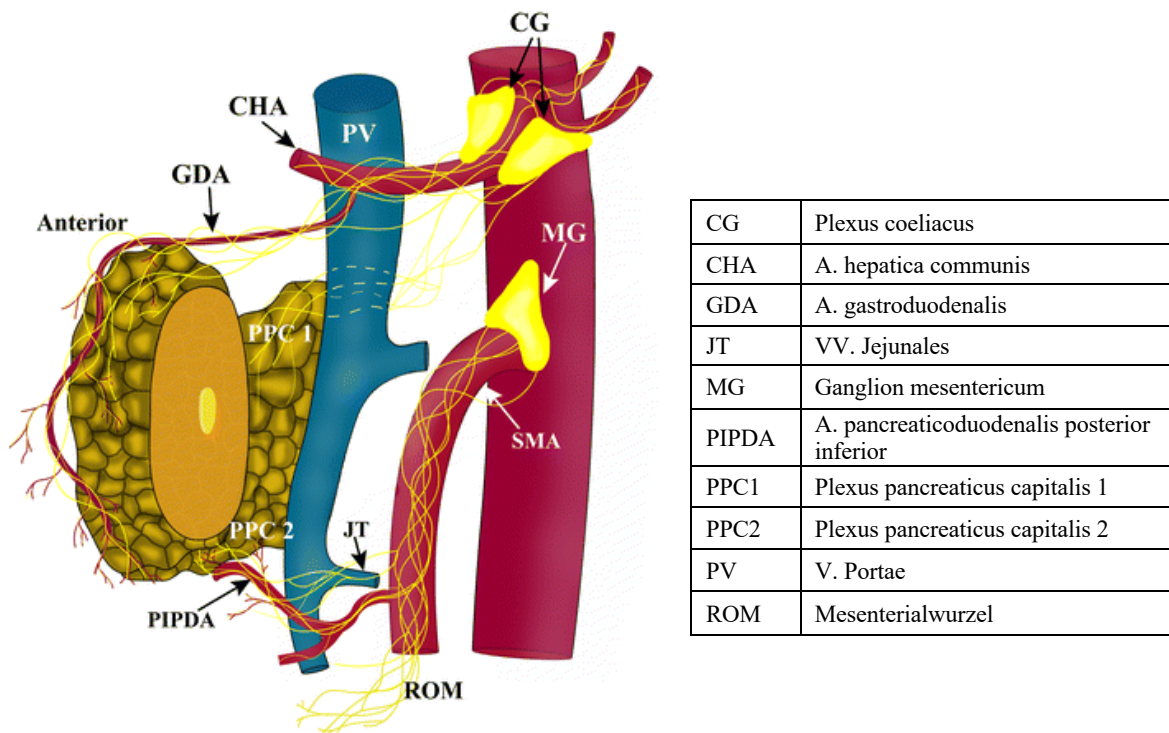


Abbildung 7: Topografie der extrapankreatischen Invasion der retropankreatisch gelegenen Nervenplexus. Siehe auch "Extrapaneatic perineural invasion in pancreatic adenocarcinoma" (Patel et al., 2018)

Der Befall dieser retropankreatischen Nervenplexus durch das PDAC ist aus verschiedenen Gründen von Bedeutung: Zum einen kann die Entstehung dieser teilweise massiven neuropathischen Schmerzen eine Plexusblockade zur Analgesie nötig machen (Collins et al., 2009; Wong et al., 2004). Die Schmerzintensität selbst ist hierbei ein eigenständiger Prognosefaktor. Je stärker die Patienten Schmerzen verspürten, desto kürzer war die Überlebenszeit (Okusaka et al., 2001). Zum anderen ist die Plexusinvasion ebenfalls mit einem verkürzten Überleben und somit einer schlechten Prognose assoziiert (Kayahara et al., 1994; Levy et al., 2006; Meduri et al., 1994). Die diskontinuierliche Ausbreitung des Karzinoms entlang der Nerven und die unbemerkte Infiltration der Nerven und Plexus im retropankreatischen Gewebe werden als zentraler Grund für die exorbitant hohen Lokalrezidivraten nach eigentlich kurativer Pankreaschirurgie mit tumorfreien Resektionsrändern angenommen (Hirai et al., 2002; Liu et al., 2002; Pour et al., 2003). Somit haben die neurale Invasion und Plexusinvasion großen Einfluss auf den Therapieerfolg bei dieser Erkrankung.

1.7 Der Hedgehog-Pathway, pankreatische Sternzellen und Desmoplasie im PDAC

Der Hedgehog-Pathway spielt während der Embryonalentwicklung für die Proliferation und Differenzierung von Zellen im Rahmen der Organogenese von Säugetierorganismen eine bedeutende Rolle (Morris et al., 2010; Walter et al., 2010). Es existieren drei Ligandenfamilien: Sonic-, Indian- und Desert-Hedgehog (SHH, IHH und DHH). In Abwesenheit des Liganden erfolgt eine hemmende Regulation durch den Rezeptor und Tumorsuppressor Patched (PTC), der den Transmembranrezeptor Smoothened (SMO) inhibiert. Es erfolgt keine Signaltransduktion zum Zellkern. Bindet ein Hedgehog-Ligand (HHL), kommt es zur Unterbrechung der PTC-Wirkung. Die SMO-Inhibition wird unterbrochen und es kommt zur Aktivierung einer Signalkaskade mit intrazellulärer Akkumulation der Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie.

Im Zellkern kommt es zur Transkription von Genen, die die Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptoseresistenz fördern (Hezel et al., 2006; Morris et al., 2010).

Der Aktivierung des Hedgehog-Pathways spielt für die Initiation und den Erhalt pankreatischer Neoplasien eine wichtige Rolle: Während er im normalen Pankreas nicht aktiviert ist, liegt in PanIN-Läsionen und im PDAC häufig ein dauerhafter Aktivierungszustand vor (Hezel et al., 2006). Denkbare Aberrationen können in einem PTC-Verlust, einer SMO-Aktivierung, einer Überexpression der HHLs oder der Gli-Proteine begründet liegen (Pasca di Magliano et al., 2003; Taipale et al., 2001). Im humanen PDAC liegt in der Regel eine aberrante SHH-Ligandenexpression vor. Dieses Phänomen wurde bereits 2003 von Thayer et al. beschrieben und konnte neben dem PDAC auch in anderen Tumoren des Gastrointestinaltraktes beobachtet werden, so zum Beispiel beim Ösophagus- und Magenkarzinom (Berman et al., 2003; Thayer et al., 2003). Die Überexpression von SHH im PDAC fördert den Tumorprogress. Bailey et al. beobachteten größere Primärtumore, häufigere Metastasierung und verstärkte Angio- und Lymphangiogenese unter HH-Aktivierung (Bailey et al., 2009). Im PDAC kommt es zu einem prokanzerogenen parakrinen Signalling zwischen epithelialem und mesenchymalem Kompartiment. Pankreatische Tumorzellen sezernieren den HHL, der in der Folge in den nicht neoplastischen Stromazellen, die den SMO-Rezeptor überexprimieren, den Hedgehog-Pathway aktiviert. Es kommt zur Aktivierung und Proliferation pankreatischer Sternzellen (PSCs) und anderer Fibroblasten. Aus dieser Aktivierung resultiert eine vermehrte Produktion von ECM und eine ausgeprägte Desmoplasie und Fibrose im PDAC (Apte et al., 2012; Bailey et al., 2008; Tian et al., 2009). Diese Desmoplasie führt zu Perfusionseinschränkungen im PDAC, was als ein Grund für eine geringe Medikamentenzufuhr im Tumor angesehen wird (Kelleher, 2011).

Aufgrund der Erkenntnis, dass die Stromakomponente das Pankreaskarzinom fördert, gab es verschiedene Ansätze zur Stromadepletion, mit der Intention, die Perfusion und das Therapieansprechen zu verbessern: Olive et al. konnten in einem Maustumormodell über die Kurzzeithemmung des Hedgehog-Signalings über den SMO-Antagonisten IPI-962 eine Abnahme der Stromakomponente mit konsekutiv verbesserter Perfusion, verstärkter Chemotherapiezufuhr und verlängertem Überleben der Tiere erreichen (Olive et al., 2009). Die gleichen Resultate konnten auch Provenzano et al. und Jacobetz et al. über Hyaluronsäuredepletion im Mausmodell und Sherman et al. durch Überführung der PSCs in einen quieszenten Zustand erreichen. Auch hier zeigte sich ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapeutika und ein Anstieg der Überlebensraten (Jacobetz et al., 2013; Provenzano et al., 2012; Sherman et al., 2014).

Im Gegensatz zu diesen erfolgversprechenden Ergebnissen zeigten sich bei Rhim et al. durch pharmakologische oder genetische dauerhafte SHH-Blockade zwar ebenfalls eine Stromadepletion, diese ging jedoch mit aggressiveren, undifferenzierten Pankreastumoren, verstärkter Metastasierung und verkürztem Überleben der Mäuse einher (Rhim et al., 2014). Auch bei Özdemir et al. führte die Depletion α SMA-positiver Fibroblasten im Mausmodell zu undifferenzierten Tumoren mit verringerter Überlebenszeit. Die Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass ein geringerer Myofibroblastengehalt im Tumor humaner Patienten mit einem verkürzten Überleben korrelierte (Özdemir et al., 2014). Die Aktivierung von Myofibroblasten über SHH scheint also in Teilen auch eine Art Barrierefunktion zu bewirken, die den Tumor eindämmen kann und ihn somit weniger aggressiv macht.

1.8 Humanes Colonkarzinom

Laut dem Robert Koch-Institut erkrankten im Jahr 2014 in der Bundesrepublik Deutschland 33.100 Männer und 27.900 Frauen am Colorektalen Karzinom (CRC), wovon bei Frauen 74% und bei Männern 67% der Erkrankungen im Colon lokalisiert sind. Dies entspricht anteilig im Rektum lokalisierte Tumoren von 26% bei weiblichen und 33% bei männlichen Erkrankten. Das CRC ist die zweithäufigste maligne Erkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern und kommt somit circa 4-mal häufiger vor als das PDAC. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 62%. Folglich ist die Prognose bei diesem Karzinom wesentlich positiver als die des PDAC. Es handelt sich beim CRC ebenfalls um eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 75 Jahren und bei Männern bei 72 Jahren. Interessanterweise treten seit 2003 abnehmende Erkrankungs- und Sterberaten auf, die unter anderem auf ein effektives Screening zurückzuführen sind (Robert Koch Institut, 2017).

Als Risikofaktoren für das Auftreten eines CRC gelten Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel, ballaststoffarme sowie alkohol- und fleischreiche Ernährung. Auch eine positive Familienanamnese sowie Patienten mit HNPCC, Familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (vor allem bei Colitis ulcerosa, vermutlich auch bei Morbus Crohn) haben ein erhöhtes Risiko an einem CRC zu erkranken (Robert Koch Institut, 2017)

Die Entstehung des CRC erfolgt in ca. 90% aller Fälle mit einer Latenzzeit von 5-10 Jahren über die Adenom-Karzinom-Sequenz aus den Epithelzellen dysplastischer Adenome des Dickdarms. Es handelt sich somit ebenfalls um ein Adenokarzinom des Gastrointestinaltraktes (Fleming et al., 2012). Adenome stellen die häufigste Vorläuferläsion dar (Brenner et al., 2014). Im Rahmen der Tumorentstehung finden verschiedene genetische Aberrationen statt. Eine APC-Gen Mutation findet in ca. 70% der Fälle als sehr frühes Event der Karzinogenese statt. Auch aktivierende KRAS-Mutationen und p53-Loss-of-function-Mutationen, Mikrosatelliten- und Chromosomeninstabilität kommen häufig im CRC vor. Laut Brenner et al. entstehen über 15% der CRCs nicht aus Adenomen, sondern aus serratierten Vorläuferläsionen. Diese Karzinome weisen häufig einen CgP-Insel-Methylator-phänotyp und BRAF-Onkogen Mutation auf (Brenner et al., 2014; Tariq et al., 2016). Im CRC sind verschiedene Pathwayaberrationen bekannt: Der WNT/ β -Catenin-, der Phosphoinositid-3-Kinase (PIK/AKT)-, der Ras/Raf-, der Transforming growth factor- β (TGF- β /SMAD)- und der NF κ B-Pathway sind häufig dysreguliert (Colussi et al., 2013; De Rosa et al., 2015; Markowitz et al., 2009). Fast 95% der CRCs treten sporadisch und circa 5% hereditär auf (Fleming et al., 2012). Als Früherkennungsmaßnahme werden ab dem 50. Lebensjahr eine komplette Koloskopie mit digital rektaler Untersuchung empfohlen (Brenner et al., 2001).

Mikroskopisch zeigen sich im CRC viele tumorinfiltrierende Lymphozyten und Tumorzellen, die häufig nah an submukösen Blutgefäßen liegen. Auch eine desmoplastische Reaktion und sogenannte „dirty necrosis“ – eine Ansammlung nekrotischen Debris in den neoplastischen Drüsenlumina – kommen im CRC vor (Brenner et al., 2014; Fleming et al., 2012). Auch die neurale Invasion wurde im CRC beobachtet. Mit ca. 31% liegt der Anteil invadierter Nerven jedoch viel niedriger als im PDAC und stellt keinen unabhängigen Prognosefaktor dar. Neurotrophe Faktoren wie NGF und Artemin kamen im CRC ebenfalls seltener vor als im PDAC (Liebl et al., 2014).

Im Falle einer Erkrankung sollte laut S3-Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft zur Ausbreitungsdiagnostik eine komplette Koloskopie, die Bestimmung des CEA-Tumormarkers, eine Abdomensonografie und ein Röntgen-Thorax erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2017; Robert Koch Institut, 2017). Das Krankheitsbild des Patienten sollte anschließend in einem interdisziplinären Tumorboard diskutiert werden. Therapeutisch sollte

eine operative En-bloc Entfernung des Tumors unter Entnahme von mindestens 12 regionären Lymphknoten unter Mitbeurteilung von Peritoneum, Lymphknoten und Leber erfolgen. Postoperativ erfolgt die pathologische Diagnostik mit Staging nach UICC und Grading. Bei erfolgter R0-Resektion soll zur Senkung des Rezidivrisikos ab Stadium III eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin in Kombination mit 5-FU/Folinsäure in unterschiedlichen Schemata erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Bei Kontraindikation sollte eine Fluorpyrimidin-haltige Therapie genutzt werden. Des Weiteren stehen verschiedene Lokalablative Verfahren und bei disseminierter oder nicht resektabler Erkrankung palliative Therapiemöglichkeiten zur Verfügung (Deutsche Krebsgesellschaft, 2017). Der Befall von Lymphknoten korreliert negativ mit der Prognose der Patienten (Chang et al., 2007). Im Verlauf der Erkrankung entwickeln fast 50% der Patienten Lebermetastasen. Auch die Lunge ist in ca. 10 % der Fälle Ort einer Fernmetastasierung (Benson, 2007; Mitry et al., 2010).

Im Rahmen der molekularen Tumorthherapie können die VEGF-Antikörper Bevacizumab und Aflibercept, die Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab und Panitumumab und der Kinaseinhibitor Regorafenib eingesetzt werden (Brenner et al., 2014; Labianca et al., 2004). Aufgrund der Ineffektivität von EGFR-Antikörpern bei Tumoren mit mutiertem K-ras stellten Adams et al. 2018 neue Therapieansätze mittels Tyrosinkinaseinhibitor (AZD8931) zur simultanen Inhibition von EGFR, HER2 und HER3 vor (Adams et al., 2018). Die Identifikation einer möglicherweise vorliegenden Mutation des rapidly accelerated fibrosarcoma Typ-B-Gens (BRAF) und der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) sind zur Therapieplanung ebenfalls nötig (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Im Falle einer hochgradigen Mikrosatelliteninstabilität kann der Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab einen hohen therapeutischen Effekt erzielen. Liegt eine BRAF-Mutation vor, sollte primär eine Triplette-Chemotherapie durchgeführt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019). Zusätzlich werden BRAF-Inhibitoren wie Vemurafenib als Therapieoption erforscht (Caputo et al., 2019; Yang et al., 2012).

1.9 Ein PiggyBac-Transpositions-Modell zur Generierung neuartiger pankreatischer Maustumore

Die Arbeitsgruppe um Univ.-Prof. Dr. med. Roland Rad (II Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar der TU München) konnte im Rahmen eines Forschungsprojektes an der Universität Cambridge über ein in-vivo piggybac-Transposase-Mutagenese-Modell neuartige pankreatische Maustumoren generieren (Rad et al., 2015). Hierzu verwendeten sie sogenannte piggybac-Transposons zur genomweiten zufälligen Geninsertion. Über knock-in wurde die piggybac transposase mit einer loxP-flankierten Stopkassette an den *Rosa26*-Lokus inseriert und in der Folge *Rosa26*^{LSL-PB}-Mäuse generiert. Im nächsten Schritt wurden diese *Rosa26*^{LSL-PB}-Mäuse mit *Pdx1-cre*-Mäusen und *Kras*^{G12D}-Mäusen gekreuzt und im Anschluss mit ATP1-S2-Mäusen gekreuzt, wodurch mutagene ATP1-Transposons entstehen und eine pankreasspezifische Tumorigenese ausgelöst wird (Vgl. Abb.8). Durch die Transposase kommt es nun zur Insertion unterschiedlich langer ATP1-Sequenzen. In den von unserer Arbeitsgruppe untersuchten PPKA-Mäusen kam es in 94% der Fälle zur Entstehung pankreatischer Tumore. Über eine TAPDANCE-Analyse konnten 176 common insertion sites (CISs) identifiziert werden. Eine detailliertere Beschreibung ist unter dem Titel „A conditional piggyBac transposition system for genetic screening in mice identifies oncogenic networks in pancreatic cancer“ 2015 in Nature Genes veröffentlicht worden (Rad et al., 2015).

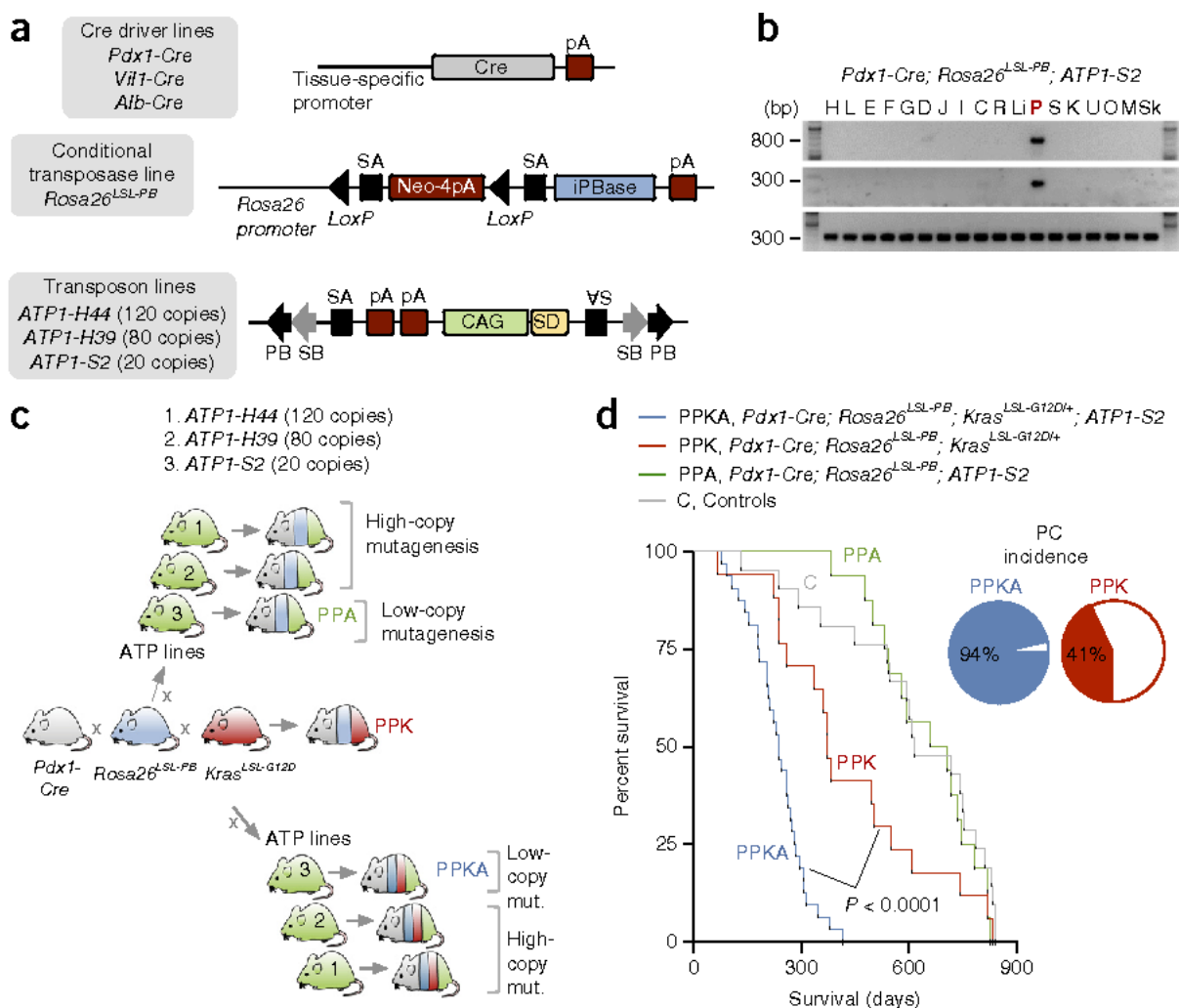


Abbildung 8: A conditional piggyBac transposition system for tissue-specific mutagenesis in mice (Rad et al., 2015)

1.10 Histopathologische Eigenschaften des PDAC

Der mikroskopische Aufbau des PDAC ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion mit massiver Fibrosierung des Tumors (Apte et al., 2012; Seymour et al., 1994). Das Stroma besteht aus Extrazellulärmatrixproteinen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin und weiteren nicht-kollagenen Proteinen wie Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (Kleeff et al., 2016). Die Kollagenmatrix wird von krebsassoziierten Fibroblasten produziert. Von ihnen bilden die pankreatischen Sternzellen (PSCs) die größte Gruppe im Stroma des PDAC (Ying et al., 2016). Sie haben eine bedeutende Rolle beim Auf- und Umbau der Extrazellulärmatrix (ECM) und sind an der Architektur des normalen Gewebes beteiligt (Phillips et al., 2003). Im Rahmen von pankreatischen Läsionen bei Pankreatitis oder Karzinom werden die PSCs über SHH aktiviert. Sie zeigen einen Myofibroblasten-Phänotyp, exprimieren den Fibroblastenaktivitätsmarker alpha-smooth muscle actin (α -SMA) und steigern ihre ECM-Produktion (Wehr et al., 2011). Es kommt auch zur Beeinflussung der Tumorzellen durch die aktivierten PSCs: über parakrines SHH-Signalling der Stromazellen werden wiederum Tumorwachstum, Zellproliferation und Invasion des Tumors gefördert (Armstrong et al., 2004; Koenig et al., 2006; Yauch et al., 2008). Die ausgeprägte desmoplastische Reaktion führt zu einem hohen hydrostatischen Druck im Tumorstroma, der zu einem Kollaps der Gefäße führt. Die daraus resultierende Minderperfusion führt zu einem hypoxischen und nährstoffarmen Tumormikroenvironment (Erkan et al., 2009; Kong et al., 2015; Provenzano et al., 2012). Die Hypoxie wiederum verstärkt über einen Anstieg der Transkriptionsfaktoren HIF1 und HIF2 die SHH-Sekretion der Karzinomzellen, wodurch es zu einer gegenseitigen positiven Verstärkung von Desmoplasie und Hypoxie kommt (Spivak-Kroizman et al., 2013). Die PDAC-Zellen scheinen in diesem ressourcenarmen und veränderten Mikroenvironment des Tumors nach evolutionären Mechanismen selektiert zu werden. Im Zuge dessen kommt es zu einem Überlebensvorteil für aggressive und robuste Tumorzellen (Makohon-Moore et al., 2016). Dies zeigt sich durch ein ausgesprochen aggressives invasives Wachstum, frühe Metastasierung und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie und könnte ein Grund für die äußerst hohe Frequenz neuraler Invasion im PDAC sein (Cen et al., 2012; Collins et al., 2009). Neben der starken Desmoplasie zeigt das PDAC zudem eine ausgeprägte Hypovaskularisation (Komar et al., 2009). Die Gefäßdichte im PDAC ist im Gegensatz zum normalen Pankreasgewebe verringert (Erkan et al., 2010). Auch im Maustumormodell zeigt sich eine insuffiziente Vaskularisation der Tumoren (Olive et al., 2009). Zusammenfassend handelt es sich beim PDAC also um einen Tumor, der große Anteile desmoplastischen Stromas aufweist und gleichzeitig durch eingeschränkte Vaskularisation und verstärkte Nerv-Tumor-Interaktion gekennzeichnet ist.

1.11 Zentrale Fragestellung und Ziel der Arbeit

Aus den obengenannten histopathologischen Eigenschaften und dem mikroskopischen Aufbau des PDAC leitet sich die zentrale Fragestellung dieser Forschungsarbeit ab: Liegt im humanen PDAC ein statistischer Zusammenhang – möglicherweise in Form einer inversen Korrelation – zwischen der verminderten Vaskularisation des Tumors und einer verstärkten Innervation vor? Steht das Ausmaß der Angio- bzw. neuralen Invasion in Zusammenhang mit der Vaskularisation und Innervation des PDAC?

Um diese Fragestellung beantworten zu können entwickelten wir eine antikörperbasierte Immunhistochemisch-Immunfluoreszenz-Triplefärbung, mit der eine simultane Erfassung von Blutgefäßen, Nerven und Tumorzellen an Tumorgewebeschnitten möglich ist. Durch ein etabliertes standardisiertes Auswertungsverfahren konnten so Gefäßanzahl, -fläche

und -dichte, Nervenanzahl, -fläche und -dichte und das Ausmaß neuraler Invasion und Angioinvasion in Bezug zur Gesamtgewebefläche erhoben werden. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden diese Parameter miteinander korreliert, um vorliegende statistische Zusammenhänge aufzudecken. Die beschriebene Methode vollzogen wir zunächst am humanen PDAC, das den Grundstein dieser Arbeit darstellt. In einem zweiten Schritt konnten wir Dank freundlicher Unterstützung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Roland Rad (II Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar der TU München) Tumorgewebe des unter 1.9 beschriebenen In-vivo-Mutagenese-Maustumormodells quantitativ untersuchen (Rad et al., 2015). Als Vergleichsorgan für gastrointestinale Adenokarzinome untersuchten wir zudem Proben von humanem Colonkarziom. Im zweiten Teil der Arbeit wurde in einer Transkriptomanalyse die Expression von Genen im Zusammenhang mit Angio- und Neurogenese im humanen Pankreas- und Colonkarzinomgewebe vollzogen. Hierfür nutzen wir Realtime-PCR basierte Pathwayarrays, in denen über mRNA-Isolation gewonnene cDNA eingesetzt wurde.

Sowohl die gegenwärtig trotz intensiver Forschung schlechte Prognose der Erkrankten als auch die Aussicht, dass die Prävalenz des PDAC mit steigendem Alter der Bevölkerung ebenfalls ansteigen wird, machen deutlich, dass die Forschung zu dieser Krankheit vorangetrieben und intensiviert werden muss. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, ein genaueres Verständnis über den mikroskopischen Aufbau bezüglich der Nerven und Blutgefäße, deren gegenseitige Einflussnahme und die genetischen Hintergründe im PDAC zu liefern. Nur besseres fundamentales Verständnis der Erkrankung kann in der Zukunft zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

2. Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
10% Normal Goat Serum	life technologies™ (jetzt: Thermo Fisher scientific©)
Alkoholreihe: 100%, 95%, 70%, 50%	Fischar©
Anti-Mouse biotinyliert	KPL©
Anti-Rabbit Envision System HRP	Dako©
Citronensäure Monohydrat $\geq 99,5\%$, Ph.Eur.	Carl Roth®
Dako Pen	Dako©
DAPI	
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth®
Fluorescent Mounting Medium	Dako©
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Fischar©
HistoMark® RED Phosphatase System	KPL©
Liquid DAB+ Substrate	Dako©
Methanol $\geq 99,9\%$	Carl Roth®
Natriumchlorid	Carl Roth®
PBS Dulbecco	Biochrom© GmbH (jetzt: Merck Millipore©)
R.T.U. Normal Horse Serum (2,5%)	Vector Laboratories©
Roticlear	Carl Roth®
Salzsäure 5N 37,8%	Krankenhausapotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München
Saures Hämalalaun nach Mayer	Krankenhausapotheke des Klinikums rechts der Isar der TU München
Streptavidin Phosphatase	KPL©
Trichlormethan/Chloroform $\geq 99\%$	Carl Roth®
Triton x100	Carl Roth®
Trizma® Base	Sigma Aldrich®
Trizol® Reagent	life technologies™ (jetzt: Thermo Fisher scientific©)
Tween® 20	Carl Roth®
Vectamount™ permanent mounting medium	Vector Laboratories©
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth®
RT ² First Strand Kit	Qiagen (SABiosciences ©)
RT ² qPCR Master Mixes	Qiagen (SABiosciences ©)

2.2 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper

Antikörper	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-CD31 (ab28364)	Abcam®	Rabbit	1:400
Anti-CK19 (sc-53258)	Santa Cruz Biotechnology	Mouse	1:300
Anti-S100 (MAB079-1)	Merck Millipore	Mouse	1:1000
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	life technologies™ (jetzt: Thermo Fisher scientific©)	Goat	1:200
Anti-PGP9.5 (Dako Z5116)	Dako	Rabbit	1:2000

2.3 Geräte und Software

Tabelle 7: Geräte und Software

Name	Hersteller
Centrifuge 5424 R	Eppendorf©
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence©
Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge	Thermo scientific©
Leica ASP200 S Gewebeeinfiltrationsautomat	Leica© Biosystems
Leica EG1160 Paraffinausgießstation	Leica© Biosystems
Leica RM2255 Motorisches Hochleistungsmikrotom	Leica© Biosystems
LightCycler®480	Roche Life Science
Mastercycler® ep gradient S	Eppendorf©
Mikro-Dismembrator S	Sartorius
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific©
PCR Array Data Analysis Software (Excel & Web based)	Qiagen (SABiosciences ©)

2.4 Zubehör

Tabelle 8: Zubehör

Name	Hersteller
Humanes Angionese RT ² Profiler PCR Array (PAHS-024Z)	Qiagen (SABiosciences ©)
Humanes Neurotrophine&Receptors RT ² Profiler PCR Array (PAHS-031Z)	Qiagen (SABiosciences ©)
Pipetten	Eppendorf© und Gilson®
Pipettenspitzen TipOne® 10, 100, 200 1000ul	Starlab©
Wetbox	selbst gebaut

2.5 Gewebe

Von Patienten, die im Rahmen der Therapie eines Pankreaskarzinoms am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München operiert wurden, wurde Tumorgewebe entnommen und umgehend über Nacht in Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden die Proben in 70%igen Ethanol gefüllt und der Entwässerungsvorgang gestartet. Nach Beendigung der Entwässerung wurde das Gewebe vollständig in Paraffin eingebettet und mit Hilfe des Kryotoms in 2,5µm dünne Gewebescheiben geschnitten. Die Größe der so erhaltenen Patientenkohorte betrug (n=55) Patienten. Der Altersmedian der Patienten lag bei 68 Jahren (Minimum: 32 Jahre, Maximum: 84 Jahre) und die Geschlechtsverteilung betrug 54,5% Männer (30 Proben) und 45,5% Frauen (25 Proben). Der Großteil der Patienten wies wenig differenzierte Tumore des Grads 3 (49%, 27 Proben) oder mäßig differenzierte G2-Tumore (45%, 25 Proben) auf. Lediglich 3 Patienten wurden mit gut differenzierten Tumoren des Grades 1 diagnostiziert (5%). 42 Patienten (76%) waren nach UICC 2010-Klassifikation an einem T3 Tumor erkrankt. Bei 9 Patienten lag das Tumorstadium bereits bei T4. 3 Patienten wurden im Stadium T2 und ein Patient im Stadium T1 diagnostiziert. Lymphknotenmetastasen zeigten sich bei 31 Patienten (56%). 24 Patienten hatten keine befallenen Lymphknoten (44%). Nur 6 der 55 Patienten (11%) wiesen bereits Fernmetastasen auf, davon je 50% hepatisch und peritoneal lokalisiert.

Das beschriebene Procedere wurde zudem mit Gewebeproben von Patienten mit colorektalem Karzinom durchgeführt. Es wurden Paraffinschnitte von (n=36) Patienten angefertigt. Der Altersmedian lag bei 66 Jahren (Minimum: 25 Jahre; Maximum 83 Jahre). 53% der Patienten waren männlich (19 Patienten) und 47% weiblich (17 Patientinnen). Der überwiegende Teil der Patienten wies nach UICC-Kriterien ein Tumorstadium T3 auf (64%, 23 Proben) und bei 8 Patienten (22%) lag ein T4-Tumor vor. Die Tumore von 4 Patienten wurden im Stadium T2 diagnostiziert und lediglich ein Patient im Stadium T1. Bezüglich des Lymphknotenstatus waren bei 16 Patienten keine Lymphknoten befallen (44%). 11 Patienten (31%) wiesen das Stadium N2 auf (Metastasen in mehr als drei Lymphknoten) und 9 Patienten (25%) das Stadium N1 auf (1-3 befallene Lymphknoten). Die meisten Patienten (72%, 26) hatten keine Fernmetastasen (M0). 10 Patienten (28%) waren zum Zeitpunkt der Therapie bereits von Fernmetastasen betroffen. Der Differenzierungsgrad der colorektalen Karzinome lag überwiegend bei G2 (mäßig differenziert, 18 Patienten, 50%) und G3 (schlecht differenziert, 16 Patienten, 45%). Nur zwei Patienten wiesen gut differenzierte G1-Tumoren auf. Aus einem weiteren Teil der entnommenen Gewebeproben beider Tumorentitäten wurden mit Hilfe von Flüssigstickstoff Gefriergewebeproben hergestellt. Diese dienten in der vorliegenden Arbeit der RNA-Isolation zur Untersuchung der Genexpression des Tumorgewebes. Alle Patienten wurden im Rahmen ihrer Therapie über die Gewebeentnahme zu Forschungszwecken aufgeklärt und haben eingewilligt.

Des Weiteren wurden (n=40) Gewebeschnitte muriner Pankreastumore von den unter 1.9 beschriebenen PPKA-Mäusen untersucht, die von der Arbeitsgruppe um Prof. R. Rad durch Kreuzung von Pdx1Cre-, Kras^{LSL-G12D} - und Rosa26^{LSL-PB}-Mäusen (letztere enthalten die piggyBac-Transposase) entwickelt wurden. Durch die Verwendung von Transposasen des piggyBac-Transpositions-Modells kommt es zur zufälligen Insertion von Transposon-Gensequenzen (mit bis zu über 100 Insertionen pro Gen) über einen copy-paste-Mechanismus an unterschiedlichen Stellen im Genom der Tiere. Die so entstandenen Mausmodelle entwickelten in über 90% Pankreastumore, von denen jeder genetisch und morphologisch individuell ist (Rad et al., 2015).

2.6 Ethikvotum und Tierversuchsantrag

Über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Proben wurden von der Ethikkommission der Technischen Universität München in den Ethikvoten Nummer 548/16s: „Angiogenese-Neurogenese-Interaktionen im Pankreas- und Kolonkarzinom“ und Nummer 550/16s: "Molekulare Marker der Neuropathie und der nervalen Invasion" positiv entschieden.

Die histologischen Schnitte wurden von der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Roland Rad (II Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar der TU München) zur Verfügung gestellt. Diese stammen aus seiner Forschungszeit in Cambridge, UK, und wurden 2015 im Journal Nature Genetics publiziert (Rad et al., 2015). Die Tierexperimente wurden von ihm damals im Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridgeshire, UK, unter Einhaltung der Regularien der „Animal Scientific Procedures Act 1986“ durchgeführt.

3. Methoden

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Pufferherstellung

3.1.1.1 TBST-Puffer

Zur Herstellung des TBST-Puffers werden 24g Trizma® Base und 85g Natriumchlorid (NaCl) in 800 ml destilliertem Wasser (aqua dest) gelöst. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 5N Salzsäure (HCl) auf den Wert 7,4 gesenkt. Nun wird die Lösung auf 1000ml aufgefüllt und man erhält 1 Liter 10xTBS Stock, der durch 1:10fache Verdünnung und Zugabe von 1ml Tween® pro Liter TBS zur 1xTBST-Pufferlösung verdünnt werden kann.

3.1.1.2 Citratpuffer

21g Citronensäure Monohydrat werden in 500ml aqua dest. gelöst. Durch Zugabe von 5N Natronlauge (NaOH) wird der pH-Wert auf 6 eingestellt. So erhält man den 20x Citratpuffer. Die für die Immunhistochemie nötige Verdünnung ist 1:20.

3.1.1.3 Triton x100 in PBS

Um den PBS-Puffer herzustellen, werden 9,55g PBS Dulbecco in 1l aqua dest. gelöst. Anschließend wird die Lösung mit 0,5% Triton x100 versetzt. In diesem Fall entspricht die zugesetzte Menge Triton 5ml für 1Liter PBS-Lösung.

3.1.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Um Paraffinschnitte nach der Hämatoxilin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) zu färben, müssen die Schnitte zunächst 3 mal 10 Minuten in Roticlear entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe – 3 Minuten pro Küvette – rehydriert werden. Nach 3 Minuten in destilliertem Wasser werden die Schnitte für 8 Minuten im Hämalaunfarbstoff belassen und anschließend 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dann folgt der Färbeschritt mit Eosin für 60 Sekunden. Die Schnitte werden anschließend kurz in 70%igem Ethanol geschwenkt und danach über die aufsteigende Alkoholreihe bis in das Roticlear gesetzt, in dem sie wieder 3 mal 10 Minuten verbleiben. Abschließend werden die Schnitte mit ausreichend großen Deckgläsern mit Vectamount™ permanent mounting medium eingedeckt und zum Trocknen über Nacht belassen.

3.1.3 Immunhistochemie-Immunfluoreszenz-Triplefärbung: CD31, S100, CK19

Die zur Färbung hergestellten Paraffinschnitte von humanem Pankreas- und Colonkarzinom- sowie murinen Pankreaskarzinomgewebe wurden anhand des folgenden Protokolls gefärbt (S. Tab.9). Hierbei wurden pro Patient bzw. Tier jeweils 2 Schnitte gefärbt, wobei ein ausreichender Abstand von mindestens 10 konsekutiven Schnitten zwischen beiden verwendeten Proben sichergestellt wurde. Ziel der Färbung war es, CD31⁺-Blutgefäße, S100⁺-Nerven und CK19⁺-Tumorzellen simultan auf einem Schnitt abzubilden. Die Blutgefäße werden in der Färbung durch die Verwendung von DAB-Farbstoff braun dargestellt, die Nerven magentafarben (HistoMark Red) und die Tumorzellen in der Immunfluoreszenz grün. Intermittierend konnten wir eine unspezifische zusätzliche Fluoreszenzfärbung der Nerven auf den Schnitten erkennen. Dies könnte durch die CK-19-Expression intranervaler Lymphgefäße bedingt sein (Cheng et al., 2012).

Tabelle 9: Protokoll zur Immunhisto-Immunfluoreszenz-Triplefärbung mit CD31-S100-CK19-Antikörpern

1) IHC CD 31		
Deparaffinisation	Roticlear	3x10 min
Rehydratation	Ethanol 100%	3x3 min
	95%	3 min
	70%	3 min
	50%	3 min
Wash	Aqua dest.	5 min
Wash	TBST (immer: 1x)	5 min
Ag-Retrival	Citratpuffer 1x 600 Watt 180 Watt	Bis zum Siedepunkt 10 min
Cooling	Offener Deckel	20 min
Wash	TBST	5 min
Permeabilisation	Wet Box, Clear&Dry Slides; Dako Pen: Draw Circle 0,5% Triton in PBS	5 min
Wash	TBST	5 min
Hydrogen Peroxidase Treatment	30% auf 3% verdünnen in Aqua dest	5 min
Wash	TBST	5 min

Proteinblock	Goat serum	1h bei RT
Primär-AK	Abcam CD31 (Rabbit) Ab28364 1:400 in TBST	Über Nacht im Kühlschrank
Wash	TBST	3x10 min
Sekundär-AK	Envision System HRP Anti Rabbit (Dako)	1h bei RT
Wash	TBST	3x10 min
Farbreaktion	DAB 1 Tropfen aus small bottle in 1000ul Puffer aus big bottle stop in water	1:30 min
Wash	Aqua dest	10 min
Wash	TBST	5 min
2) IHC S100		
Proteinblock	Horse Serum	1h bei RT
Primär-AK	S100 Millipore (Maus) MAB079-1 1:1000 in TBST	Über Nacht im Kühlschrank
Wash	TBST	3x10 min
Sekundär-AK	Anti Maus biotinyliert von KPL	45 min bei RT
Wash	TBST	3x10 min
Verstärkungsreakton	Streptavidin-Phosphatase von KPL	45 min bei RT
Wash	TBST	3x10 min
Substratreaktion	Epi 1: 5 ml Aqua dest mit 500ul buffered substrat solu- tion Epi 2: 100 ul red mit 100 ul Activator (3 min) Mischen, sofort verwenden Stop in aqua dest	1:30 min
Wash	Aqua dest	10 min
Wash	TBST	10 min
Proteinblock	Goat serum	1h bei RT
3) IF CK19		
Primär-AK	CK 19 von Millipore (Maus) SC53258 1:300	Über Nacht im Kühlschrank
Wash	TBST	3x10 min
Sekundär-AK	488 Anti Maus 1:200 + DAPI 1:30000	1h bei RT
Wash	TBST abgedeckt	3x10 min
Eindecken	Dako Fluorescent Mounting Medium (nass)	
Kühlschrank	Alumappe	

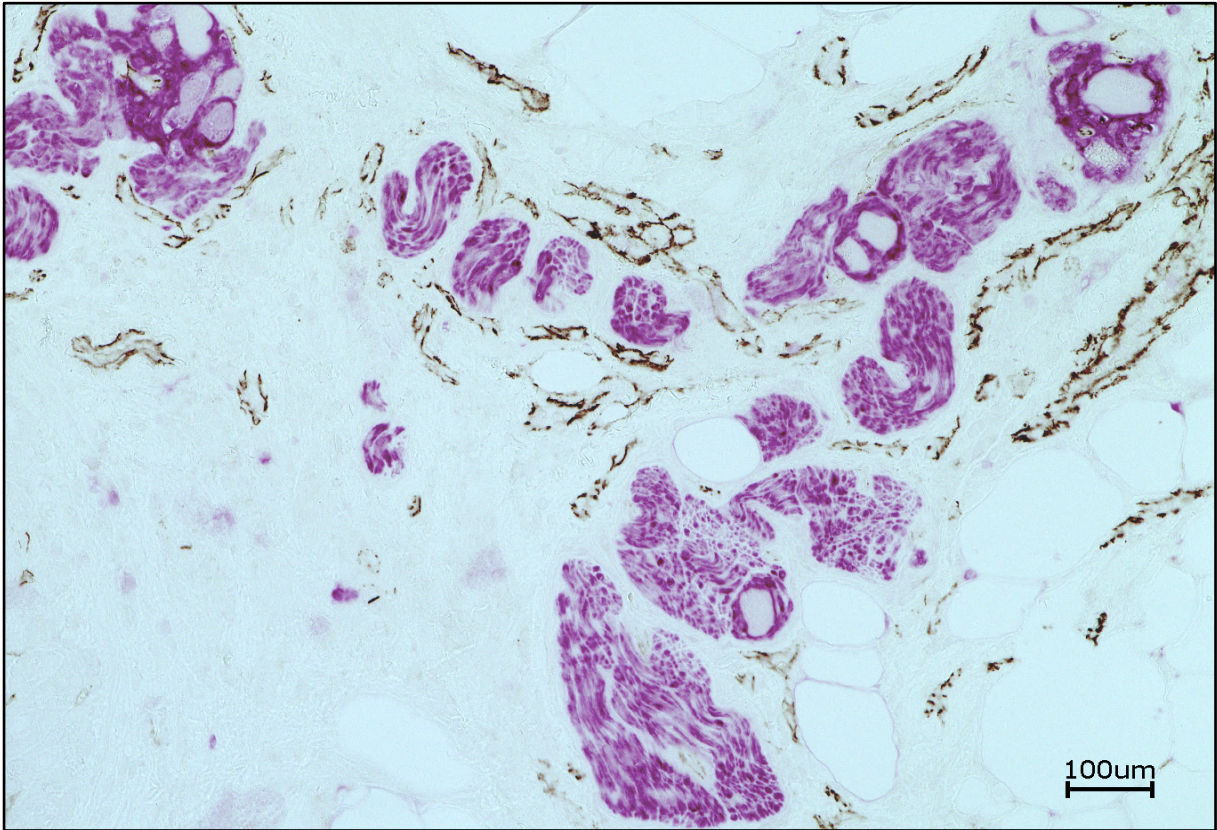


Abbildung 9: Intrapankreatisches Ganglion und umgebende GefäÙe in der IHC-IF Triplefärbung (humanes PDAC)

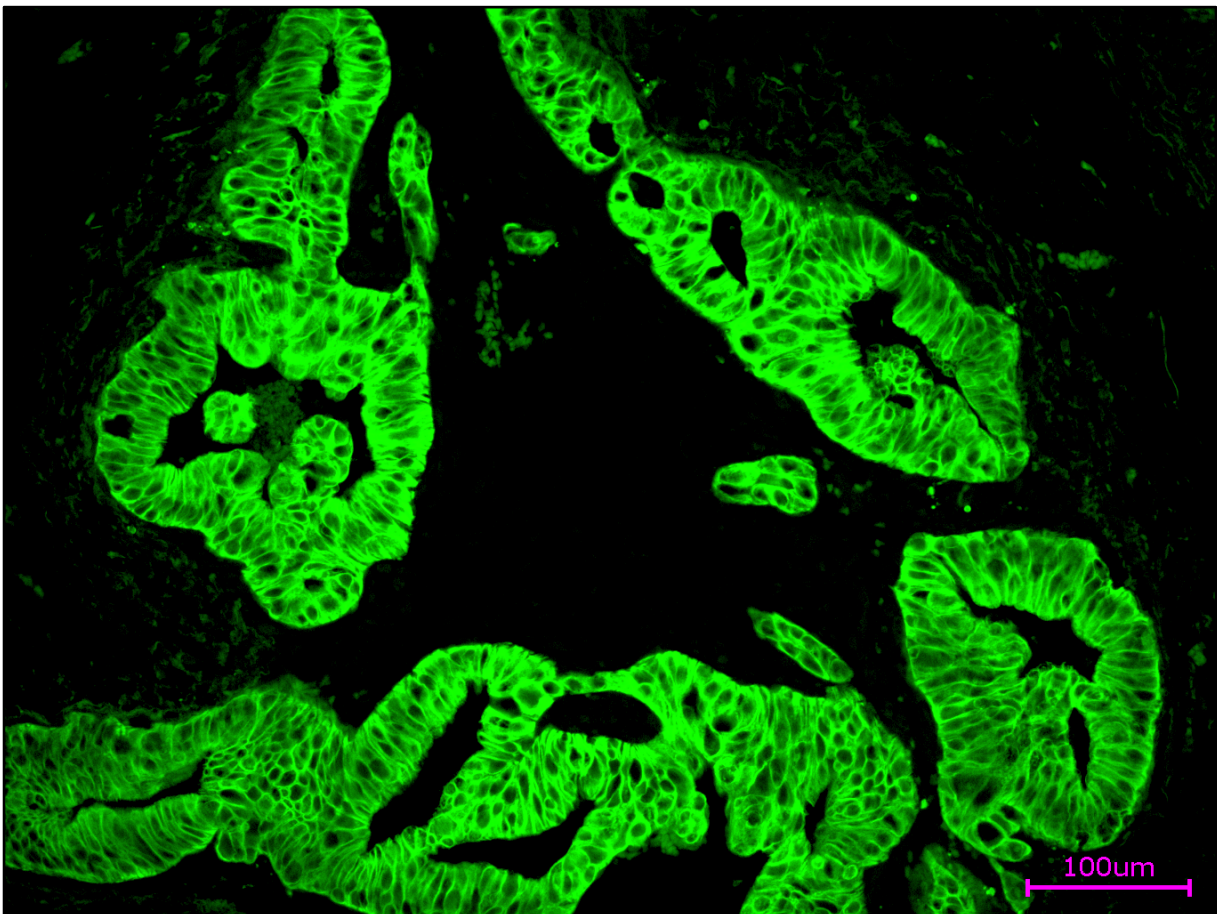


Abbildung 10: Pankreaskarzinomzellen in der IHC-IF-Triplefärbung (humanes PDAC)

3.1.4 PGP 9.5-Hämalaun-Färbung der Mausschnitte

Die Triplefärbung aus Tabelle 1 zeigte bei den Schnitten der piggyBac-Mäuse bezüglich der Detektion von Blutgefäßen und Nerven spezifische und gute Ergebnisse. Die Morphologie der Tumorzellen unterschied sich jedoch stark von denen der humanen Tumorzellen. Zudem waren die einzelnen Zellen in der Cytokeratinfärbung teilweise schwer gegenüber benignen Zellen abzugrenzen. Daher wurde zur Auswertung der neuralen Invasion der Maustumoren auf eine andere PGP95- und Hämalaun-basierte Färbemethode zurückgegriffen (S.Tab.10). Gefärbt wurden jeweils ausschließlich konsekutive Paraffinschnitte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass je zwei aufeinanderfolgende Schnitte annähernd identische histologische Informationen beinhalteten.

Tabelle 10: Protokoll zur PGP9.5-Hämalaunfärbung

PGP 9.5		
Deparafinisation	Roticlear	3x10 min
Rehydratation	Ethanol 100%	3x3 min
	95%	3 min
	70%	3 min
	50%	3 min
Wash	Aqua dest.	5 min
Wash	TBST (immer: 1x)	5 min
Ag-Retrival	Citratpuffer 1x 600 Watt 180 Watt	Bis es kocht 10 min
Cooling	Offener Deckel	20 min
Wash	TBST	5 min
Permeabilisation	Wet Box, Clear&Dry Slides; Dako Pen: Draw Circle 0,5% Triton in PBS	5 min
Wash	TBST	5 min
Hydrogen Peroxidase Treatment	30% auf 3% verdünnen in Aqua dest	5 min
Wash	TBST	5 min
Proteinblock	Goat serum	1h bei RT
Primär-AK	PGP 9.5 aus Rabbit 1:2000 in TBST	Über Nacht im Kühlschrank
Wash	TBST	3x10 min
Sekundär-AK	Envision System HRP Anti Rabbit (Dako)	1h bei RT
Wash	TBST	3x10 min
Farbreaktion	DAB 1 Tropfen aus small bottle in 1000ul Puffer aus big bottle stop in water	2:00 min
Wash	Aqua dest	10 min
Wash	TBST	5 min
Gegenfärbung	Hämalaun	3,5 min
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	15 min
Dehydratation	Ethanol 70%	5 min

	95% 100% Roticlear	3 min 3x3 min 3x10 min
Eindecken	Vectamount™ mounting medium und Deckgläser	
Trocken	Unter dem Abzug	Einige Stunden

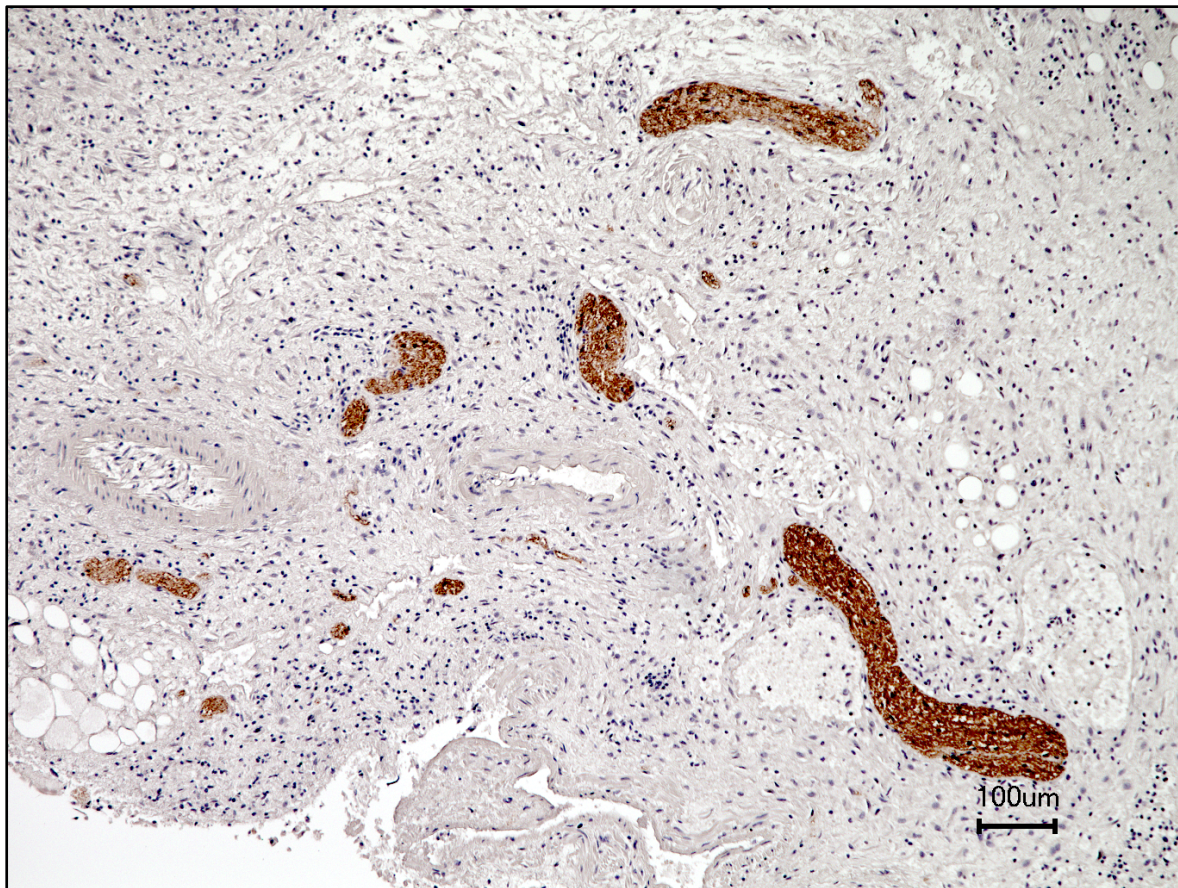


Abbildung 11: Nerven im murinen PDAC, PGP9.5-Hämalaufärbung

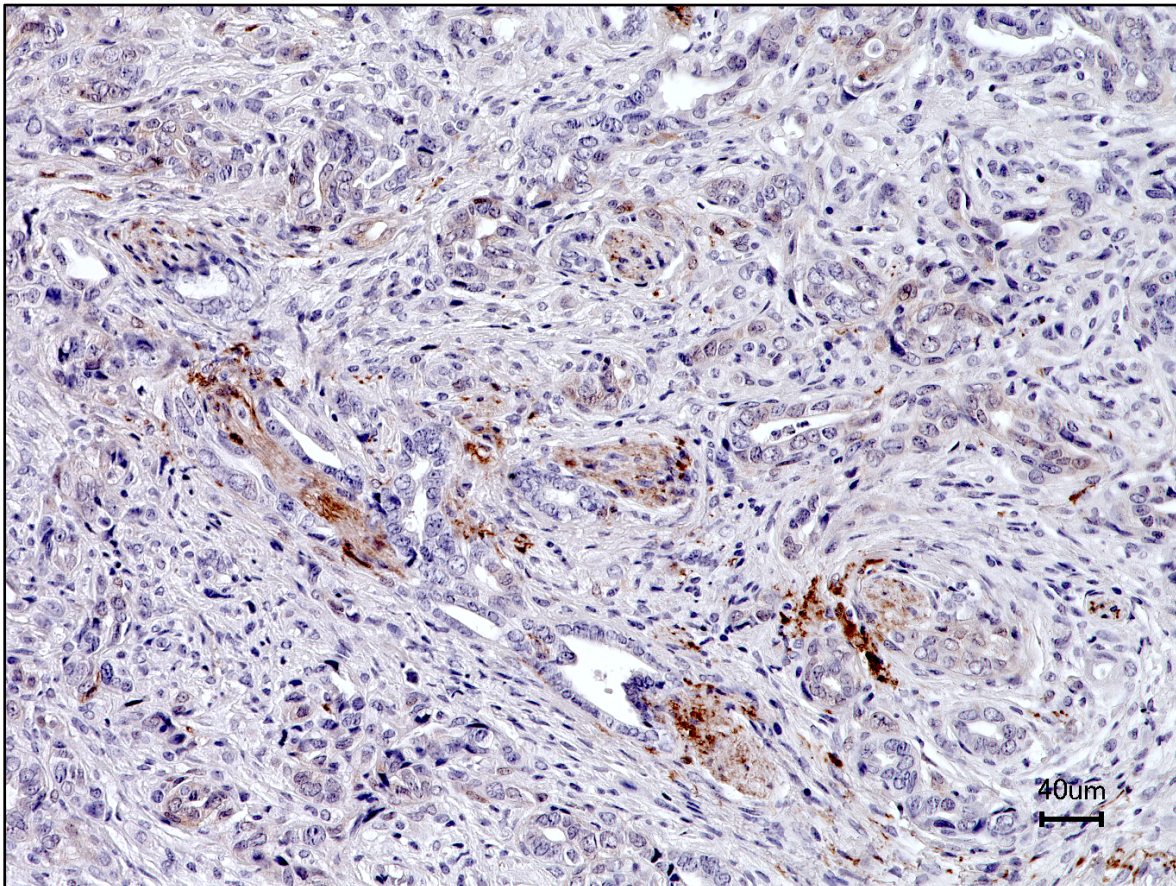


Abbildung 12: Ausgeprägte Nerv-Tumor-Interaktion mit peri- und endoneuraler Invasion im murinen PDAC, PGP9.5-Hämälänufärbung

3.2 Mikroskopische Erfassung des gesamten Gewebeschnittes

Mithilfe der zugehörigen Software des Keyence© Fluoreszenzmikroskop können im Viewer-Modus Merged-Aufnahmen erstellt werden. Hierbei handelt es sich um großflächige Aufnahmen, die durch Zusammensetzen vieler Einzelbilder entstehen. Um Merged-Bilder zu erstellen, müssen die Koordinaten der vier Eckpunkten des Gewebes im Mikroskop eingestellt werden. Dabei ist zu beachten, dass die Funktion „Z-Stack“ aktiviert ist. Auch die jeweilige Höhe auf der Z-Achse des Mikroskops muss so eingestellt sein, dass das Gewebe maximal scharf erfasst wird. Die Merged-Funktion muss im Menü aktiviert und ein Weißabgleich durchgeführt werden. Danach kann mit der Aufnahme der Einzelbilder begonnen werden. Das Mikroskop unterteilt den ausgewählten Bereich in kleine Einheiten und fährt das Gewebe ab, wobei kontinuierlich Aufnahmen gemacht werden. In der Analyzer-Software des Mikroskops kann der Ordner mit den Einzelbildern geladen werden und unter der Option „Merge“ werden die Bilder zu einem fusioniert. Dieses Bild wird gespeichert und enthält die Information des gesamten Gewebeschnittes, die durch die jeweilige Färbung erfasst wurden.

3.3 Erhebung der Gewebefläche und Quantifizierung der Blutgefäße und Nerven

Zur Erfassung der histologischen Informationen anhand der etablierten Triplefärbung wurde das Programm ImageJ verwendet. Zunächst wurde unter dem Menüpunkt „Analyze“ eine Messskala kalibriert, die bei der Aufnahme der Bilder anhand einer gespeicherten Skala festgelegt wurde. Um die Gewebegröße zu erfassen, musste das jeweilige Merged-Bild zunächst unter dem Menüpunkt „Image“ in ein 16-Bit-Bild umgewandelt. Von diesen Graustufen konnte über den Threshold unter demselben Menüpunkt die Fläche erhoben werden. Die Blutgefäße und Nerven wurden erfasst, indem im „Color-Threshold“ die Einstellungen optimal auf den braunen beziehungsweise magentafarbenen Farbton, die Farbhelligkeit und Farbintensität eingestellt wurden. ImageJ erfasste über diese Einstellung die Quantität und die Größe der einzelnen Gefäße oder Nerven. Im Anschluss war es möglich, aus den erhobenen Daten auch die Dichte der Nerven und Gefäße und den Anteil der innervierten und vaskularisierten Gewebefläche zu berechnen.

3.4 Erhebung der neuralen Invasion

Um das Ausmaß der neuralen Invasion zu erfassen, wurde am Fluoreszenzmikroskop der komplette Gewebeschnitt gesichtet und jeder Nerv auf Invasion hin untersucht. Hierbei wurde im speziellen darauf geachtet, wo sich Überschneidungen zwischen den roten Nerven und den fluoreszierenden Tumorzellen ergaben. Es wurde zwischen peri- und endoneuraler Invasion unterschieden, und für das Vorliegen pro Nerv je 1 Punkt vergeben und dann die Summe für endo- bzw perineurale Invasion pro Schnitt gebildet. Aus der Summe der einfach gewerteten perineuralen Invasion und der doppelt gewerteten endoneuralen Invasion wurde der NI-Severity-Score gebildet. Er wird gebildet aus der Invasionssumme, die durch die Gesamtanzahl an Nerven des betreffenden Schnittes geteilt und in Prozent angegeben wird.

Da die Tumorzellfärbung mit Hilfe des CK-19-Antikörpers am Mausgewebe weniger eindeutig ausfiel, wurde für die Auswertung der murinen Schnitte auf die obengenannte alternative Färbung zurückgegriffen, bei der die Nerven mit DAB braun gefärbt wurden und zur Identifikation der Tumorzellen die Kernmorphologie anhand einer Hämalaungegenfärbung erfolgte. Die Vergabe von Punkten für das Vorliegen neuraler Invasion, und die Unterscheidung von peri- und endoneural erfolgte exakt wie bei den humanen Schnitten.

3.5 RNA-Isolation

Die Isolation wurde in einer Kombination aus Trizol- und der RNeasy-Mini-Kit®-Methode von Qiagen durchgeführt. Zunächst werden zugehörige Mahlkugeln des Mikro-Dismembrator S von Sartorius in RNase-Zap und danach in 100% Ethanol inkubiert, bis sie getrocknet sind. Die Anzahl der Kugeln entspricht hierbei der Anzahl der Proben zur RNA-Gewinnung. Je eine Kugel wird anschließend in ein steriles Schraubtube gegeben und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zentrifuge wird anschließend auf 4°C gekühlt. Nun werden auf Trockeneis jeweils circa 4x4mm kleine Gewebeprobe der tiefgefrorenen Tumorgewebestücke abgetrennt und in jeweils eines der Schraubtubes, die zuvor mit Mahlkugeln versehen und beschriftet wurden, gegeben. Je 4 Schraubtubes mit Gewebe beladen können dann in das Schüttelgefäß eingespannt werden und der Homogenisationsprozess für 2x20 sec. bei einer Frequenz von 3000 rpm kann gestartet werden. Im Anschluss müssen sofort jeweils 1ml Trizol und 200µl Chloroform auf die Proben gegeben werden. Nach intensivem vortexen und durchmischen der

Probe wird möglichst der komplette Inhalt des Schraubtubes in ein frisches RNase/DNase-freies Tube pipettiert und die Proben 15 min bei 12.000 rpm in der gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss kann die Temperatur der Zentrifuge wieder auf 23°C Raumtemperatur eingestellt werden. Nun wird möglichst viel des klaren Überstandes der Tubes in neue Tubes pipettiert. Hierbei ist darauf zu achten, dass keine Kontamination mit dem trizolhaltigen Sediment stattfindet. Zum pipettierten Überstand werden nun 450 µl Isopropanol pipettiert und durchmischt. Die Suspension wird 10 min bei RT inkubiert.

Ab hier wurde das RNeasy Plus Mini Kit Quick-Start Protokoll von Qiagen ab Schritt 4 verwendet. 700 µl der Probe werden in ein rosa RNeasy-spin-column, das in ein 2ml collection-tube plaziert wurde, pipettiert und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen und, falls noch Probenüberstand übrig ist, auch dieser in dieselbe spin column pipettiert und der obengenannte Schritt wiederholt. Nun folgen verschiedene Waschschrte mit 700 µl RW1-Puffer (15 sec.), 500 µl RPE-Puffer (15 sec.) und 500 µl RPE-Puffer (2 min.). Das 2 ml collection tube wird durch ein frisches ersetzt und 60 sec. bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Das collection tube wird durch ein neues 1,5 ml collection tube ersetzt und 40 µl RNase freies H₂O in die spin column pipettiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 60 sec ist die RNA in den 40 µl H₂O im 1,5 ml collection tube ausgewaschen und die spin column kann verworfen werden. Die RNA-Lösung wird auf Eis gelagert und eine Konzentrationsmessung mit Hilfe eines Microvolume Spectrophotometers durchgeführt werden. Die Proben werden bei -80°C gelagert.

3.6 Quantitative Realtime-PCR-Arrays

Mit den histologischen Daten, die aus der Immunfluoreszenz-Immunhistologischen Triplefärbung gewonnen wurden, wurden anhand der Mittelwerte Gruppeneinteilungen der Patientenproben in 4 Subgruppen vorgenommen. Unterschieden wurden hierbei Gruppen mit jeweils hoher und niedriger Vaskularisation (entspricht dem prozentualen Flächenanteil an Blutgefäßen am Gesamtgewebe) und Innervation (prozentualer Flächenanteil an Nerven im Verhältnis zur gesamten Gewebefläche). Die so erhaltenen Subgruppen bestanden aus n=22 (hohe Innervation) und n=23 (niedrige Innervation) und n=22 (hohe Vaskularisation) und n=23 (niedrige Vaskularisation) im PDAC. Als Cut-Off-Wert zwischen hoch und niedrig wurde jeweils der Mittelwert gewählt. Im humanen Colonkarzinom bestanden die Gruppen hohe Vaskularisation und hohe Innervation aus jeweils n=8 Patienten und die Gruppen mit niedrigen Werten aus jeweils n=15 Proben. Alle Proben wurden auf die gleiche Konzentration verdünnt und anhand der Gruppeneinteilung gepoolt. Mit Hilfe des RT²-First-Strand-Kits wurden die gepoolten RNA-Proben im Mastercycler® ep gradient S von Eppendorf© in cDNA umgeschrieben. Aus der so gewonnenen cDNA wurde mit dem RT²-qPCR-Master-Mix von Qiagen eine Lösung erstellt und verschiedene RT²-Profiler-PCR-Arrays erstellt, um eine Transkriptomanalyse in den verschiedenen Gruppen durchzuführen. Zum einen Ermöglichen die Arrays die Identifikation besonders bedeutsamer Gene, die im humanen Pankreas- und Colonkarzinom für eine verstärkte Angiogenese beziehungsweise Neurogenese verantwortlich sind. Da es sich um quantitative Untersuchungen handelt, ist es zudem möglich, das Ausmaß der Genregulation in den verschiedenen histologischen Gruppen innerhalb einer Tumorart festzustellen. Außerdem ist es möglich, organübergreifend die Expressionsmuster von Pankreas- und Colonkarzinom zu vergleichen.

3.6.1 Neurotrophine&Rezeptoren RT²-Profiler-PCR-Array

Im humanen Neurotrophine&Receptors RT²-Profiler-PCR-Array von Qiagen wurde die Expression von 84 Genen, die mit neuronalen Prozessen assoziiert sind, untersucht. Das Array beinhaltet Primer für Gene von Neurotrophinen, Neuropeptiden und deren Rezeptoren. Die Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der Neurone, Zytokine, Zytokinrezeptoren und andere pathwayassoziierte Faktoren werden ebenfalls untersucht (Qiagen, 2010b). Ziel der Untersuchung war es, die Gene zu identifizieren, die für die Regulation der Neurogenese in den jeweiligen Tumorarten eine besondere Rolle spielen.

3.6.2 Angiogenese RT²-Profiler-PCR-Array

Mithilfe des Humanen Angiogenese RT²-Profiler-PCR-Arrays von Qiagen konnte die Genexpression von 84 Genen, die für die Angiogenese eine wichtige Rolle spielen, untersucht werden. Mit inbegriffen sind Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren der Neoangiogenese, Zytokine, Chemokine, Proteasen, deren Inhibitoren und Matrix-Adhäsionsmoleküle (Qiagen, 2010a).

3.7 Statistische Auswertung

3.7.1 Triplefärbung

Die durch die Triplefärbung erhaltenen Parameter zu Vaskularisation und Innervation wurden einer Korrelation nach Spearman unterzogen. Korreliert wurden die durchschnittliche Gefäßmit der durchschnittlichen Nervengröße, der Anteil der vaskularisierten mit dem Anteil der innervierten Gewebefläche am Gesamtgewebe und die Gefäßmit der Nervendichte. Des Weiteren wurde das Ausmaß der neuralen Invasion mit der Vaskularisation (anteilige vaskularisierte Fläche in %), der Innervation (anteilige innervierte Fläche in %), der Gefäßdichte und der Nervendichte korreliert. Für die Subgruppenanalyse wurden anhand der Mittelwerte cut-off Werte gesetzt und vier Gruppen gebildet: Hohe und niedrige Vaskularisation und hohe und niedrige Innervation. Verglichen wurden dann Gruppen, bei denen jeweils zwei Merkmalsausprägungen berücksichtigt wurden: Die Gruppe von Patienten, die sowohl hohe Vaskularisation als auch hohe Innervation zeigten, die Gruppe Patienten, die im Hinblick auf beide Merkmale geringe Werte aufwiesen und 2 reziproke Gruppen mit hoher Vaskularisation oder Innervation und dem entsprechend niedrigen anderen Merkmal. Die Subgruppen wurden durch eine Anova untereinander auf das Ausmaß neuraler Invasion hin verglichen. Auf diese Art wurden die humanen Pankreas- und Colonkarzinomdaten und auch die zum murinen Pankreaskarzinom ausgewertet.

3.7.2 RT-PCR-Arrays

Zur quantitativen Auswertung der Arrays wurde die zugehörige Qiagen Software verwendet. Das Ausmaß der Gen Über- beziehungsweise Unterexpression wurde anhand der Realtime-Lightcycler-PCR erfasst (Abb. 26-28). Ab dem Faktor 2 wurde die Regulation als signifikant angenommen. Um einen Vergleich der einzelnen Gruppen zu ziehen, wurden für die Werte

der Gruppen mit hoher Vaskularisation bzw. Innervation jeweils die entsprechende Gruppe mit niedriger Vaskularisation/Innervation als Kontrollgruppen eingesetzt. Somit zeigen die im Ergebnisteil dargestellten Balkendiagramme die vergleichenden Ergebnisse einer hohen Merkmalsausprägung gegenüber einer niedrigen.

4. Ergebnisse

4.1 Immunfluoreszenz-Immunhistologische-Triplefärbung

Die unter Punkt 3.1.3 beschriebene Triplefärbung machte es möglich, an einem Gewebeschnitt simultan die Anzahl und Größe der vorhandenen Blutgefäße und Nerven zu erfassen. In Relation zur Gewebefläche konnten außerdem die Dichte der Blutgefäße und Nerven und der relative innervierte und vaskularisierte Gewebeanteil berechnet werden. Da auch die Tumorzellen spezifisch gefärbt wurden, konnte zusätzlich das Vorhandensein und Ausmaß der neuralen Invasion und der Angioinvasion erfasst werden. Die Zielsetzung war herauszufinden, ob statistische Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern vorliegen. Die Ergebnisse für die verschiedenen Tumorgewebe werden im Folgenden dargestellt.

4.1.1 Die Korrelationsanalyse der Innervation mit der Vaskularisation und der neuralen Invasion im humanen Pankreaskarzinom

Im humanen Pankreaskarzinom zeigen sich zwischen der durchschnittlichen Gefäß- und der durchschnittlichen Nervengröße statistisch signifikante positive Zusammenhänge ($p=0,0013$). Auch der vaskularisierte (Anzahl der Gefäße pro mm^2) und innervierte (Anzahl der Nerven pro mm^2) Gewebeanteil korrelieren positiv ($p=0,04$) (Abb. 14 A und B). Somit zeigt sich, dass sich die Angio- und Neurogenese im humanen Pankreaskarzinom konkordant vorliegen, da bei steigender Gefäßgröße auch die Nervengröße zunimmt. Tumoren mit einem höheren Anteil vaskularisierter Gewebefläche zeigen gleichzeitig einen höheren Anteil innervierter Fläche an der Gesamtfläche.

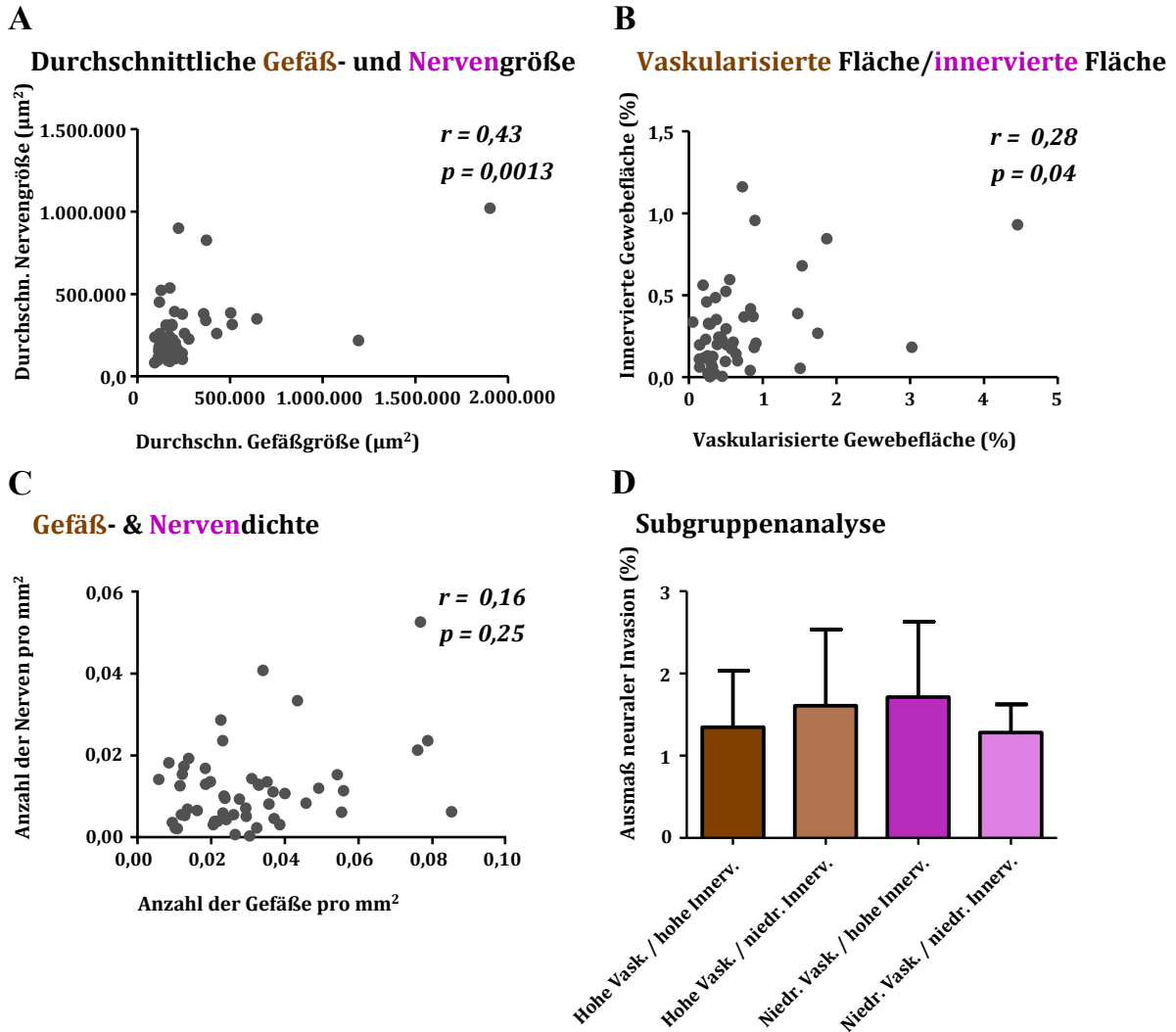


Abbildung 13: Durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße (A), Vaskularisierte und innervierte Fläche (B), Gefäß- und Nervendichte (jeweils Gefäß- bzw. Nervenanzahl pro mm^2) (C) und Subgruppenanalyse für das Ausmaß neuraler Invasion (D) im humanen PDAC

Wird das Ausmaß der neuralen Invasion mit den Werten zu Vaskularisation und Innervation korreliert, so zeigt sich, dass zwischen Vaskularisation und neuraler Invasion kein Zusammenhang besteht (Abb. 15 E und G) Zwischen dem Ausmaß der neuralen Invasion und dem Anteil der innervierten Gewebefläche zeigt sich eine starke Tendenz einer positiven Korrelation ($p=0,059$). Wenn also der Anteil des Gewebes, der von Nerven durchzogen ist, groß ist, so zeigt ein Tumor häufiger auch einen Befall der Nerven durch Tumorzellen. Ist hingegen nur ein geringer Anteil des Gewebes von Nerven durchzogen, zeigt sich auch seltener neurale Invasion (Abb. 15 F). In der Subgruppenanalyse zeigte sich bezüglich der Häufigkeit neuraler Invasion in den 4 Subgruppen eine homogene Verteilung. Lediglich die Gruppe mit niedriger Vaskularisation und gleichzeitig niedriger Innervation zeigte tendenziell weniger neurale Invasion im Vergleich zu den anderen Gruppen (Abb. 12 D).

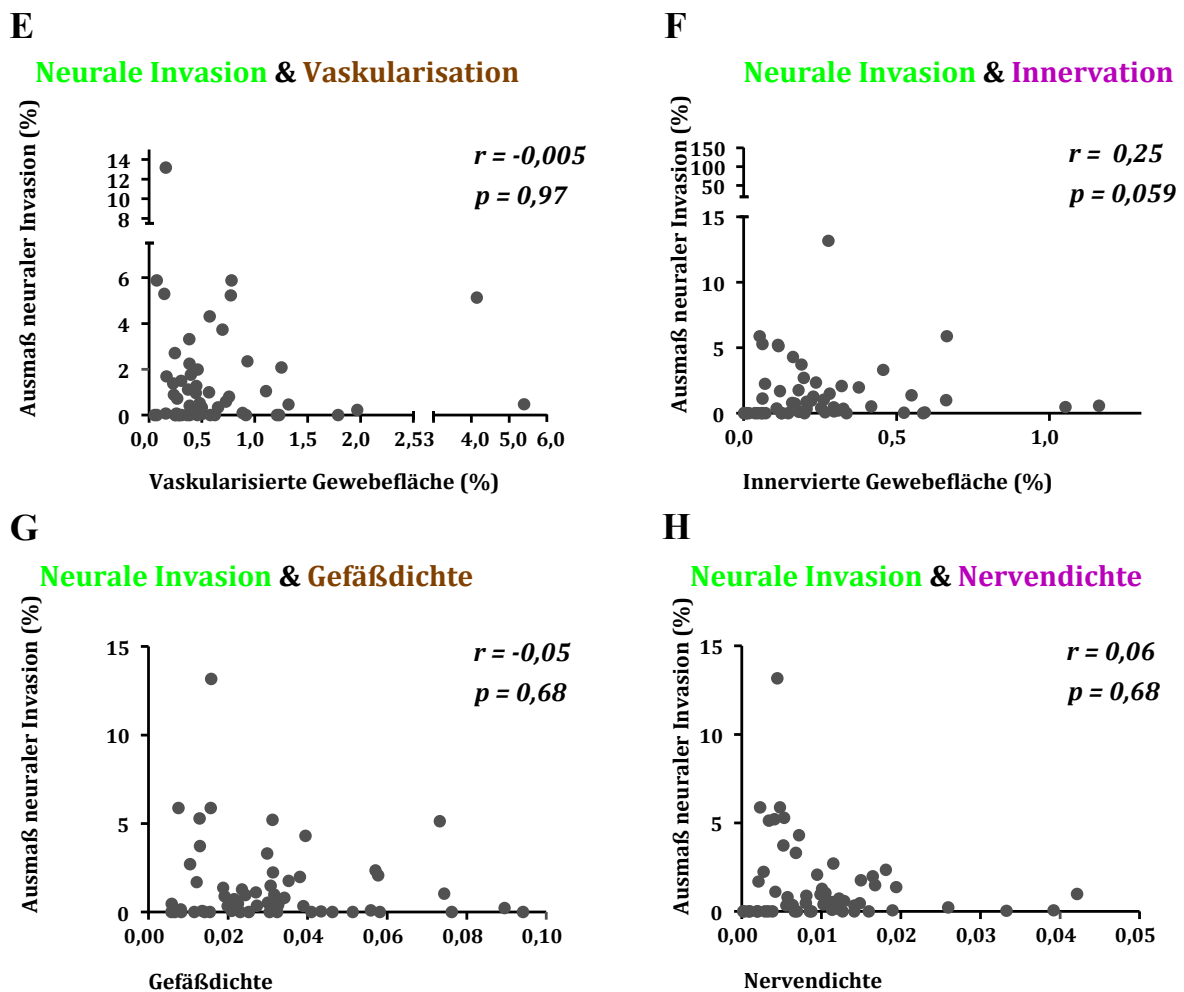


Abbildung 14: Neurale Invasion und Vaskularisation (E), neurale Invasion und Innervation (F), neurale Invasion und Gefäßdichte (G) und neurale Invasion und Nervendichte (H) im humanen PDAC

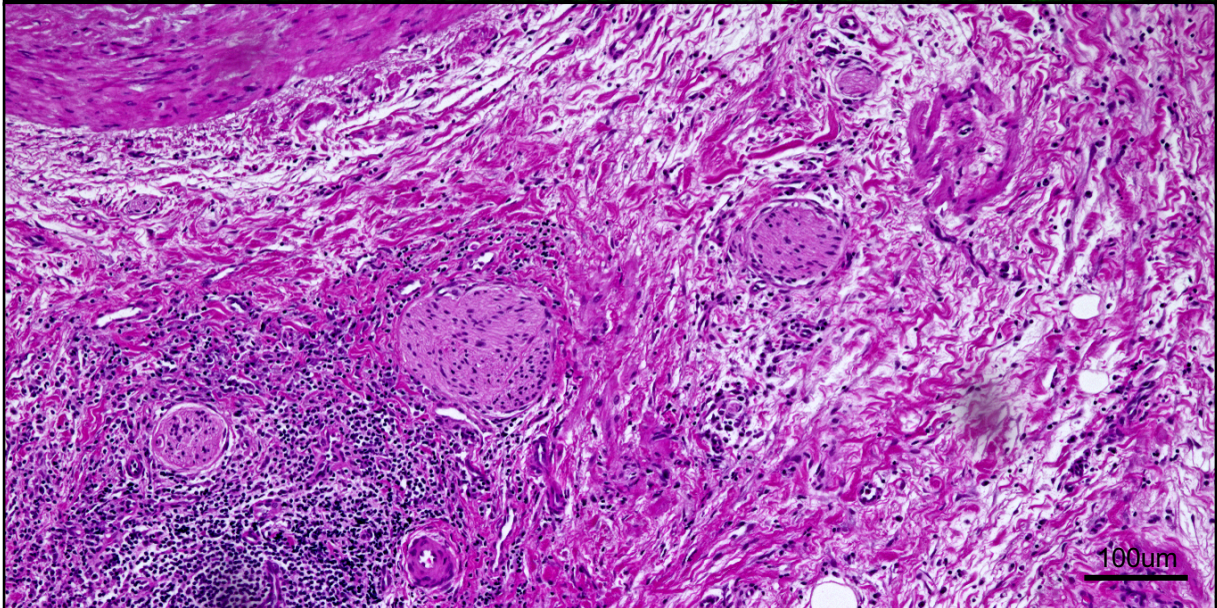
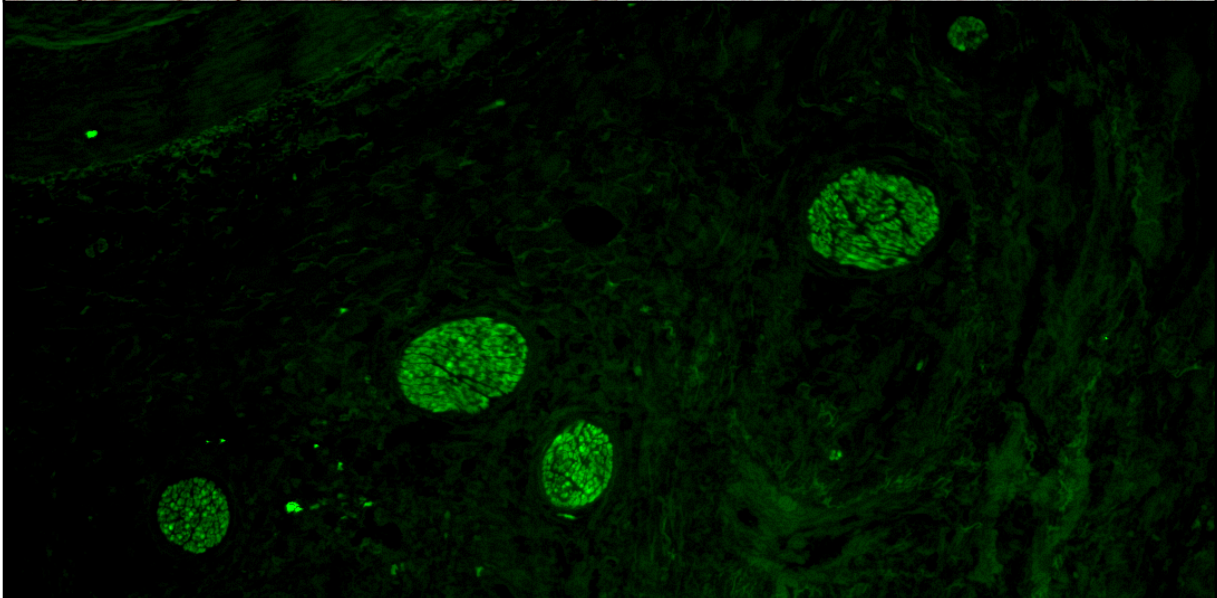
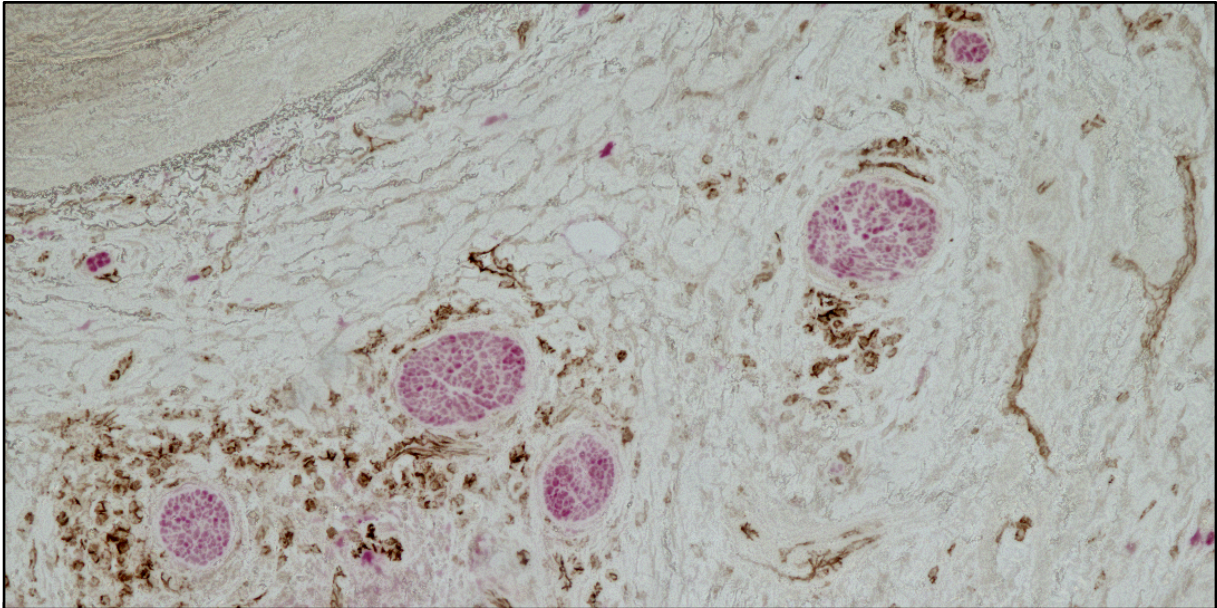


Abbildung 15: Hohe Innervation und hohe Vaskularisation im humanen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung

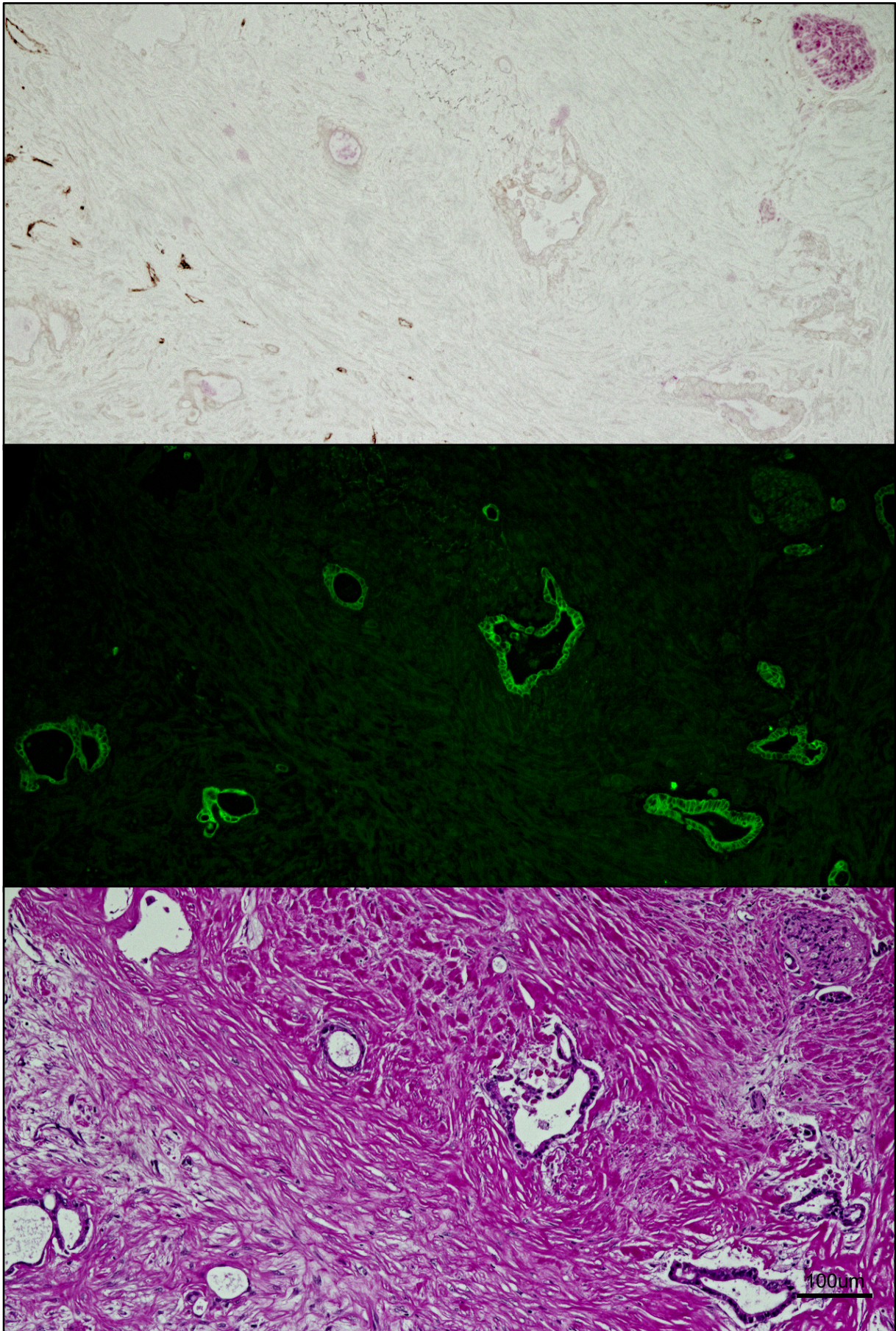


Abbildung 16: Niedrige Innervation und niedrige Vaskularisation im humanen PDAC in der Triplefärbung und der H.E.-Färbung

4.1.2 Die Korrelationsanalyse der Innervation mit der Vaskularisation und der neuralen Invasion im murinen Pankreaskarzinom

Im murinen Pankreaskarzinom zeigt sich – wie im humanen PDAC – zwischen der vaskularisierten Gewebefläche und der innervierten Gewebefläche eine positive Korrelation. Mit steigendem Gewebeanteil, der von Blutgefäßen durchzogen ist, nimmt auch die Fläche, die von Nerven versorgt wird, ebenfalls zu ($p=0,006$) (Abb. 17 B). Zwischen Gefäß- und Nervengröße zeigt sich im Gegensatz zum humanen PDAC kein Zusammenhang (Abb. 17 A).

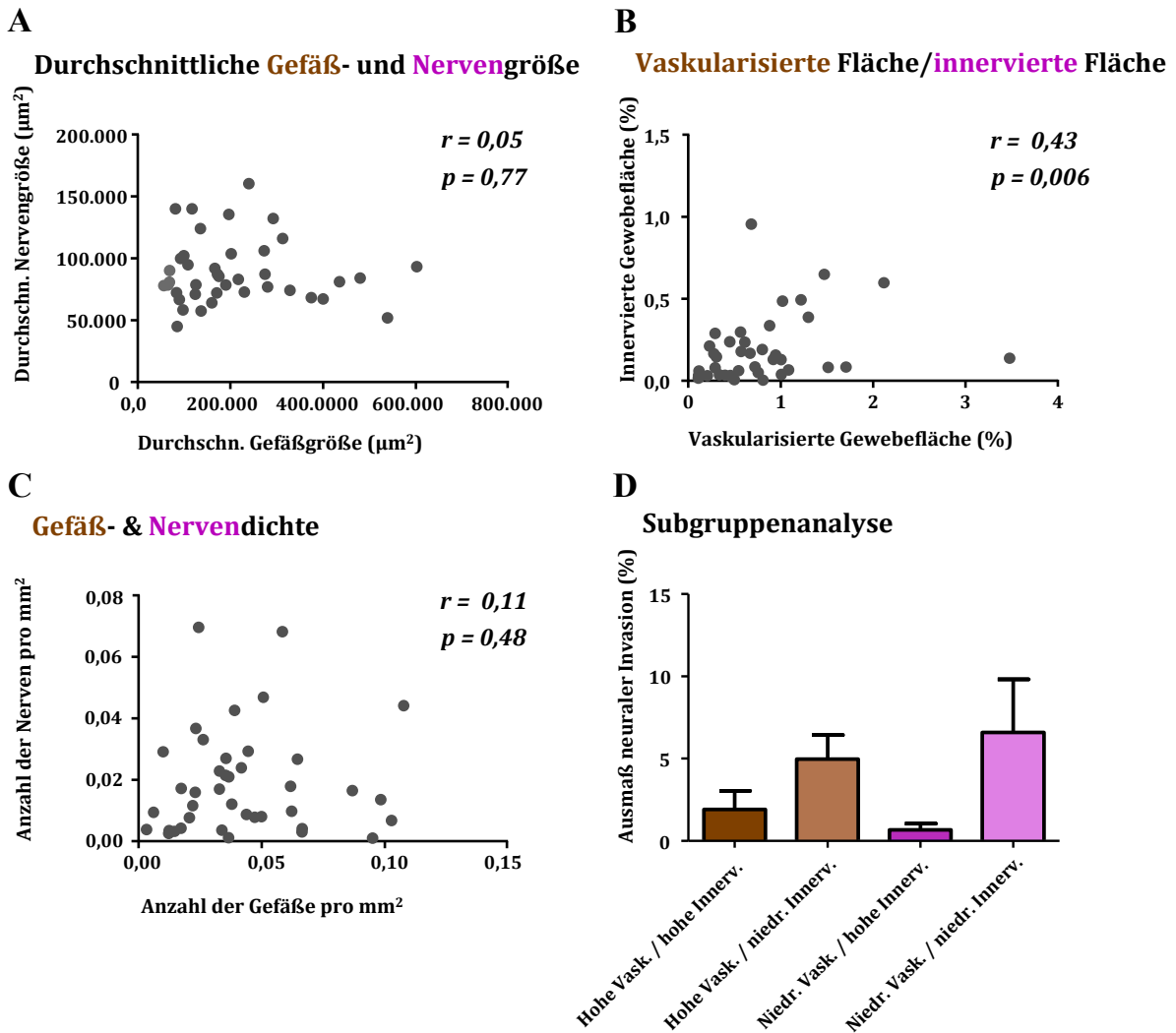
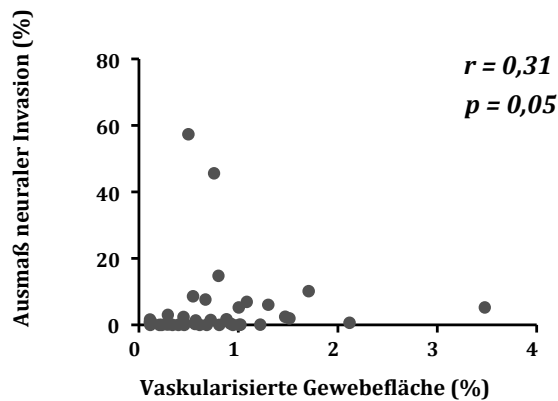


Abbildung 17: Durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße (A), Vaskularisierte und innervierte Fläche (B), Gefäß und Nervendichte (C) und Subgruppenanalyse für das Ausmaß neuraler Invasion (D) im murinen PDAC

Auch der positive Zusammenhang zwischen Innervation und neuraler Invasion, der bei den humanen Tumoren nachweisbar war, fehlte bei den murinen Tumoren (Abb. 18 F und H). Jedoch zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der neuralen Invasion und der vaskularisierten Gewebefläche. Eine gesteigerte Vaskularisation scheint in den murinen Tumoren mit häufiger neuraler Invasion einherzugehen ($p=0,05$) (Abb. 18 E). In der Subgruppenanalyse zeigt sich ein geringer Anteil neuraler Invasion in den Subgruppen, die hohen Innervation beinhalten. Die beiden Gruppen, die niedrige Innervation zeigen, weisen häufiger neurale Invasion auf (Abb. 18 D).

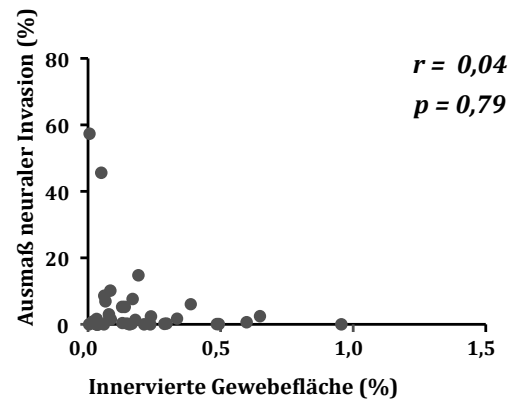
E

Neurale Invasion & Vaskularisation



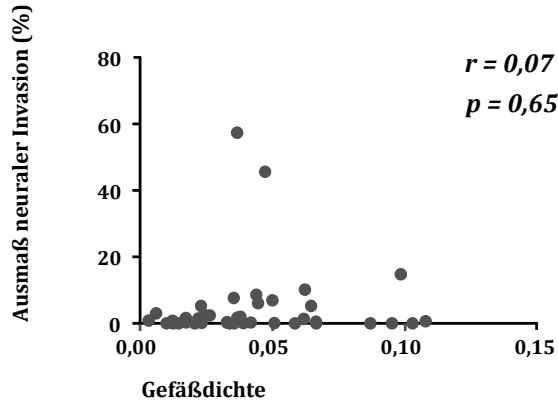
F

Neurale Invasion & Innervation



G

Neurale Invasion & Gefäßdichte



H

Neurale Invasion & Nervendichte

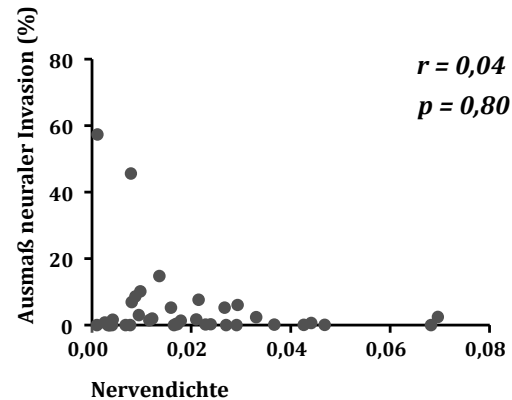


Abbildung 18: Neurale Invasion und Vaskularisation (E), neurale Invasion und Innervation (F), neurale Invasion und Gefäßdichte (G) und neurale Invasion und Nervendichte (H) im murinen PDAC

Um das variierende Ausmaß der Vaskularisation in den murinen Tumormodellen anschaulich darzustellen, wurde ein Balkendiagramm erstellt, das den Anteil der vaskularisierten Fläche im Verhältnis zur Gesamtgewebefläche in Prozent darstellt. Es wurden die ersten 12 Tiere im Ranking als „hoch“ eingestuft. Dabei zeigte ein Cutoff von 1% vaskularisierte Gewebefläche an, dass diese 12 Tiere über eine gesteigerte Vaskularisation im Vergleich zu den restlichen Tieren verfügen (Abb. 19 I). Dasselbe Verfahren wurde bezüglich des prozentualen Anteils der innervierten Fläche vollzogen. Der Cut-off-Wert wurde hier als 0,2% festgesetzt, was die 30% der Tiere mit den höchsten Werten abgrenzt. In der Folge lassen sich erneut 12 Tiere mit überdurchschnittlich stark innerviertem Tumor identifizieren (Abb. 19 J). In Abbildung 20 ist die Häufigkeit der Nerv-Tumor-Interaktion dargestellt. Sie zeigt Vorstufen der neuralen Invasion an, nämlich die räumliche Annäherung von Tumorzellen und peripheren Nerven. Der Cut-off-Wert von 5% identifiziert die 11 Tumormodelle, bei denen die stärkste Interaktion zwischen Nerven und Tumor vorliegt (Abb. 20). Durch diese Klassifikation der piggyBac-Maustumoren ist es in Zukunft möglich, auf Tumoren mit erwünschten Merkmalsausprägungen bezüglich Vaskularisation, Innervation und Tumor-Nerv-Interaktion zurückzugreifen.

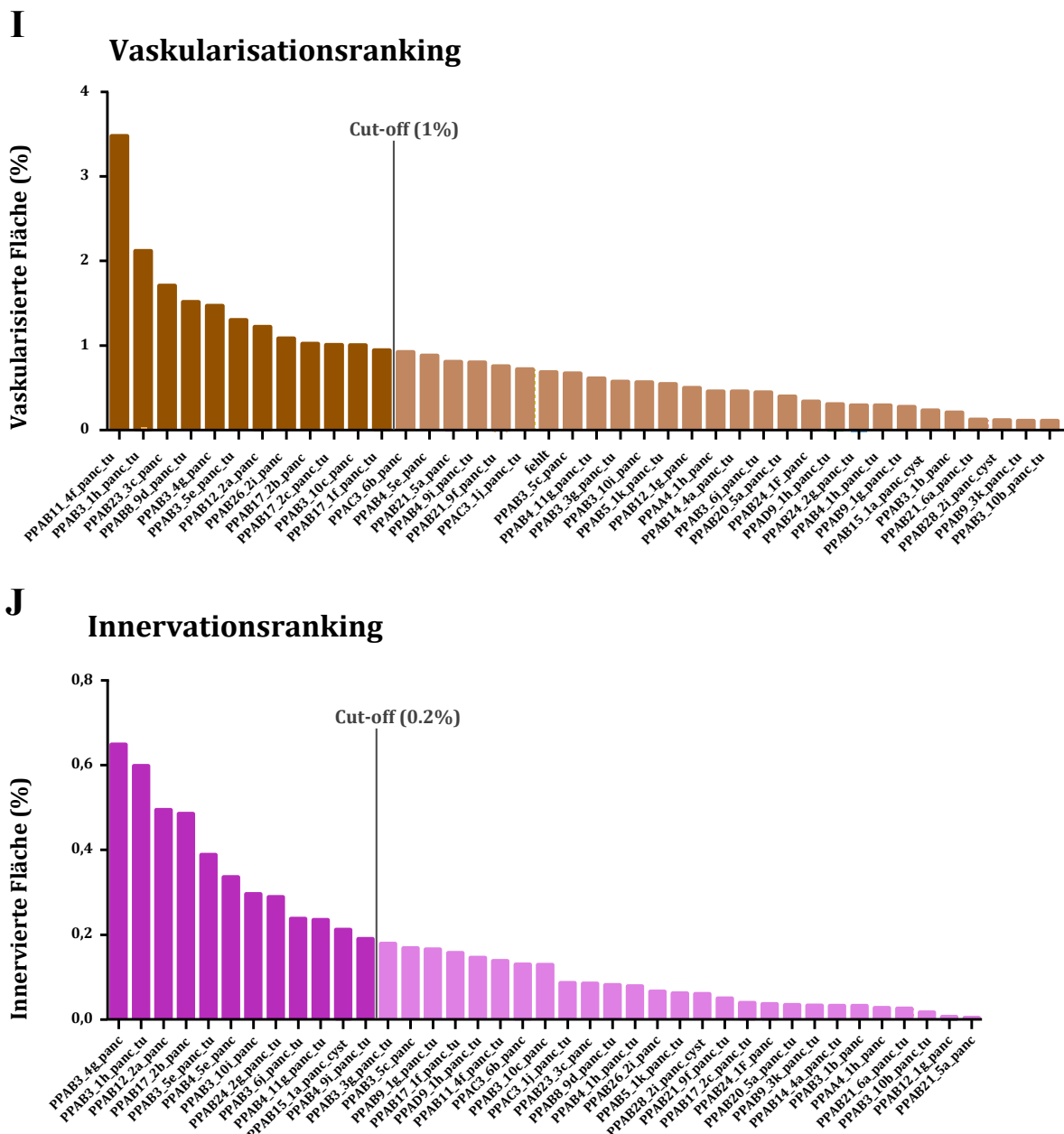


Abbildung 19: Innervationsranking (I) und Vaskularisierungsranking (J) der murinen PDACs

K

Tumorzell-Nerv-Interaktion

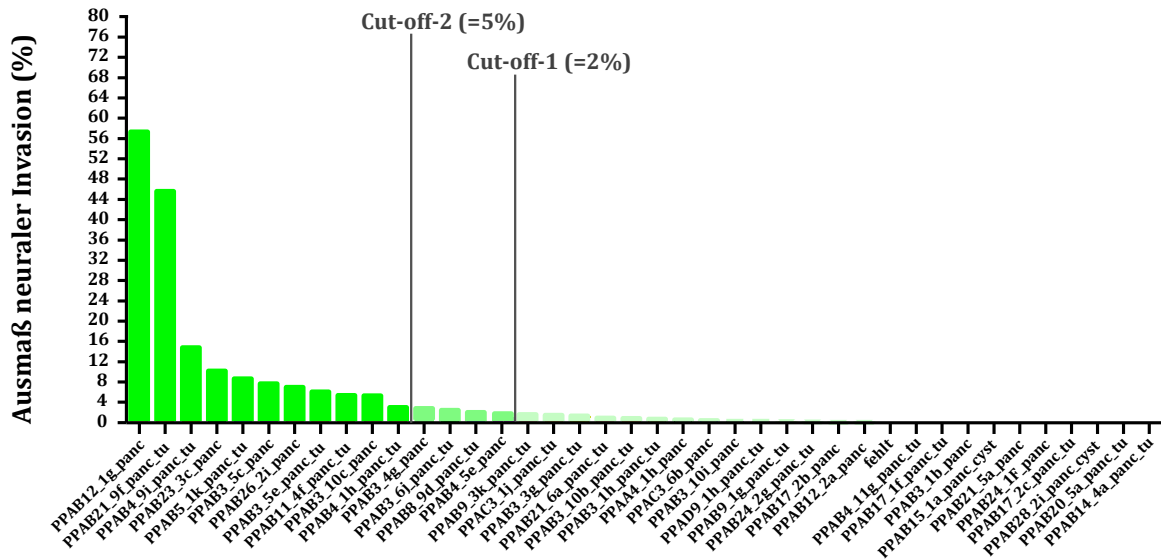


Abbildung 20: Ranking für das Ausmaß der Tumorzell-Nerv-Interaktion im murinen PDAC: Cut-off 1: 2% neurale Invasion zeigt 15 Tiere. Cut-off 2: 5% neurale Invasion identifiziert 11 Tiere mit häufigster neuraler Invasion. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtnervenanzahl.

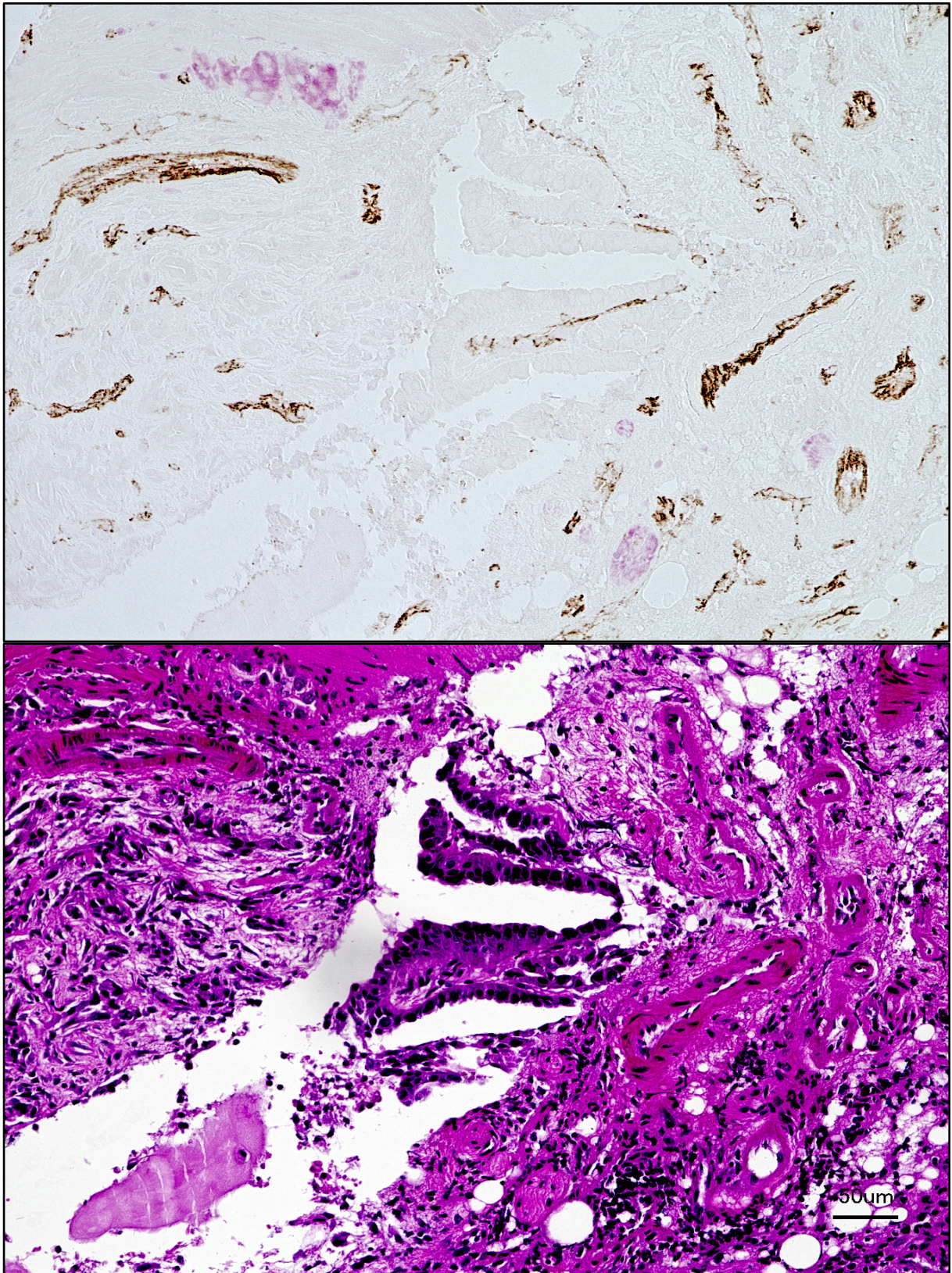


Abbildung 21: Nerven und Blutgefäße im murinen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung

4.1.3 Die Korrelationsanalyse der Innervation mit der Vaskularisation und der neuralen Invasion im humanen colorektalen Karzinom

Im humanen Colonkarzinom zeigte sich – wie auch im murinen und humanen Pankreaskarzinom – dass ein steigender Anteil vaskularisierter Gewebefläche mit einem konkordanten Anstieg der innervierten Gewebefläche einhergeht ($p=0,04$) (Abb. 24 B). Bezüglich der Dichte oder Größe der Gefäße und Nerven zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Abb. 24 A und C). Im humanen Colonkarzinom zeigte sich zwischen neuraler Invasion und vaskularisierter Gewebefläche eine inverse Korrelation. Zeigt ein Tumor ein größeres Ausmaß neuraler Invasion, so ist die Gewebefläche weniger stark vaskularisiert. Ein stärker vaskularisierter Tumor weist folglich eine geringere Anzahl invadierter Nerven auf ($p=0,046$) (Abb. 24 E). Korreliert man das Ausmaß neuraler Invasion mit dem Ausmaß der Innervation, der Nerven- oder Gefäßdichte zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge (Abb. 25 E, G, H). In der Subgruppenanalyse wird erneut der Effekt sichtbar, dass sich das hohe Ausmaß neuraler Invasion in den beiden Gruppen mit niedriger Vaskularisation zeigt. Die Subgruppe mit niedriger Vaskularisation bei gleichzeitig geringer Innervation zeigt hier am häufigsten neurale Invasion (Abb. 24 D).

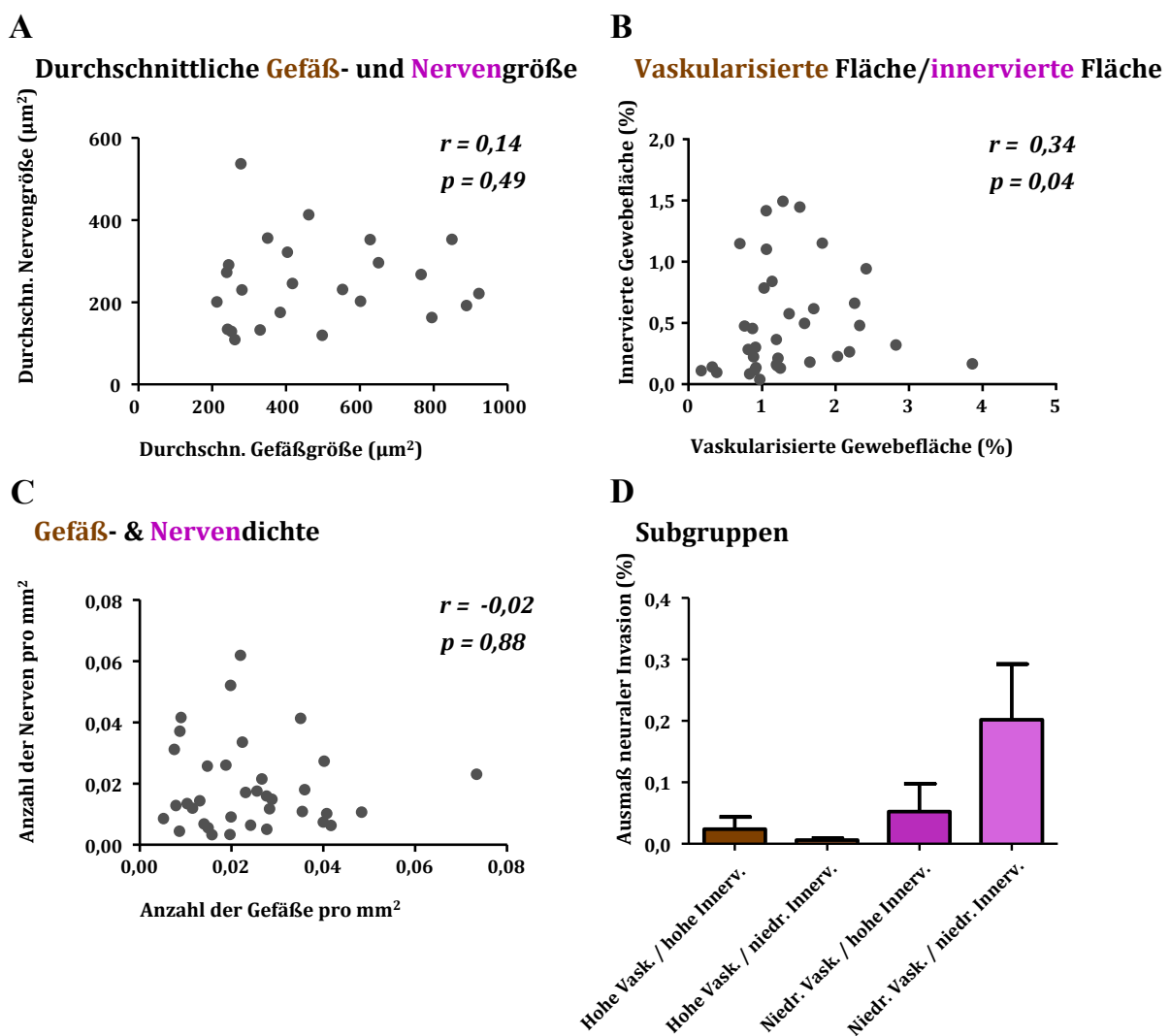


Abbildung 22: Durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße (A), Vaskularisierte und innervierte Fläche (B), Gefäß- und Nervendichte (C) und Subgruppenanalyse für das Ausmaß neuraler Invasion (D) im humanen CRC

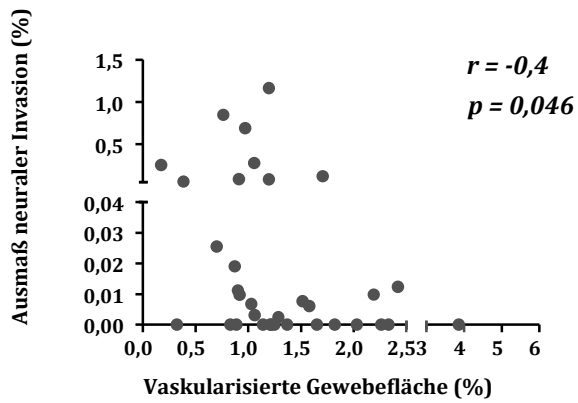
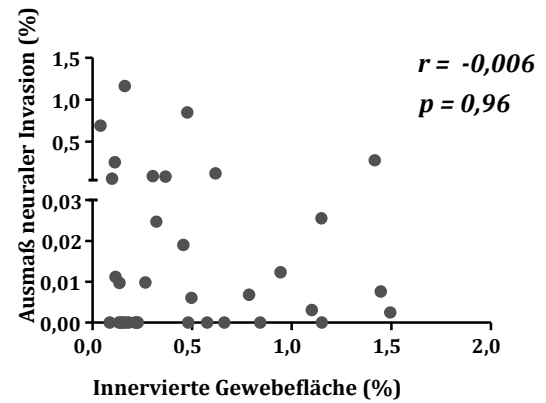
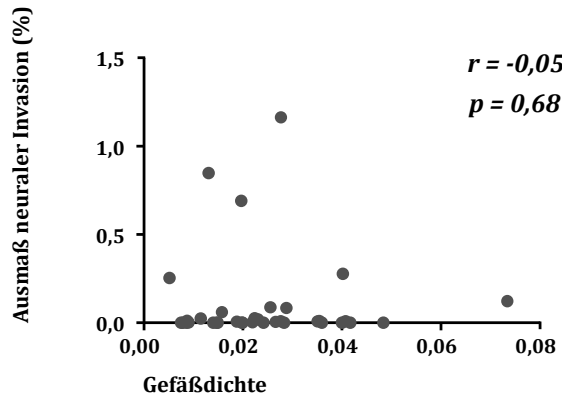
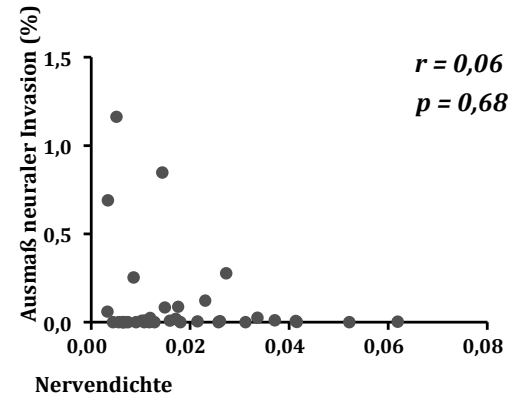
E**Neurale Invasion & Vaskularisation****F****Neurale Invasion & Innervation****G****Neurale Invasion & Gefäßdichte****H****Neurale Invasion & Nervendichte**

Abbildung 23: Neurale Invasion und Vaskularisation (E), neurale Invasion und Innervation (F), neurale Invasion und Gefäßdichte (G) und neurale Invasion und Nervendichte (H) im humanen CRC

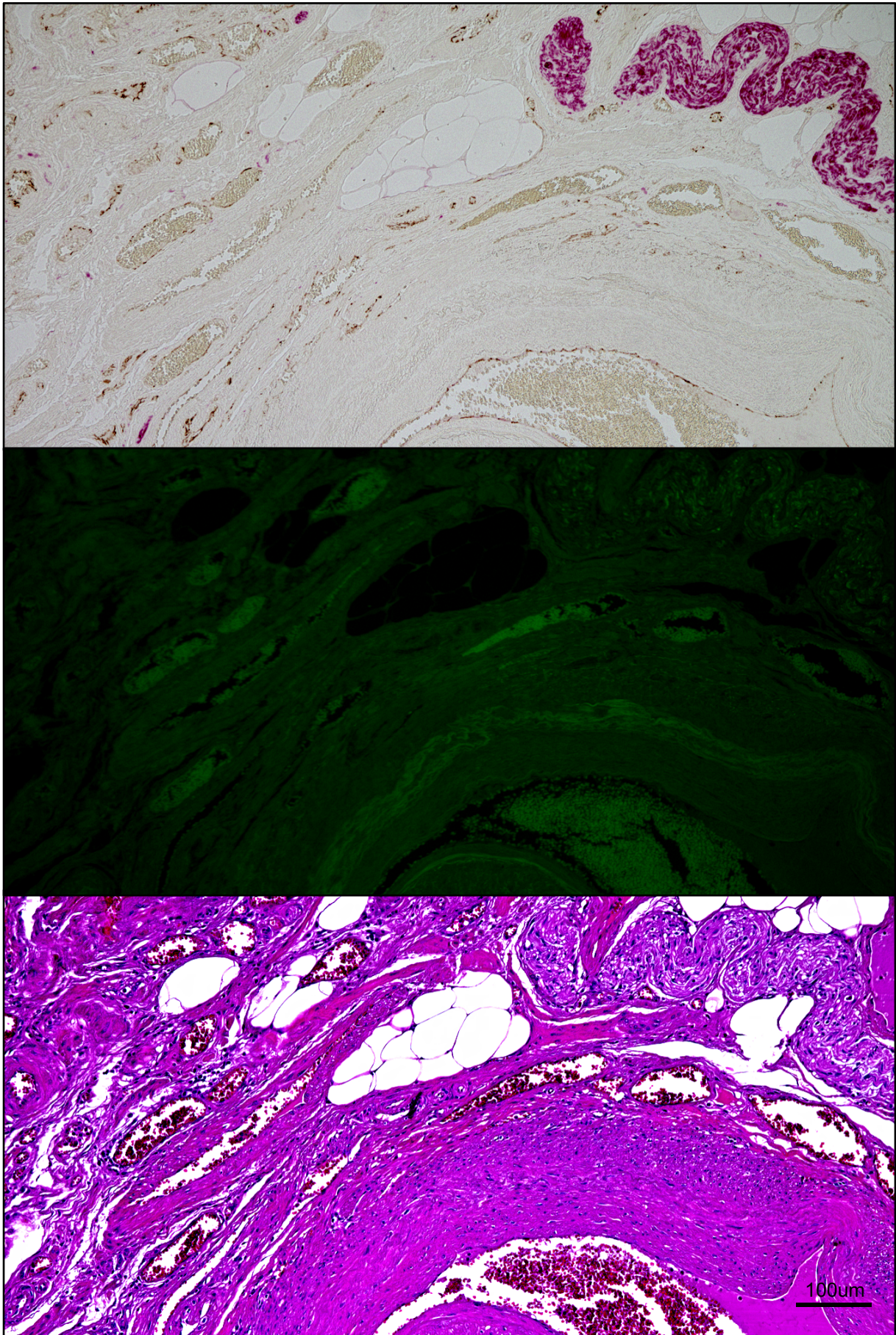


Abbildung 24: Hohe Innervation und hohe Vaskularisation im humanen Colonkarzinom in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung. (Tumorzellen zeigen sich im Colonkarzinom nicht in der Nähe der großen Blutgefäße)

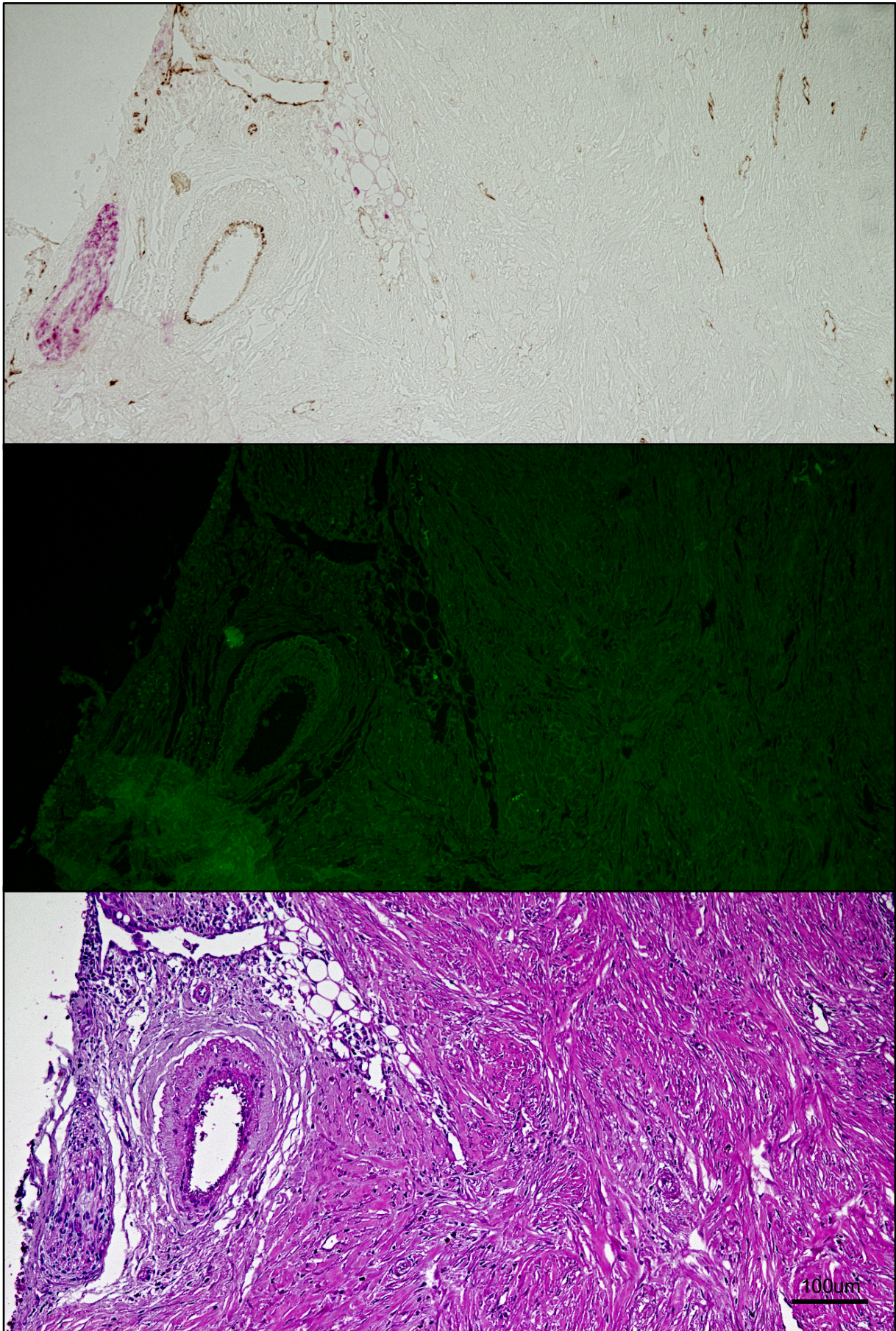


Abbildung 25: Niedrige Innervation und niedrige Vaskularisation im humanen Colonkarzinom in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung. (Tumorzellen zeigen sich im Colonkarzinom nicht in der Nähe der großen Blutgefäße)

4.2 Transkriptomanalyse

4.2.1 Transkriptomanalyse gesteigerter Angiogenese im humanen Pankreaskarzinom

In der Transkriptomanalyse des humanen PDAC zeigt sich eine signifikante Überexpression von 10 Genen in der Gruppe mit hoher Vaskularisation gegenüber der Gruppe mit niedriger Vaskularisation. Als signifikant wurde eine Regulation um Faktor $\geq \pm 2$ definiert. Am stärksten überexprimiert war das Enzym Matrix Metalloproteinase 9. (+ 4,5) (Abb. 26) Insgesamt zeigten 5 Gene eine reduzierte Expression, wobei der Faktor der Regulation jeweils bei ca. -2 lag.

A Hohe Angiogenese verglichen mit niedriger Angiogenese im Pankreaskarzinom

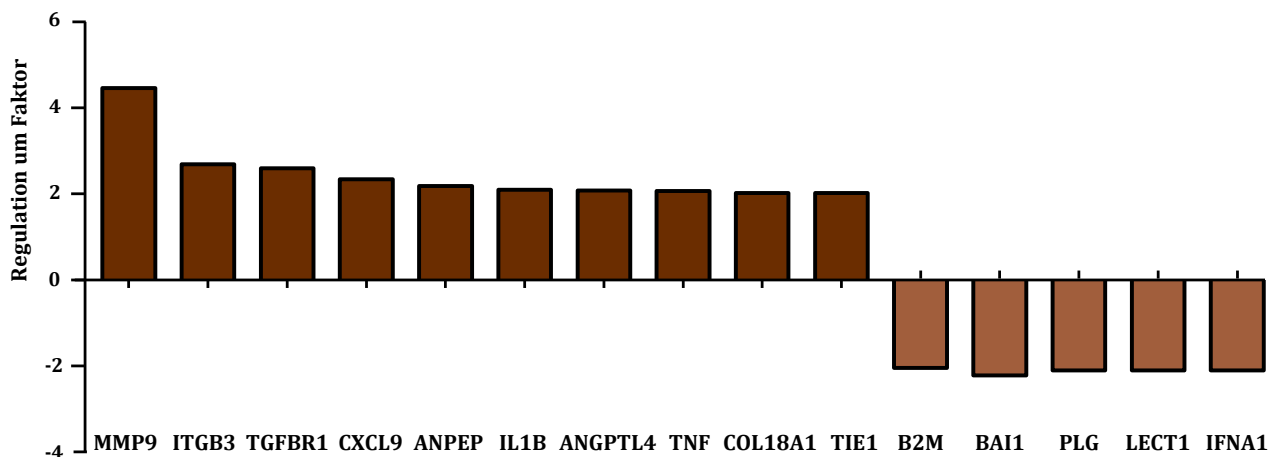


Abbildung 26: Expressionsmuster von angiogeneseassoziierten Genen im humanen PDAC: Hohe Vaskularisation versus niedrige Vaskularisation

Tabelle 11: Genexpression bei gesteigerter Angiogenese im humanen PDAC

Abkürzung	Name des Gens	Faktor
MMP9	Matrix metalloproteinase 9	+4,5
ITGB3	Integrin beta 3	+2,7
TGFBR1	TGF beta Receptor 1	+2,6
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	+2,3
ANPEP	Alanine aminopeptidase	+2,2
IL1B	Interleukin 1 beta	+2,1
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	+2,1
TNF	Tumor necrosis factor	+2,1
COL18A1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	+2,0
TIE1	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 TIE1 angiopoietin receptor	+2,0
B2M	Beta-2-microglobulin	-2,0
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor	-2,2
PLG	Plasminogen	-2,1
LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	-2,1
IFNA1	Interferon alpha 1	-2,1

4.2.2 Transkriptomanalyse gesteigerter Angiogenese im humanen Colonkarzinom

Im humanen Colonkarzinom zeigt sich im Vergleich der beiden Gruppen, dass lediglich zwei Gene in der Gruppe mit erhöhter Vaskularisation überexprimiert werden: Neuropilin 1 (+ 2,3) und Brain-specific angiogenesis inhibitor (+2,1). Acht Gene zeigten eine geringere Expression in der stark vaskularisierten Kohorte. Am stärksten herunterreguliert zeigten sich IGF-1 (- 3,3) und Leptin (-4,0) (Abb. 27).

B

Hohe Angiogenese verglichen mit niedriger Angiogenese im Colonkarzinom

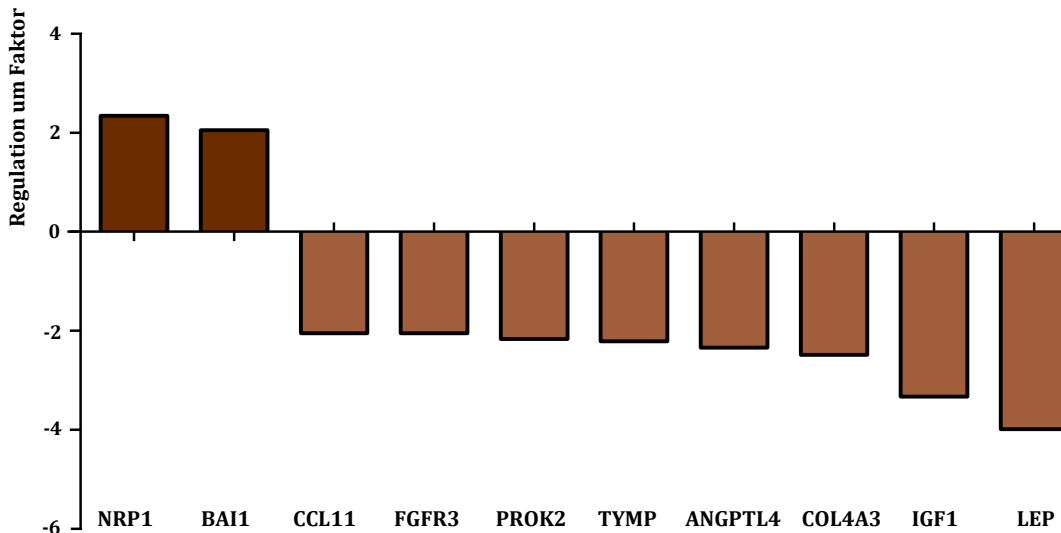


Abbildung 27: Expressionsmuster von angiogeneseassoziierten Genen im humanen CRC: Hohe Vaskularisation versus niedrige Vaskularisation

Tabelle 12: Genexpression bei gesteigerter Angiogenese im humanen Colonkarzinom

Abkürzung	Name des Gens	Faktor
NRP1	Neuropilin 1	+ 2,3
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor	+ 2,1
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	- 2,1
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3	- 2,1
PROK2	Prokineticin 2	- 2,2
TYMP	Thymidine phosphorylase	- 2,2
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	- 2,3
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	- 2,5
IGF1	Insulin-like growth factor 1	- 3,3
LEP	Leptin	- 4,0

Vergleicht man die Genexpression bezüglich der Vaskularisation im humanen Pankreas- und Colonkarzinom, so zeigt sich, dass im Pankreaskarzinom mehr Gene signifikant reguliert vorliegen, als im Colonkarzinom. (15 Gene im PDAC vs. 10 im CRC) Dieser Effekt ist womöglich durch die unterschiedliche Kohortengröße (n=55 beim PDAC, n=26 beim CRC) erklärbar. Außerdem zeigt sich deutlich, dass im Pankreaskarzinom mehr Gene überexprimiert werden, wohingegen im Colonkarzinom der Anteil an Genen, die weniger stark exprimiert werden, überwiegt. Auch das Ausmaß der Überexpression im PDAC überwiegt gegenüber dem Colonkarzinom. Die letzten beiden Unterschiede könnten eine komplexere und stärkere genetische Regulation im PDAC vermuten lassen. Somit zeigt sich insgesamt, dass im Pankreaskarzinom in den hier untersuchten Proben eine stärkere positive Regulation der Angiogenese herrscht, sowohl was die Anzahl der Gene betrifft als auch den Faktor der Regulation (Abb. 26, 27).

4.2.3 Transkriptomanalyse gesteigerter Neurogenese im humanen Pankreaskarzinom

Im nächsten Ansatz wurden im Pankreaskarzinom die Subgruppe mit hoher Neurogenese und niedriger Neurogenese hinsichtlich ihrer Genexpression in Bezug auf Neurotrophine&Rezeptoren verglichen. Es zeigen sich 19 signifikant regulierte Gene. Davon sind 9 überexprimiert und 10 herunterreguliert. Zu den am stärksten überesprimierten Genen gehören Interleukin 6 (+10,0), Tropoyosin Rezeptor Kinase A (+ 8,6) und Nuclear receptor subfamily 1 (+ 7,2). Am stärksten herunterreguliert war das Gen, das für Ciliary neurotrophic factor receptor codiert (- 4,7) (Abb. 28).

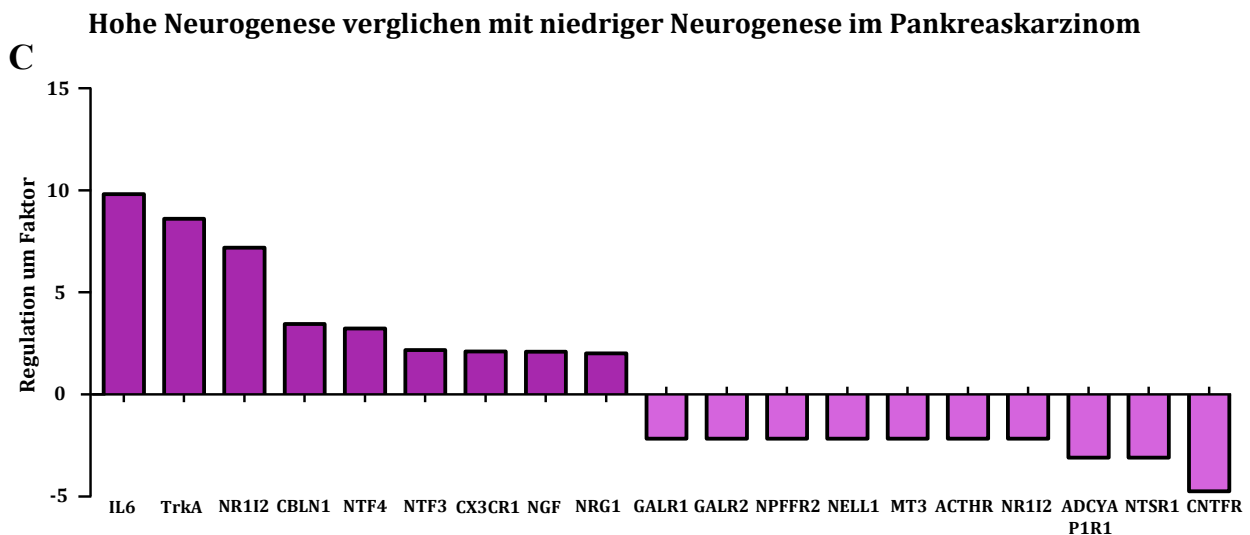


Abbildung 28: Expressionsmuster von neurogeneseassoziierten Genen im humanen PDAC: Hohe Neurogenese versus niedrige Neurogenese

Tabelle 13: Genexpressoion bei gesteigerter Neurogenese im humanen PDAC

Abkürzung	Name des Gens	Faktor
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	+ 10,0
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A, Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (NTRK1)	+ 8,6
NR1I2	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2	+ 7,2
CBLN1	Cerebellin 1 precursor	+ 3,5

NTF4	Neurotrophin 4	+ 3,2
NTF3	Neurotrophin 3	+ 2,2
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	+ 2,1
NGF	Nerve growth factor (beta polypeptide)	+ 2,1
NRG1	Neuregulin 1	+ 2,0
GALR1	Galanin receptor 1	- 2,2
GALR2	Galanin receptor 2	- 2,2
NPF2R2	Neuropeptide FF receptor 2	- 2,2
NELL1	NEL-like 1 (chicken)	- 2,2
MT3	Metallothionein 3	- 2,2
ACTHR	Melanocortin 2 receptor (adrenocorticotrophic hormone)	- 2,2
NR1I2	Neuropeptide Y receptor Y2	- 2,2
ADCYAP1R1	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I	- 3,0
NTSR1	Neurotensin receptor 1 (high affinity)	- 3,0
CNTFR	Ciliary neurotrophic factor receptor	- 4,7

4.2.4 Transkriptomanalyse gesteigerter Neurogenese im humanen Colonkarzinom

Im Colonkarzinom zeigt sich im Vergleich der beiden Neurogenesegruppen eine signifikante Expression von insgesamt 12 Genen. 4 waren überexprimiert und 8 herunterreguliert. Am stärksten hochreguliert war hier ebenfalls die Expression von Interleukin 6 (+ 3,9) und am stärksten herunterreguliert die Expression von NEL-like 1 (- 3,9) (Abb. 29). Auch in diesem Ansatz zeigt sich, analog zu den Ergebnissen zur den Angiogenesearrays, dass die hier untersuchten Pankreaskarzinomproben eine häufigere und stärker ausgeprägte Überexpression zeigt als das untersuchte Colonkarzinom, bei dem jeweils mehr Gene herunterreguliert waren. Dass sowohl beim Pankreas- als auch beim Colonkarzinom jeweils Interleukin 6 als das im Rahmen der Neurogenese am stärksten überexprimierte Gen identifiziert wurde, lässt vermuten, dass IL-6 eine organübergreifende Steuerfunktion in der Neurogenese von intestinalen Adenokarzinomen ausübt.

D

Hohe Neurogenese verglichen mit niedriger Neurogenese im Colonkarzinom

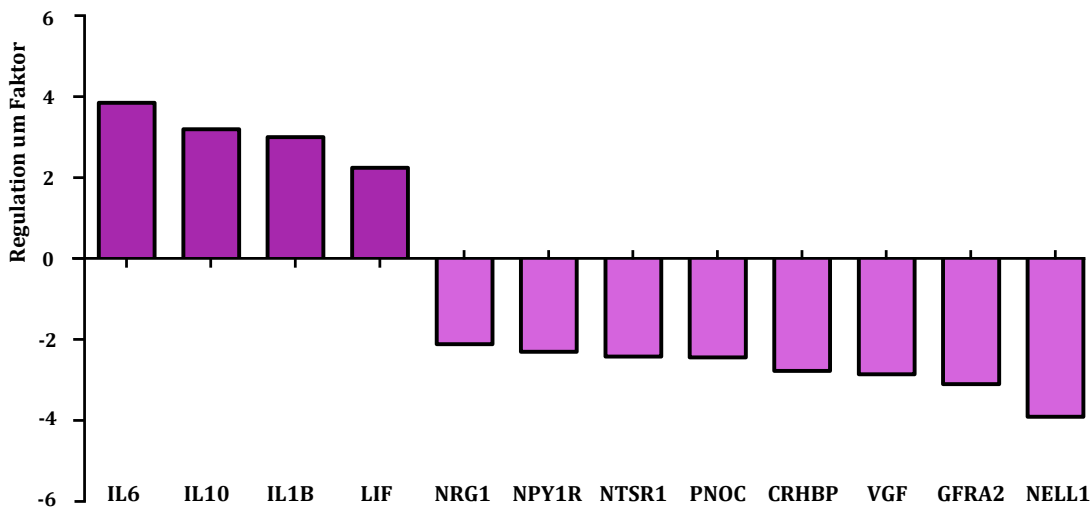


Abbildung 29: Expressionsmuster von neurogeneseassoziierten Genen im humanen CRC: Hohe Neurogenese versus niedrige Neurogenese

Tabelle 14: Genexpression bei gesteigerter Neurogenese im humanen Colonkarzinom

Abkürzung	Name des Gens	Faktor
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	+ 3,9
IL10	Interleukin 10	+ 3,2
IL1B	Interleukin 1 beta	+ 3,0
LIF	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	+ 2,2
NRG1	Neuregulin 1	- 2,1
NPY1R	Neuropeptide Y receptor Y1	- 2,3
NTSR1	Neurotensin receptor 1 (high affinity)	- 2,4
PNOC	Prepronociceptin	- 2,4
CRHBP	Corticotropin releasing hormone binding protein	- 2,8
VGF	VGF nerve growth factor inducible	-2,9
GFRA2	GDNF family receptor alpha 2	- 3,1
NELL1	NEL-like 1 (chicken)	- 3,9

4.2.5 Transkriptomanalyse der neuralen Invasion und Vaskularisation im Colonkarzinom

Da sich zwischen steigender Neuraler Invasion und Vaskularisation im humanen Colonkarzinom eine statistisch signifikante inverse Korrelation zeigte, wurde ein dritter Arrayansatz durchgeführt. Hierbei sollten Angiogenesefaktoren identifiziert werden, die mit einem hohen beziehungsweise niedrigen Ausmaß neuraler Invasion in Zusammenhang stehen. Insgesamt zeigte sich bei 8 Genen eine signifikante Regulation. Bei hoher neuraler Invasion und gleichzeitig niedriger Vaskularisation zeigt sich als einzige Hochregulation das Midkine-Gen (+2,3). Am stärksten herunterreguliert lagen das Prokineticin-2- (PROK2), das Leptin- und das Interleukin-1 β -Gen (IL-1 β) vor (Faktor -4,9 -3,8 und -3,4). Eine Überexpression von Midkine zeigte sich in der Gruppe mit häufiger neuraler Invasion, wohingegen Prok2, Leptin und IL-1 β bei Tumoren geringer NI überexprimiert vorlagen (Abb. 30).

E Hohe Neurale Invasion bei niedriger Vaskularisation verglichen mit niedriger Neuraler Invasion bei hoher Vaskularisation im Colonkarzinom

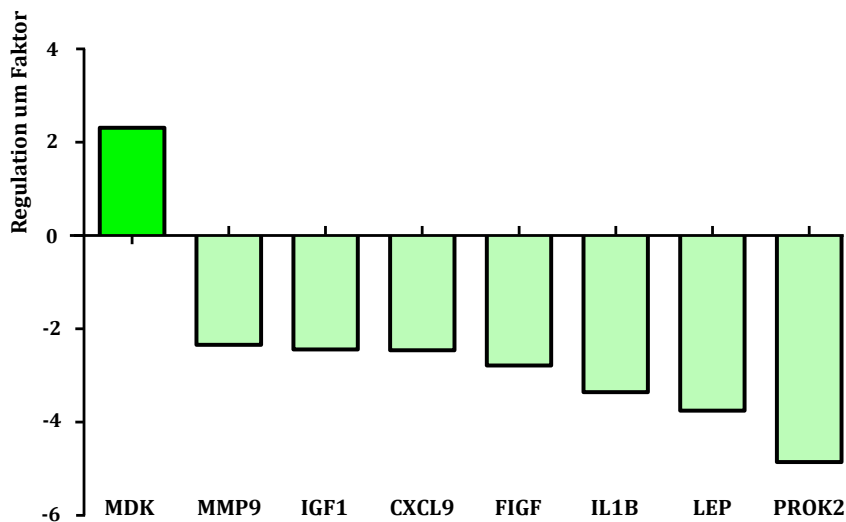


Abbildung 30: Expressionsmuster von angiogeneseassoziierten Genen im humanen CRC: Hohe neurale Invasion bei niedriger Vaskularisation versus niedrige neurale Invasion bei hoher Vaskularisation

Tabelle 15: Genexpression bei häufiger neuraler Invasion und geringer Vaskularisation im humanen Colonkarzinom

Abkürzung	Name des Gens	Faktor
MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)	+ 2,3
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	- 2,4
IGF1	Insulin-like growth factor 1	- 2,4
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	- 2,5
FIGF	C-fos induced growth factor	- 2,8
IL1B	Interleukin 1, beta	- 3,4
LEP	Leptin	- 3,8
PROK2	Prokineticin 2	- 4,9

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im humanen PDAC bei ausgeprägter Vaskularisation gleichzeitig eine verstärkte Innervation des Gewebes vorliegt. Dies zeigt sich sowohl beim durchschnittlichen prozentualen innervierten beziehungsweise vaskularisiertem Gewebeanteil als auch an einer positiven Korrelation der durchschnittlichen Gefäß- und Nervengröße. Ein höherer Anteil des prozentualen innervierten Gewebes begünstigt im humanen PDAC das Auftreten neuraler Invasion. Zwischen dem Ausmaß der neuralen Invasion und der Vaskularisation des Gewebes konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden. In der Transkriptomanalyse zeigten sich MMP9 und IL6 als first-hit Gene im Sinne einer Überexpression bei verstärkter Angio- bzw. Neurogenese.

Im murinen PDAC zeigt sich ebenfalls eine Zunahme der Vaskularisation der Gewebefläche bei steigender innervierter Gewebefläche in Prozent. Anders als im humanen PDAC zeigt sich ein Zusammenhang zwischen ausgeprägter Vaskularisation und häufiger neuraler Invasion. Das Ausmaß der Innervation im Gewebe zeigte in der vorliegenden Arbeit bei den murinen Tumoren keinen Einfluss auf die Häufigkeit neuraler Invasion.

Im humanen Colonkarzinom zeigt sich wie im murinen und humanen PDAC eine Zunahme der prozentualen vaskularisierten Gewebefläche bei steigender innervierter Gewebefläche. Bei abnehmender Vaskularisation des Gewebes zeigt sich hier eine Zunahme der Häufigkeit neuraler Invasion. Das Ausmaß der Innervation zeigte keinen Einfluß auf die neurale Invasion. In der Transkriptomanalyse zeigte sich erneut – wie auch im PDAC – IL6 als wichtigster überexprimierter Marker der Neurogenese in den untersuchten Proben. Bezüglich der Angiogenese konnte NRP1 als first hit identifiziert werden. Bei ausgeprägter neuraler Invasion und gleichzeitig geringer Vaskularisation zeigte sich das MDK-Gen überexprimiert und gleichzeitig die Expression PROK2-Gens vermindert.

5.1 Humanes Pankreaskarzinom

Im humanen PDAC korrelieren sowohl die durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße hochsignifikant als auch der prozentuale Anteil an innervierter und vaskularisierter Gewebefläche positiv miteinander. Somit wurde die initiale Hypothese einer inversen Korrelation zwischen Angiogenese und Neurogenese im PDAC widerlegt. Eine zunehmende Gefäßneubildung scheint im humanen PDAC eine Neueinsprossung und Hypertrophie von Nerven zu beeinflussen oder umgekehrt. Denkbar ist auch, dass es zugrundeliegende genetische Aberrationen oder Mediatoren gibt, die eine proliferative und wachstumsfördernde Wirkung sowohl auf die Angio- als auch auf die Neurogenese haben.

Palmer et al. konnten für den humanen Hippocampus zeigen, dass im Rahmen der Neurogenese 37% der neu entstandenen neuronalen Zellen initial auch Endothelzellmarker aufwiesen. Diese Marker verschwanden zwar größtenteils wieder, jedoch folgerte die Arbeitsgruppe, dass die Neurogenese eng an die Blutgefäße im Gewebe gebunden ist, und dass die adulte Neurogenese in einer „Angiogenetischen Nische“ stattfindet (Palmer, 2000). In der Literatur sind bereits der Angiogenese zugeordnete Mediatoren bekannt, die sich gleichzeitig fördernd auf die Neurogenese auswirken: Vor allem VEGF wurde im humanen Hippocampus als Neurogenesemarker identifiziert: Alvarez-Buyalla et al. fanden heraus, dass VEGF aus den Blutgefäßen direkten Einfluss auf neuronale Progenitorzellen im humanen adulten Hippocampus haben und die (Neo)neurogenese eng an den Prozess der Rekrutierung und des Remodelings neuer Blutgefäße gebunden ist (Alvarez-Buylla et al., 2004; Zhao et al., 2008).

Auch Licht et al. konnten eine gesteigerte Neurogenese aufgrund der Aktivierung neuronaler Stammzellen durch VEGF nachweisen. Die Zunahme an Neuronen zeigte sich in ihrer Studie direkt proportional zur Zunahme der Microvesseldensity (MVD) (Licht et al., 2016).

Ähnliche Zusammenhänge sind auch für das Pankreaskarzinom denkbar. Zwar ist der humane Hippocampus in den vorliegenden Studien nicht von einer malignen Erkrankung betroffen, jedoch handelt es sich um eine der wenigen Regionen des menschlichen Körpers, an dem auch im adulten Organismus noch eine ausgeprägte neurale Plastizität besteht und adulte Neurogenese stattfindet.

Honma et al. und Ceyhan et al. konnten einen weiteren Crosslink zwischen Blutgefäßen und Nerven im PDAC herstellen: Honma et al. wiesen nach dass Artemin, ein neurotropher Faktor aus der Familie der GDNF-Liganden, in den Muskelzellen von Blutgefäßen exprimiert wird und als Guidancemolekül für sympathische Nervenfasern fungiert, die in ihrer Aussprossung den Blutgefäßen folgen (Honma et al., 2002). Ceyhan et al. konnten nachweisen, dass das Protein Artemin im PDAC bis zu 30-fach häufiger vorliegt, und nicht nur in den Blutgefäßwänden sondern auch in hypertrophen Nerven vorkommt. Es fördert die Invasivität der PDAC-Zellen und das Auftreten neuraler Invasion (Ceyhan et al., 2006).

Reziprok zu dieser Wirkung proangiogenetischer Faktoren auf die Neurogenese wurden für das PDAC jedoch auch schon Mechanismen aufgedeckt, in denen sich Mediatoren der Neurogenese auf eine Neubildung von Blutgefäßen ausgewirkt haben: Biakin et al. konnten für verschiedene Axonguidance-Gene wie beispielsweise Semaphorine, Slits, Netrine und Ephrine, die während der Embryonalentwicklung für die Migration und Anordnung der Nerven der Neurogenese zuständig sind, identifizieren, die im PDAC neben Zellwachstum und Invasion auch die Angiogenese fördern, und zusätzlich mit einem kürzeren Gesamtleben korrelieren (Biankin et al., 2012; Mehlen et al., 2011; Muller et al., 2007). Korc et al. konnten für Neuropilin 1 (NRP1), – ein weiteres Guidancemolekül der Axonbildung im Nervensystem – nachweisen, dass es auch als Co-Rezeptor einiger VEGF-Unterformen fungieren kann. In transgenen Mäusen führte die NRP1-Überexpression zur vermehrten Kapillaraussprossung und Bildung neuer Blutgefäße (Kitsukawa et al., 1995; Korc, 2003). Auch Büchler et al. konnten eine Verbindung zwischen Neurogenese und Angiogenese im PDAC nachweisen. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass der NOTCH-Pathway, der bis dahin als neuronenspezifischer Pathway angesehen wurde, im PDAC ebenfalls in den Blutgefäßen exprimiert wird und angiogenesefördernde Effekte hat (Buchler et al., 2005).

Auch anhand des Einflusses auf die Prognose der Patienten ist es möglich, einen Zusammenhang zwischen der Angiogenese und Neurogenese des humanen PDAC herzustellen: Wie in dieser Dissertation gezeigt werden konnte, steigt bei zunehmender Innervation auch die Anzahl und Menge der Blutgefäße intratumoral. Eine erhöhte MVD geht ebenso wie die Höhe der proangiogenetischen Marker HIF α und VEGF-A mit einer schlechteren Prognose der PDAC-Patienten einher (Buchler et al., 2003; Longo et al., 2016; Shibaji et al., 2003). Da eine gesteigerte Innervation im PDAC zu einer gesteigerten NI führt, die ihrerseits wiederum mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten korreliert, kann davon ausgegangen werden, dass verstärkte Angiogenese und verstärkte Neurogenese bei aggressiveren Tumortypen auftreten (Bergmann et al., 2009; Demir et al., 2012). Eine bedeutende Frage, die es an dieser Stelle zu beachten gilt ist, ob eine gesteigerte Bildung von Blutgefäßen, wie sie in der vorliegenden Arbeit für das PDAC nachgewiesen wurde, auch tatsächlich zu einer stärkeren Durchblutung führt. Die vorliegende Arbeit hat sich mit einem ersten Schritt der Quantifizierung von Blutgefäßen befasst. Das Pankreaskarzinom zeigt gesichert in vielen Fällen (ca. 35%) einen proangiogenetischen Phänotyp mit der Überexpression proangiogenetischer Faktoren, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt (Craven et al., 2016b). Auffällig war jedoch, dass viele der Blutgefäße auf den histologischen Schnitten stark komprimiert vorlagen. Somit stellt sich die Frage, ob aufgrund des hohen intratumoralen Drucks trotz vorhandener Blutgefäße eine hinreichende Perfusion stattfinden kann. Laut Semenza et al. liegt eine

inverse Korrelation zwischen Tumoroxygenierung und klinischem Outcome vor, was vermuten lässt, dass die Tumorzellen im hypoxischen Environment besonders anpassungsfähig und aggressiv werden (Semenza, 2000). Dieser Zusammenhang stützt wiederum die These einer verminderten Perfusion trotz einer hohen Anzahl an Blutgefäßen, da es sich beim PDAC um ein besonders aggressiven Tumor handelt (Makohon-Moore et al., 2016).

Zudem ist nicht vollständig klar, von welcher Qualität die neugebildeten Blutgefäße sind. Es ist bekannt, dass im Rahmen der Tumorangio-genese häufig unorganisierte, fehlerhafte Gefäße mit unvollständiger Perizytenauskleidung entstehen, die oft undicht und mangelhaft funktional sind (Carmeliet, 2005). Denkbar ist, dass trotz verstärkter Angiogenese eine Minderperfusion des PDAC bestehen bleibt. Diese These würde sich mit dem aktuellen Forschungsstand eines funktionell hypovaskulären minderperfundierte Tumors decken. Im Rahmen der hierdurch entstehenden Hypoxie im Gewebe kommt es in den Tumorzellen über die Freisetzung von HIF1 zur Transkription von VEGF und somit erneut zu einer proneoangiogenetischen Wirkung im Sinne eines feed-forward loops, wodurch die Gefäßneubildung sich selbst erhält (Buchler et al., 2003; Olive et al., 2009; Shibaji et al., 2003). Beim humanen PDAC zeigte sich eine Tendenz zu stärkerer neuraler Invasion bei zunehmender innervierter Gewebefläche. Bezüglich der Vaskularisation konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Vermutlich kommt es durch eine höhere Innervation des Pankreasgewebes, die mit einer nervalen Hypertrophie einhergeht, auch zur verstärkten Ausschüttung neurotropher chemoattraktiver Substanzen gegenüber den Tumorzellen wie beispielsweise aus der GDNF-Familie (Demir et al., 2012; Paratcha et al., 2006; Tang et al., 1998). Dieser Effekt kann sich durch eine Neurodestruktion im Rahmen der Invasion noch weiter verstärken. Auch ein stärkerer Effekt der Chemoattraktion von Tumorzellen gegenüber Nerven ist bei einer erhöhten Nervendichte denkbar, da mehr Nerven gleichzeitig eine größere Angriffsfläche bieten. Diese Chemoattraktion findet beispielsweise über den CXCR3-Rezeptor 1 statt (Marchesi et al., 2010). Eine Erhöhung der Fallzahl der untersuchten Proben auf $n > 55$ könnte möglicherweise zum Nachweis eines statistisch signifikanten Zusammenhangs führen.

In der Transkriptomanalyse zeigte sich bezüglich der Angiogenese eine bedeutende Rolle der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9). Diese war in der Gruppe mit verstärkter Angiogenese die stärkste Einflussgröße und um den Faktor (+4,5) hochreguliert. Matrixmetalloproteinasen sind eine Familie Zink-abhängiger proteolytischer Enzyme. Sie fördern den dynamischen Umbau und Umsatz der Extrazellulärmatrix (Neesse et al., 2011). Im PDAC zeigt sich im Gegensatz zum gesunden Pankreas eine hohe Expression von MMP9, die mit verstärktem Tumorwachstum, Migration, Invasion, Angiogenese und Metastasierung assoziiert ist (Bloomston et al., 2002) MMP9 wird im PDAC unter anderem aus Mastzellen, Endothelzellen und aus über SHH aktivierten PSCs freigesetzt (Ammendola et al., 2014; Bailey et al., 2009). Insbesondere die ECM-Degradierung sowie die Durchbrechung der Basalmembran durch MMP9 spielen für die Metastasierung eine große Rolle (Wille et al., 2014). Auch in anderen Tumoren liegen MMPs häufig überexprimiert vor und gehen mit einem verkürzten Überleben der Patienten einher (Egeblad et al., 2002). Interessanterweise gibt es auch an dieser Stelle einen Zusammenhang zwischen Neuro- und Angiogenese im PDAC: Okada et al. konnten nachweisen, dass GDNF, das aus neuronalem Gewebe im und um das Pankreas freigesetzt wird, in vitro die Expression und Aktivierung von MMP-9 in PDAC-Zellen erhöht (Okada et al., 2003). Versuche der neuartigen Tumorthherapie durch MMP-Inhibitoren wie Marimastat (BB-2516) blieben jedoch für das PDAC und weitere Tumoren in der Vergangenheit ohne Erfolg (Coussens, 2002). Auch an dieser Stelle ist weitere intensive Forschung nötig, um sich die Wirkung von MMP9 auf die Angiogenese des PDAC im besten Fall therapeutisch nutzbar machen zu können.

Bei der Identifikation von Genen, deren Überexpression für eine gesteigerter Neurogenese verantwortlich sind, zeigte sich interessanterweise tumorübergreifend sowohl beim Pankreas- als auch beim Colonkarzinom Interleukin 6 (IL6) als „first hit“. Beim Pankreaskar-

zinom liegt es um den Faktor (+10) und beim Colonkarzinom um den Faktor (+3,9) hochreguliert vor. Es ist bereits bekannt, dass IL-6 im PDAC eine Rolle spielt. Laut Ying et al. fördert IL6 über Aktivierung des JAK/STAT-Pathways das Krebszellüberleben, die Proliferation und Invasivität der Zellen (Dima et al., 2012; Lesina et al., 2011; Miron et al., 2010; Ying et al., 2016). Außerdem induziert es ein immunsuppressives Microenvironment, indem es zusammen mit TGF β und Interleukin 10 die Funktion dendritischer Zellen hemmt (Bellone et al., 2006). Erhöhte IL6-Level wurden in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien gefunden und korrelieren mit dem Auftreten von Kachexie und kürzerem Überleben (Holmer et al., 2014; Scheede-Bergdahl et al., 2012). Onkogenes K-ras verstärkt zusätzlich die IL-6 Sekretion, was die Progression und das Bestehen des PDAC weiter fördert (Ying et al., 2016). Genetische und Pharmakologische IL-6 Inhibition konnte die K-ras-induzierte Tumorigenese hemmen (Ancrile et al., 2007; Zhang et al., 2013). In einer Studie konnte IL-6 im Rahmen einer Zytokinexpressionsanalyse als einziges Zytokin identifiziert werden, dessen Erhöhung bei PDAC-Patienten mit einer statistisch signifikanten Verkürzung des Überlebens korrelierte (Saif et al., 2014). Zhang et al. konnten die obengenannten Zusammenhänge am Maustumormodell und an humanen PDAC-Zellen nachweisen. Sie konnten zeigen, dass IL6 bereits in Vorläuferläsionen vorkommt und für den Progress der Erkrankung förderlich ist, indem es synergistisch mit mutiertem K-ras wirkt (Zhang et al., 2013). Durch eine IL6-Blockade im Maustumormodell konnte wiederum der Tumorprogress gehemmt werden (Mace et al., 2018). Auch in-vitro lässt sich durch Inhibition von IL-6 eine Proliferationshemmung auf die PDAC-Zellen nachweisen (Chen et al., 2018). Aktuell läuft eine Phase-II-Studie um Chen und Nielsen, in der die Wirkung des IL-6-Rezeptor-Inhibitors Tocilizumab am Patienten untersucht wird (Chen et al., 2017). Mitsunaga et al. konnten 2017 für das Therapieschema Tocilizumab plus Gemcitabin bei 13% der Patienten ein Therapieansprechen jedoch ohne signifikante Vorteile zeigen. Sie räumten jedoch eine kleine Kohorte und einen kurzen Beobachtungszeitraum als limitierende Faktoren für die Studie ein (Mitsunaga et al., 2017).

Somit gibt es aktuell verschiedene Therapieansätze, sich die tumorfördernden Effekte von IL6 zunutze zu machen. Dies stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Entwicklung neuer Therapien für das PDAC dar, was durch die vorliegende Arbeit deutlich bestätigt wurde. Neu ist nun der hier nachgewiesene Zusammenhang zur Innervation des Gewebes. Da IL6 im PDAC die Innervation des Gewebes fördert, was wiederum die neurale Invasion fördert und das Überleben der Patienten verkürzt, sollte man IL6 weiterhin als vielversprechendes als Anti-Cancer Target in Betracht ziehen. Interessanterweise lässt sich auch für IL6, das hier als wichtigster Mediator der pankreatischen Neurogenese im Karzinom identifiziert wurde, erneut eine Verbindung zur Angiogenese ziehen: IL6 wird neben vielen anderen Zelltypen auch in Endothelzellen gebildet (Kishimoto, 2013). Es fördert über die Aktivierung des Stat3-Pathways die Expression von VEGF (Cohen et al., 1996; Wei et al., 2003a). Feurino et al. konnten 2007 speziell für das PDAC eine verstärkte IL6-Expression durch die PDAC-Zellen zeigen und eine Verstärkte VEGF-Expression durch IL6 nachweisen. Interessanterweise zeigten sich sowohl die IL6- als auch der VEGF-Expression durch Hypoxie induzierbar, was wiederum die Minderperfusionshypothese stützt (Feurino et al., 2007).

Aus den vorliegenden Ergebnissen lassen sich die folgenden weiterführenden Fragestellungen ableiten: Aus welchen Komponenten des PDAC wird zu welchen Anteilen IL6 freigesetzt? Welche Rolle spielen dabei die PSCs, die Tumorzellen, die Nerven selbst und die Endothelzellen? Fördert IL6 direkt die neurale Invasion über Chemoattraktion zwischen Nerv und Tumor oder durch die Zunahme der Invasivität der Tumorzellen? Hier können weitere Forschungsansätze Klarheit darüber liefern, wie genau IL6 die Nerv-Tumor-Interaktion im PDAC beeinflusst.

5.2 Murines Pankreaskarzinom

Auch im murinen PDAC korrelieren der prozentuale Anteil der vaskularisierten Fläche und der Anteil der innervierten Fläche positiv. Hier zeigte sich das Verhalten von Angio- und Neurogenese analog zur Situation im PDAC. Somit bestätigt sich das murine Pankreaskarzinom und speziell die in der vorliegenden Arbeit untersuchten, durch die piggyBac-Transposase generierten Maustumormodelle als sehr gut geeignetes Tumormodell für weitere Fragestellungen zur Angio- und Neurogenese im PDAC. Abweichend von den Ergebnissen des humanen PDAC zeigte sich im murinen Pankreaskarzinom ein annähernd statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen gesteigerter Vaskularisation und steigender neuraler Invasion. Die Maustumoren unterscheiden sich in diesem Punkt fundamental von den Ergebnissen zur neuralen Invasion beim humanen PDAC. Dies ist erklärbar durch den Fakt, dass es sich beim murinen PDAC um einen anderen Grundorganismus handelt. Zwar eignen sich die neusten Maustumormodelle gut zu Forschungszwecken und zeigen eine Vielzahl an Eigenschaften, die auch das humane PDAC aufweist. Nichtsdestotrotz handelt es sich nicht um dasselbe Karzinom, sondern das einer anderen Spezies. Annehmbar ist, dass im Tiermodell eine gesteigerte Versorgung mit Blutgefäßen die Tumorzellen besser mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, und die Tumorzellen somit zu einem vitaleren und stärker invadierenden Phänotyp hin beeinflusst. Weitere Untersuchungen über das Perfusionsausmaß und die Gefäßqualität im murinen PDAC könnten weitere Aufschlüsse darüber geben, wie der obengenannte Unterschied bedingt sein könnte.

Die Merkmalsausprägung bezüglich Vaskularisation, Innervation und Nerv-Tumor-Interaktion zeigen eine breite Streuung. Es gibt jeweils viele Tiere mit geringer bis mittlerer Ausprägung und einen kleinen Anteil an Tieren, die eine massiv verstärkte Ausprägung des jeweiligen Merkmals zeigen. Diese Tumoren konkreter bezüglich ihrer zugrundeliegenden genetischen Mutationen zu untersuchen kann neue Erkenntnisse darüber liefern, welche Gene für hohe Merkmalsausprägungen verantwortlich sind. Möglicherweise könnten in Zukunft gezielt Tumormodelle mit starker oder geringer Innervation, Vaskularisation oder Nerv-Tumor-Interaktion ausgewählt werden, um konkrete Forschungsfragen an ihnen zu untersuchen. Auch der Gehalt und die Genexpression von IL6 und MMP9 in murinen Tumoren zu untersuchen stellt einen interessanten weiteren Ansatz dar. Sollten die beiden Mediatoren auch im Tiermodell ähnlich gehäuft vorliegen, wäre die nächste Frage, ob auch hier ein Einfluss auf starke Innervation und Vaskularisation vorliegen. Denkbar wäre, anhand der oben beschriebenen Ergebnisse, dass MMP9 im Maustumor aufgrund verstärkter Vaskularisation das Ausmaß der neuralen Invasion verstärken könnte. Zuguterletzt wäre noch die qualitative Untersuchung der Maustumorgefäße eine interessante weitere Fragestellung. Analog zur oben vorgeschlagenen qualitativen Untersuchung der Blutgefäße im PDAC wäre dieser Ansatz auch für das murine PDAC hochinteressant. Die Frage ist, ob sich murines und humanes PDAC in Bezug auf die neugebildete Tumorgefäße in ihrer Qualität ähneln, oder ob es grundlegende Unterschiede diesbezüglich gibt.

5.3 Humanes Colonkarzinom

Analog zum humanen und murinen PDAC liegen im humanen Colonkarzinom bei hohem prozentualen Nervenanteil am Gesamtgewebe auch ein signifikant höherer Anteil an Blutgefäßen vor. Vermutlich kommt es auch hier zu einer Gegenseitigen Beeinflussung der Neuro- und Angiogenese im Tumor. Interessanterweise sind sowohl verstärkte Neuro- als auch Angiogenese im CRC mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert: Eine verstärkte Angiogenese, hohe MVD und verstärkte VEGF-Expression wurden als negativer Prädiktor

für ein rezidivfreies Überleben und das Gesamtüberleben im CRC identifiziert (Des Guetz et al., 2006; Takebayashi et al., 1996). Auch eine verstärkte Neurogenese geht im CRC mit einer bis zu 50% reduzierten 5-Jahres-Gesamtüberleben und einer erhöhten Rezidivrate einher (Albo et al., 2011). Da eine Verstärkung der Neuro- und Angiogenese jeweils zu einer Prognoseverschlechterung führt, erscheint es logisch, dass sie sich im CRC gegenseitig bedingen und fördern könnten. Welche gemeinsamen genetischen oder molekularen Grundlagen diesen Zusammenhang bedingen, kann in Zukunft im Rahmen weiterer Forschung aufgedeckt werden.

Beim Colonkarzinom zeigte sich Neuropilin 1 (NRP1) als wichtigster positiver Einflussfaktor auf die Angiogenese. Das NRP1-Gen zeigte sich in der Gruppe mit hoher Angiogenese um den Faktor (+2,3) stärker exprimiert gegenüber der Gruppe mit niedriger Vaskularisation. Im CRC fördert NRP1 die Endothelzellmigration und fungiert als Co-Rezeptor von VEGFR-2, kann VEGF binden und wirkt somit angiogenesefördernd. Es wird lediglich von malignen CRC-Zellen, nicht hingegen von angrenzenden benignen Epithelzellen exprimiert (Parikh et al., 2004; Soker et al., 1998). Auch für andere Tumoren wie beispielsweise das Prostata- und das Lungenkarzinom wurden Angiogenese- und wachstumsfördernde Effekte von NRP1 belegt und die NRP1-Spiegel korrelierten positiv mit der Metastasenlast der Patienten (Hong et al., 2007; Miao et al., 2000; Tse et al., 2017). NRP-1 als wichtigster Angiogenesemarker für das CRC zeigt zusätzlich Verbindungen zur Neurogenese: Initial wurde NRP1 während der Entwicklung des Nervensystems des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) entdeckt (Fujisawa et al., 1995). NRP1 fungiert im Rahmen der Neurogenese als Transmembranrezeptor für Semaphorine, die als Axonguidance-Signale wirken und die neuronale Entwicklung fördern (Takahashi et al., 1998). Somit stellt NRP1 als Corezeptor für VEGF und Semaphorine gleichzeitig einen Rezeptor der Angiogenese und einen Rezeptor der Neurogenese dar.

Bezüglich gesteigerter Neurogenese zeigt sich wie oben bereits erwähnt interessanterweise tumorübergreifend sowohl beim Pankreas- als auch beim Colonkarzinom IL6 als „first hit“. In der CRC-Patientengruppe mit hoher Neurogenese liegt das Gen für IL6 beim Colonkarzinom um den Faktor (+3,9) hochreguliert vor. Eine tumorfördernde Rolle von IL6 ist für das CRC bereits in der Literatur beschrieben. IL6 fördert über den Transkriptionsfaktor Stat3 die Tumorigenese des Colonkarzinoms (Grivennikov et al., 2009) Auch Becker et al. konnten in initialen Läsionen bereits vor Tumorentstehung eine erhöhte IL6-Expression im Mausmodell detektieren. Die Injektion von IL6 und dem löslichen IL- Rezeptor führten zur verstärkten Proliferation dysplastischer Zellen (Becker et al., 2004). IL6-Serumspiegel liegen bei Patienten mit CRC deutlich erhöht vor und korrelieren mit der Tumorgroße. Daher wurde IL6 in der Vergangenheit sogar als prognostischer Faktor für das CRC angesehen (Chung et al., 2003; Galizia et al., 2002). Wie beim PDAC auch lässt sich aus der vorliegenden Arbeit IL6 als mögliches Target für eine molekulare Therapie des CRC ableiten. Ein aktuelles Review über 48 Studien von 1993 bis 2018 bestätigt ebenfalls den Nutzen von IL6 als potenziellen Tumormarker und therapeutisches Target für gastrointestinale Karzinome (Vainer et al., 2018). Auch für IL6 sind neben den hier aufgezeigten neurogenesefördernden Eigenschaften Effekte für die Angiogenese nachgewiesen. IL6 wirkt in einer Vielzahl von Erkrankungen proangiogenetisch. So beispielsweise im Cervixkarzinom und Mammakarzinom (Bharti et al., 2018; Wei et al., 2003b). Nagasaki et al konnten auch für das CRC angiogenesefördernde Mechanismen für IL6 nachweisen und die Angiogenese durch einen Anti-IL6-Rezeptorantikörper supprimieren (Nagasaki et al., 2014).

Bezüglich der Einflussfaktoren auf die NI unterscheidet sich das CRC vom PDAC. Im humanen Colonkarzinom konnte die initiale Hypothese einer inversen Korrelation zwischen Ausmaß der Vaskularisation und neuraler Invasion bestätigt werden. Bei abnehmender vaskularisierter Gewebefläche kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme neuraler

Invasion. Zwischen Nervendichte und NI zeigte sich im CRC kein signifikanter Zusammenhang.

Wenn man die oben angeführten Schlussfolgerungen bezüglich der Minderperfusion und Hypoxie im PDAC in Betracht zieht, zeigt sich für die Ergebnisse beim CRC eine interessante Parallele: Geringer vaskularisierte Colontumore ähneln möglicherweise dem Microenvironment im PDAC stärker und zeigen deshalb auch verstärkt NI. Denkbar ist, dass verhältnismäßig weniger stark durchblutete Tumoren des Colons ein hypoxischeres und nährstoffdepletierendes Mikroenvironment aufweisen, ähnlich der Situation im Pankreaskarzinom. Bedeutsam ist, dass neurale Invasion für das CRC einen unabhängigen negativen Prognosefaktor für das Überleben der Patienten darstellt (Krasna et al., 1988; Liebig et al., 2009). Ebenso ist die Expression der Hypoxiemarker HIF1 und HIF2 im CRC mit einer signifikanten Prognoseverschlechterung assoziiert (Yoshimura et al., 2004). Eine geringe Vaskularisation und neurale Invasion sprechen also für Eigenschaften überdurchschnittlich aggressiver CRCs.

Bei der Analyse der Genregulation bezüglich neuraler Invasion und Vaskularisation im humanen Colonkarzinom zeigten sich vorrangig zwei interessante Genregulationen: Bei starker neuraler Invasion und gleichzeitig geringer Vaskularisation zeigte sich das Gen für Midkine (MDK) um den Faktor (+2,3) hochreguliert. Bei niedriger neuraler Invasion und gleichzeitig hoher Vaskularisation zeigte sich eine Herunterregulation der Expression des Prokineticin 2-Gens (PROK2) um den Faktor (-4,9). PROK2 hat möglicherweise Effekte zugunsten einer gesteigerten Angiogenese, wogegen es die neurale Invasion eher hemmen könnte. Im Glioblastom und im PDAC zeigte PROK2 ebenfalls proangiogenetische Effekte. Die Blockade der PROK-Rezeptoren PROKR1 und PROKR2 konnte eine Abnahme der Angiogenese und eine Verringerung der durchschnittlichen Tumorgröße in Xenograftmodellen bewirken (Curtis et al., 2013). MDK zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eher als „Gegenspieler“ von PROK2. Es scheint eine verringerte Vaskularisation und häufige NI zu fördern. Midkine ist ein heparin-bindender Wachstumsfaktor, der während der Entwicklung des Gehirns die Migration der Neuronen entlang der Gliazellen steuert (Sakamoto et al., 2012). Es zeigt auf adulte Neurone neurotrophe Effekte: MDK fördert die Aussprossung neuer Neuriten und das Überleben der Nervenzellen (Kurosawa et al., 2001; Michikawa et al., 1993; Sakaguchi et al., 2003). Außerdem findet sich eine gesteigerte Expression von MDK bereits in prämaligen Stadien, aber auch im CRC (Sakamoto et al., 2012). Auch im PDAC ist die MDK-Expression gegenüber dem normalen Pankreas statistisch signifikant erhöht und wirkt sich proliferativ auf die PDAC-Zellen aus (Rawnaq et al., 2014). Die Höhe der Expression korreliert signifikant mit dem Auftreten neuraler Invasion, dem Auftreten von hepatischen Metastasen und wurde als unabhängiger Prognosefaktor mit signifikant reduziertem 5-Jahresüberleben identifiziert (Maeda et al., 2007; Yao et al., 2014). Konsequenterweise wurde MDK von Sakamoto et al bereits als Zielmolekül einer targeted-Tumortherapie oder als mögliches Ziel einer Gentherapie vorgeschlagen (Sakamoto et al., 2012). Somit fügt sich das hier erhaltende Ergebnis zu MDK als pro-invasiv wirkend in den bisherigen Forschungsstand, liefert eine interessante potentielle Verknüpfung zwischen Vaskularisation und neuraler Invasion im CRC und unterstreicht die mögliche Bedeutung für die Tumortherapie des CRC und möglicherweise auch für das PDAC.

6. Zusammenfassung

Aufgrund der hohen neuralen Invasion und der geringen Vaskularisation im PDAC stellt sich die Frage nach einer negativen Korrelation dieser beiden Eigenschaften. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Immunhistochemie-Immunfluoreszenz-Triplefärbung etabliert. Mittels dieser Färbung wurden S100-positive Nerven, CD31-positive Blutgefäße und CK19-positive Tumorzellen gefärbt und Anzahl, Größe und Dichte der Gefäße und Nerven sowie die neurale Invasion und die Angioinvasion bestimmt. Die so erhobenen Parameter der Neurogenese, Angiogenese, der neuralen Invasion und der Angioinvasion wurden für das humane und murine PDAC und das humane CRC quantifiziert und auf statistische Zusammenhänge hin untersucht. Für alle drei Tumorentitäten konnte eine positive Korrelation zwischen Angiogenese und Neurogenese – repräsentiert durch den prozentualen Anteil vaskularisierter und innervierter Fläche des Gewebes – gezeigt werden. Höchstwahrscheinlich gibt es zugrundeliegende Mechanismen, die sich fördernd auf das Wachstum und die Neueinsprossung von Blutgefäßen und Nerven auswirken. Interessanterweise gab es in keiner untersuchten Gruppe Zusammenhänge zwischen Nerv- und Gefäßdichte. Die Größe der Strukturen und vor allem ihr Anteil, den sie im Verhältnis zur Gewebefläche beanspruchen, scheint wesentlich aussagekräftiger zu sein als die Dichte der Gefäße und Nerven. Bezüglich der Einflussfaktoren für die neurale Invasion unterscheiden sich die drei Tumorentitäten grundlegend: Während im humanen PDAC eine gesteigerte Innervation (in %) für eine verstärkte neurale Invasion in Betracht kommt, liegt im murinen PDAC eine gesteigerte Vaskularisation (in %) bei verstärkter NI vor. Im humanen Colonkarzinom lag bei einer Hypovaskularisation (geringe Gefäßdichte) gehäuft neurale Invasion vor. Weitere Aufmerksamkeit verdienen IL-6 und MMP9 als Hauptmediatoren der Neuro- und Angiogenese im humanen PDAC sowie IL-6 und NRP1 im Rahmen der Neuro- und Angiogenese im humanen CRC. Auch MDK als First Hit bezüglich hoher NI bei geringer Vaskularisation im CRC sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Aufgrund der engen Interaktion und Verzahnung von Angio- und Neurogenese, die sich in der vorliegenden Dissertation in allen drei untersuchten Tumorentitäten zeigte, könnte man einen weiteren generellen Therapieansatz ableiten. Prinzipiell wäre denkbar, anhand einer simultanen Inhibition der Angio- und Neurogenese eine Anti-Tumor-Wirkung zu erzielen. Möglicherweise könnte über die hier nachgewiesenen First-Hit Mediatoren MMP-9 und IL-6 ein additiver Effekt bewirkt werden, mit dem Ziel, einen neuen Therapieansatz für das PDAC entwickeln zu können.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, R., Brown, E., Brown, L., Butler, R., Falk, S., Fisher, D., Kaplan, R., Quirke, P., Richman, S., Samuel, L., Seligmann, J., Seymour, M., Shiu, K. K., Wasan, H., Wilson, R., Maughan, T., & Investigators, F. T. (2018). Inhibition of EGFR, HER2, and HER3 signalling in patients with colorectal cancer wild-type for BRAF, PIK3CA, KRAS, and NRAS (FOCUS4-D): a phase 2-3 randomised trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 3(3), 162-171. doi:10.1016/S2468-1253(17)30394-1
- Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P. K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D. K., Langer, P., Chiblak, S., Durr, A., Hofler, H., Kloppel, G., Muller-Decker, K., Brielmeier, M., & Esposito, I. (2012). Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol*, 226(5), 723-734. doi:10.1002/path.3017
- Akakura, N., Kobayashi, M., Horiuchi, I., Suzuki, A., Wang, J., Chen, J., Niizeki, H., Kawamura, K., Hosokawa, M., & Asaka, M. (2001). Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res*, 61(17), 6548-6554.
- Albo, D., Akay, C. L., Marshall, C. L., Wilks, J. A., Verstovsek, G., Liu, H., Agarwal, N., Berger, D. H., & Ayala, G. E. (2011). Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. *Cancer*, 117(21), 4834-4845. doi:10.1002/cncr.26117
- Alvarez-Buylla, A., & Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5), 683-686.
- Ammendola, M., Sacco, R., Sammarco, G., Donato, G., Zuccala, V., Luposella, M., Patruno, R., Marech, I., Montemurro, S., Zizzo, N., Gadaleta, C. D., & Ranieri, G. (2014). Mast cells density positive to tryptase correlates with angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients having undergone surgery. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 951957. doi:10.1155/2014/951957
- Ancrile, B., Lim, K. H., & Counter, C. M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev*, 21(14), 1714-1719. doi:10.1101/gad.1549407
- Apte, M. V., & Wilson, J. S. (2012). Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 Suppl 2, 69-74. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.07000.x
- Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L. B., Bateman, A. C., Conti, J. A., Fine, D. R., Johnson, C. D., Benyon, R. C., & Iredale, J. P. (2004). Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(21), 7427-7437. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0825
- Arnold, M. A., & Goggins, M. (2001). The genetic progression of pancreatic carcinoma. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Retrieved from http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_14/S146239940100309Xsup005.pdf
- Bailey, J. M., Mohr, A. M., & Hollingsworth, M. A. (2009). Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*, 28(40), 3513-3525. doi:10.1038/onc.2009.220
- Bailey, J. M., Swanson, B. J., Hamada, T., Eggers, J. P., Singh, P. K., Caffery, T., Ouellette, M. M., & Hollingsworth, M. A. (2008). Sonic hedgehog promotes desmoplasia in

- pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 14(19), 5995-6004. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0291
- Bapat, A. A., Hostetter, G., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2011). Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(10), 695-707. doi:10.1038/nrc3131
- Becker, C., Fantini, M. C., Schramm, C., Lehr, H. A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P. R., Blessing, M., Rose-John, S., & Neurath, M. F. (2004). TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*, 21(4), 491-501. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.020
- Bellone, G., Carbone, A., Smirne, C., Scirelli, T., Buffolino, A., Novarino, A., Stacchini, A., Bertetto, O., Palestro, G., Sorio, C., Scarpa, A., Emanuelli, G., & Rodeck, U. (2006). Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol*, 177(5), 3448-3460.
- Benson, A. B., 3rd. (2007). Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm*, 13(6 Suppl C), S5-18.
- Bergmann, F., Ceyhan, G. O., Rieker, R. J., Esposito, I., Fischer, L., Herpel, E., Friess, H., Schirmacher, P., & Kern, M. A. (2009). Fundamental differences in the neural invasion behavior of pancreatic endocrine tumors: relevance for local recurrence rates? *Hum Pathol*, 40(1), 50-57. doi:10.1016/j.humpath.2008.06.021
- Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., Parker, A. R., Shimada, Y., Eshleman, J. R., Watkins, D. N., & Beachy, P. A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425(6960), 846-851. doi:10.1038/nature01972
- Bharti, R., Dey, G., Das, A. K., & Mandal, M. (2018). Differential expression of IL-6/IL-6R and MAO-A regulates invasion/angiogenesis in breast cancer. *Br J Cancer*, 118(11), 1442-1452. doi:10.1038/s41416-018-0078-x
- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M. C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A. M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., Wani, S., Gongora, M., Pajic, M., Scarlett, C. J., Gill, A. J., Pinho, A. V., Rooman, I., Anderson, M., Holmes, O., Leonard, C., Taylor, D., Wood, S., Xu, Q., Nones, K., Fink, J. L., Christ, A., Bruxner, T., Cloonan, N., Kolle, G., Newell, F., Pinese, M., Mead, R. S., Humphris, J. L., Kaplan, W., Jones, M. D., Colvin, E. K., Nagrial, A. M., Humphrey, E. S., Chou, A., Chin, V. T., Chantrill, L. A., Mawson, A., Samra, J. S., Kench, J. G., Lovell, J. A., Daly, R. J., Merrett, N. D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N. Q., Barbour, A., Zeps, N., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Kakkar, N., Zhao, F., Wu, Y. Q., Wang, M., Muzny, D. M., Fisher, W. E., Brunicardi, F. C., Hodges, S. E., Reid, J. G., Drummond, J., Chang, K., Han, Y., Lewis, L. R., Dinh, H., Buhay, C. J., Beck, T., Timms, L., Sam, M., Begley, K., Brown, A., Pai, D., Panchal, A., Buchner, N., De Borja, R., Denroche, R. E., Yung, C. K., Serra, S., Onetto, N., Mukhopadhyay, D., Tsao, M. S., Shaw, P. A., Petersen, G. M., Gallinger, S., Hruban, R. H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Schlick, R. D., Wolfgang, C. L., Morgan, R. A., Lawlor, R. T., Capelli, P., Corbo, V., Scardoni, M., Tortora, G., Tempero, M. A., Mann, K. M., Jenkins, N. A., Perez-Mancera, P. A., Adams, D. J., Largaespada, D. A., Wessels, L. F., Rust, A. G., Stein, L. D., Tuveson, D. A., Copeland, N. G., Musgrave, E. A., Scarpa, A., Eshleman, J. R., Hudson, T. J., Sutherland, R. L., Wheeler, D. A., Pearson, J. V., McPherson, J. D., Gibbs, R. A., & Grimmond, S. M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491(7424), 399-405. doi:10.1038/nature11547

- Bloomston, M., Zervos, E. E., & Rosemurgy, A. S., 2nd. (2002). Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann Surg Oncol*, 9(7), 668-674.
- Bockman, D. E., Buchler, M., & Beger, H. G. (1994). Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology*, 107(1), 219-230.
- Brenner, H., Arndt, V., Sturmer, T., Stegmaier, C., Ziegler, H., & Dhom, G. (2001). Long-lasting reduction of risk of colorectal cancer following screening endoscopy. *Br J Cancer*, 85(7), 972-976. doi:10.1038/sj.bjc.6692023
- Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *Lancet*, 383(9927), 1490-1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9
- Bruns, C. J., Solorzano, C. C., Harbison, M. T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R., & Fidler, I. J. (2000). Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 60(11), 2926-2935.
- Buchler, P., Gazdhar, A., Schubert, M., Giese, N., Reber, H. A., Hines, O. J., Giese, T., Ceyhan, G. O., Muller, M., Buchler, M. W., & Friess, H. (2005). The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer. *Ann Surg*, 242(6), 791-800, discussion 800-791.
- Buchler, P., Reber, H. A., Buchler, M., Shrinkante, S., Buchler, M. W., Friess, H., Semenza, G. L., & Hines, O. J. (2003). Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 26(1), 56-64. doi:10.1097/00006676-200301000-00010
- Callen, E., & Surralles, J. (2004). Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat Res*, 567(1), 85-104. doi:10.1016/j.mrrev.2004.06.003
- Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., & Der, C. J. (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 17(11 Reviews), 1395-1413. doi:10.1038/sj.onc.1202174
- Caputo, F., Santini, C., Bardasi, C., Cerma, K., Casadei-Gardini, A., Spallanzani, A., Andrikou, K., Cascinu, S., & Gelsomino, F. (2019). BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci*, 20(21). doi:10.3390/ijms20215369
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936. doi:10.1038/nature04478
- Cen, P., Ni, X., Yang, J., Graham, D. Y., & Li, M. (2012). Circulating tumor cells in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1826(2), 350-356. doi:10.1016/j.bbcan.2012.05.007
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., Friess, H., & Schafer, K. H. (2009). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 104(10), 2555-2565. doi:10.1038/ajg.2009.380
- Ceyhan, G. O., Giese, N. A., Erkan, M., Kersch, A. G., Wente, M. N., Giese, T., Buchler, M. W., & Friess, H. (2006). The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion. *Ann Surg*, 244(2), 274-281. doi:10.1097/01.sla.0000217642.68697.55
- Chang, G. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Skibber, J. M., & Moyer, V. A. (2007). Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst*, 99(6), 433-441. doi:10.1093/jnci/djk092
- Chen, I., Johansen, J. S., Zimmer, T. A., Dehlendorff, C., Parner, V. K., Jensen, B. V., & Nielsen, D. (2017). PACTO: A single center, randomized, phase II study of the

- combination of nab-paclitaxel and gemcitabine with or without tocilizumab, an IL-6R inhibitor, as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer.
- Chen, X., Tian, J., Su, G. H., & Lin, J. (2018). Blocking IL-6/GP130 signaling inhibits cell viability/proliferation, glycolysis, and colony forming activity in human pancreatic cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets*. doi:10.2174/1568009618666180430123939
- Cheng, P., Jin, G., Hu, X., Shi, M., Zhang, Y., Liu, R., Zhou, Y., Shao, C., Zheng, J., & Zhu, M. (2012). Analysis of tumor-induced lymphangiogenesis and lymphatic vessel invasion of pancreatic carcinoma in the peripheral nerve plexus. *Cancer Sci*, 103(10), 1756-1763. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02364.x
- Chung, Y. C., & Chang, Y. F. (2003). Significance of inflammatory cytokines in the progression of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 50(54), 1910-1913.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G., & Levi, B. Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271(2), 736-741.
- Collins, A., & Bloomston, M. (2009). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 55(4), 445-454.
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *Int J Mol Sci*, 14(8), 16365-16385. doi:10.3390/ijms140816365
- Cong, L., Liu, Q., Zhang, R., Cui, M., Zhang, X., Gao, X., Guo, J., Dai, M., Zhang, T., Liao, Q., & Zhao, Y. (2018). Tumor size classification of the 8(th) edition of TNM staging system is superior to that of the 7(th) edition in predicting the survival outcome of pancreatic cancer patients after radical resection and adjuvant chemotherapy. *Sci Rep*, 8(1), 10383. doi:10.1038/s41598-018-28193-4
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Abdelghani, M. B., Wei, A. C.-c., Raoul, J.-L., Chone, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Jouffroy-Zeller, C., RAT, P., Castan, F., & Bachet, J.-B. (2018). Unicancer GI PRODIGE 24/CCTG PA.6 trial: A multicenter international randomized phase III trial of adjuvant mFOLFIRINOX versus gemcitabine (gem) in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 36(18_suppl), LBA4001-LBA4001. doi:10.1200/JCO.2018.36.18_suppl.LBA4001
- Coussens, L. M., Fingleton, B., Matasisian L.M. (2002). Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations. *Science*, 295.
- Craven, K. E., Gore, J., & Korc, M. (2016a). Overview of pre-clinical and clinical studies targeting angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 381(1), 201-210. doi:10.1016/j.canlet.2015.11.047
- Craven, K. E., Gore, J., Wilson, J. L., & Korc, M. (2016b). Angiogenic gene signature in human pancreatic cancer correlates with TGF-beta and inflammatory transcriptomes. *Oncotarget*, 7(1), 323-341. doi:10.18632/oncotarget.6345
- Crnogorac-Jurcevic, T., Chelala, C., Barry, S., Harada, T., Bhakta, V., Lattimore, S., Jurcevic, S., Bronner, M., Lemoine, N. R., & Brentnall, T. A. (2013). Molecular analysis of precursor lesions in familial pancreatic cancer. *PLoS One*, 8(1), e54830. doi:10.1371/journal.pone.0054830
- Curtis, V. F., Wang, H., Yang, P., McLendon, R. E., Li, X., Zhou, Q. Y., & Wang, X. F. (2013). A PK2/Bv8/PROK2 antagonist suppresses tumorigenic processes by inhibiting angiogenesis in glioma and blocking myeloid cell infiltration in pancreatic cancer. *PLoS One*, 8(1), e54916. doi:10.1371/journal.pone.0054916

- De La Cruz, M. S., Young, A. P., & Ruffin, M. T. (2014). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *Am Fam Physician*, *89*(8), 626-632.
- De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P., & Delrio, P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*, *34*(3), 1087-1096. doi:10.3892/or.2015.4108
- Demir, I. E., Boldis, A., Pfitzinger, P. L., Teller, S., Brunner, E., Klose, N., Kehl, T., Maak, M., Lesina, M., Laschinger, M., Janssen, K. P., Algul, H., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst*, *106*(8). doi:10.1093/jnci/dju184
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Liebl, F., D'Haese, J. G., Maak, M., & Friess, H. (2010a). Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future. *Cancers (Basel)*, *2*(3), 1513-1527. doi:10.3390/cancers2031513
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Rauch, U., Altintas, B., Klotz, M., Muller, M. W., Buchler, M. W., Friess, H., & Schafer, K. H. (2010b). The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*, *22*(4), 480-490, e112-483. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01428.x
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2012). Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer. *Front Physiol*, *3*, 97. doi:10.3389/fphys.2012.00097
- Demir, I. E., Schorn, S., Schremmer-Danninger, E., Wang, K., Kehl, T., Giese, N. A., Algul, H., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2013). Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *PLoS One*, *8*(3), e60529. doi:10.1371/journal.pone.0060529
- Des Guetz, G., Uzzan, B., Nicolas, P., Cucherat, M., Morere, J. F., Benamouzig, R., Breau, J. L., & Perret, G. Y. (2006). Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer*, *94*(12), 1823-1832. doi:10.1038/sj.bjc.6603176
- Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF. (2013). Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Kurzversion 1.0, 201311.0, 1-69. Retrieved from <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
- Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF. (2017). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzfassung 2.0, 2017, .
- Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF. (2019). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.1. *Leitlinienprogramm Onkologie*, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 22.11.2019].
- Dima, S. O., Tanase, C., Albulescu, R., Herlea, V., Chivu-Economescu, M., Purnichescu-Purtan, R., Dumitrascu, T., Duda, D. G., & Popescu, I. (2012). An exploratory study of inflammatory cytokines as prognostic biomarkers in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, *41*(7), 1001-1007. doi:10.1097/MPA.0b013e3182546e13
- Doi, R., Ikeda, H., Kobayashi, H., Kogire, M., & Imamura, M. (2003). Carcinoma in the remnant pancreas after distal pancreatectomy for carcinoma. *Eur J Surg Suppl*(588), 62-65.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, *2*(3), 161-174. doi:10.1038/nrc745
- Engler, A., Zhang, R., & Taylor, V. (2018). Notch and Neurogenesis. *Adv Exp Med Biol*, *1066*, 223-234. doi:10.1007/978-3-319-89512-3_11
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Deucker, S., Sauliunaite, D., Streit, S., Esposito, I., Friess, H., & Kleeff, J. (2009). Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia*, *11*(5), 497-508.

- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., & Kleeff, J. (2010). Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Exp Oncol*, 32(3), 128-131.
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & 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. doi:10.1007/s00292-012-1673-x
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & Kloppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: facts, challenges and future developments. *World J Gastroenterol*, 20(38), 13833-13841. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13833
- Ettrich, T., & Kächele, V. (2016). Pankreaskarzinom- Comprehensive Cancer Center Ulm (CCCU) - Universitätsklinikum Ulm. Retrieved from <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/pankreaskarzinom.html>
- Feurino, L. W., Zhang, Y., Bharadwaj, U., Zhang, R., Li, F., Fisher, W. E., Brunicardi, F. C., Chen, C., Yao, Q., & Min, L. (2007). IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 6(7), 1096-1100.
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 3(3), 153-173. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
- Folkins, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C. R., Zhu, Z., Hoffman, R. M., & Kerbel, R. S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res*, 69(18), 7243-7251. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0167
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Folkman, J. (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 3(2), 65-71.
- Folkman, J. (1995). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 333(26), 1757-1763. doi:10.1056/NEJM199512283332608
- Folkman, J., & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16), 10931-10934.
- Freelove, R., & Walling, A. D. (2006). Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*, 73(3), 485-492.
- Fujisawa, H., Takagi, S., & Hirata, T. (1995). Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci*, 17(5-6), 343-349. doi:10.1159/000111304
- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
- Galizia, G., Orditura, M., Romano, C., Lieto, E., Castellano, P., Pelosio, L., Imperatore, V., Catalano, G., Pignatelli, C., & De Vita, F. (2002). Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin Immunol*, 102(2), 169-178. doi:10.1006/clim.2001.5163
- Gil, Z., Cavel, O., Kelly, K., Brader, P., Rein, A., Gao, S. P., Carlson, D. L., Shah, J. P., Fong, Y., & Wong, R. J. (2010). Paracrine Regulation of Pancreatic Cancer Cell Invasion by Peripheral Nerves. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(2), 107-118. doi:10.1093/jnci/djp456
- Gil, Z., Rein, A., Brader, P., Li, S., Shah, J. P., Fong, Y., & Wong, R. J. (2007). Nerve-sparing therapy with oncolytic herpes virus for cancers with neural invasion. *Clin Cancer Res*, 13(21), 6479-6485. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1639

- Goggins, M. (2005). Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *23*(20), 4524-4531. doi:10.1200/JCO.2005.19.711
- Goggins, M., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (2000). BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol*, *156*(5), 1767-1771. doi:10.1016/S0002-9440(10)65047-X
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., & Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, *15*(2), 103-113. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.001
- Hartwig, W., & Buchler, M. W. (2013). Pancreatic Cancer: Current Options for Diagnosis, Staging and Therapeutic Management. *Gastrointest Tumors*, *1*(1), 41-52. doi:10.1159/000354992
- Haugk, B. (2010). Pancreatic intraepithelial neoplasia-can we detect early pancreatic cancer? *Histopathology*, *57*(4), 503-514. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03610.x
- He, D., Manzoni, A., Florentin, D., Fisher, W., Ding, Y., Lee, M., & Ayala, G. (2016). Biologic effect of neurogenesis in pancreatic cancer. *Hum Pathol*, *52*, 182-189. doi:10.1016/j.humpath.2016.02.001
- Heinemann, V., Reni, M., Ychou, M., Richel, D. J., Macarulla, T., & Ducreux, M. (2014). Tumour-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and current evidence for new therapeutic strategies. *Cancer Treat Rev*, *40*(1), 118-128. doi:10.1016/j.ctrv.2013.04.004
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, *20*(10), 1218-1249. doi:10.1101/gad.1415606
- Hirai, I., Kimura, W., Ozawa, K., Kudo, S., Suto, K., Kuzu, H., & Fuse, A. (2002). Perineural invasion in pancreatic cancer. *Pancreas*, *24*(1), 15-25.
- Holmer, R., Goumas, F. A., Waetzig, G. H., Rose-John, S., & Kalthoff, H. (2014). Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, *13*(4), 371-380.
- Hong, T. M., Chen, Y. L., Wu, Y. Y., Yuan, A., Chao, Y. C., Chung, Y. C., Wu, M. H., Yang, S. C., Pan, S. H., Shih, J. Y., Chan, W. K., & Yang, P. C. (2007). Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res*, *13*(16), 4759-4768. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0001
- Honma, Y., Araki, T., Gianino, S., Bruce, A., Heuckeroth, R., Johnson, E., & Milbrandt, J. (2002). Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron*, *35*(2), 267-282.
- Hoshida, T., Sunamura, M., Duda, D. G., Egawa, S., Miyazaki, S., Shineha, R., Hamada, H., Ohtani, H., Satomi, S., & Matsuno, S. (2002). Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas*, *25*(2), 111-121.
- Hotz, H. G., Gill, P. S., Masood, R., Hotz, B., Buhr, H. J., Foitzik, T., Hines, O. J., & Reber, H. A. (2002). Specific targeting of tumor vasculature by diphtheria toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein reduces angiogenesis and growth of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg*, *6*(2), 159-166; discussion 166.
- Hruban, R. H., & Fukushima, N. (2007). Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. *Mod Pathol*, *20 Suppl 1*, S61-70. doi:10.1038/modpathol.3800685
- Hruban, R. H., & Klimstra, D. S. (2014). Adenocarcinoma of the pancreas. *Semin Diagn Pathol*, *31*(6), 443-451. doi:10.1053/j.semdp.2014.08.004

- Hruban, R. H., Takaori, K., Klimstra, D. S., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Biankin, S. A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., Goggins, M., Kato, Y., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., & Yonezawa, S. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*, *28*(8), 977-987.
- Hruban, R. H., Wilentz, R. E., Goggins, M., Offerhaus, G. J., Yeo, C. J., & Kern, S. E. (1999). Pathology of incipient pancreatic cancer. *Ann Oncol*, *10 Suppl 4*, 9-11.
- Hruban, R. H., Wilentz, R. E., & Kern, S. E. (2000). Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol*, *156*(6), 1821-1825. doi:10.1016/S0002-9440(10)65054-7
- Hustinx, S. R., Leoni, L. M., Yeo, C. J., Brown, P. N., Goggins, M., Kern, S. E., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2005). Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol*, *18*(7), 959-963. doi:10.1038/modpathol.3800377
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Wilentz, R. E., Argani, P., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2000). Dpc4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression. *Am J Surg Pathol*, *24*(11), 1544-1548.
- Imoto, A., Mitsunaga, S., Inagaki, M., Aoyagi, K., Sasaki, H., Ikeda, M., Nakachi, K., Higuchi, K., & Ochiai, A. (2012). Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, *131*(12), 2795-2807. doi:10.1002/ijc.27594
- Itakura, J., Ishiwata, T., Friess, H., Fujii, H., Matsumoto, Y., Buchler, M. W., & Korc, M. (1997). Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res*, *3*(8), 1309-1316.
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M. E., Zecchini, H. I., Lolkema, M. P., Jiang, P., Kultti, A., Thompson, C. B., Maneval, D. C., Jodrell, D. I., Frost, G. I., Shepard, H. M., Skepper, J. N., & Tuveson, D. A. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, *62*(1), 112-120. doi:10.1136/gutjnl-2012-302529
- Jimenez, R. E., Warshaw, A. L., Z'Graggen, K., Hartwig, W., Taylor, D. Z., Compton, C. C., & Fernandez-del Castillo, C. (1999). Sequential accumulation of K-ras mutations and p53 overexpression in the progression of pancreatic mucinous cystic neoplasms to malignancy. *Ann Surg*, *230*(4), 501-509; discussion 509-511.
- Kanji, Z. S., & Gallinger, S. (2013). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *CMAJ*, *185*(14), 1219-1226. doi:10.1503/cmaj.121368
- Kayahara, M., Nagakawa, T., Konishi, I., Ueno, K., Ohta, T., & Miyazaki, I. (1991). Clinicopathological study of pancreatic carcinoma with particular reference to the invasion of the extrapancreatic neural plexus. *Int J Pancreatol*, *10*(2), 105-111.
- Kayahara, M., Nagakawa, T., Tsukioka, Y., Ohta, T., Ueno, K., & Miyazaki, I. (1994). Neural invasion and nodal involvement in distal bile duct cancer. *Hepatogastroenterology*, *41*(2), 190-194.
- Kayahara, M., Nakagawara, H., Kitagawa, H., & Ohta, T. (2007). The nature of neural invasion by pancreatic cancer. *Pancreas*, *35*(3), 218-223. doi:10.1097/mpa.0b013e3180619677

- Kelleher, F. C. (2011). Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, *32*(4), 445-451. doi:10.1093/carcin/bgq280
- Kern, S. E., Hruban, R. H., Hidalgo, M., & Yeo, C. J. (2002). An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer Biol Ther*, *1*(6), 607-613.
- Khorana, A. A., & Fine, R. L. (2004). Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol*, *5*(11), 655-663. doi:10.1016/S1470-2045(04)01606-7
- Kishimoto, T. T., Toshio. (2013). The Biology of Interleukin-6. *Blood*, *74 No 1*. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0620-6_179-1
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., & Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*, *121*(12), 4309-4318.
- 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., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*, *2*, 16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22
- Klimstra, D. S. (2005). Cystic, mucin-producing neoplasms of the pancreas: the distinguishing features of mucinous cystic neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Semin Diagn Pathol*, *22*(4), 318-329.
- Klimstra, D. S., & Longnecker, D. S. (1994). K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am J Pathol*, *145*(6), 1547-1550.
- Kobari, M., Egawa, S., Shibuya, K., Shimamura, H., Sunamura, M., Takeda, K., Matsuno, S., & Furukawa, T. (1999). Intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas comprise 2 clinical subtypes: differences in clinical characteristics and surgical management. *Arch Surg*, *134*(10), 1131-1136.
- Koenig, A., Mueller, C., Hasel, C., Adler, G., & Menke, A. (2006). Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res*, *66*(9), 4662-4671. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2804
- Komar, G., Kauhanen, S., Liukko, K., Seppanen, M., Kajander, S., Ovaska, J., Nuutila, P., & Minn, H. (2009). Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res*, *15*(17), 5511-5517. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0414
- Kong, B., Cheng, T., Wu, W., Regel, I., Raulefs, S., Friess, H., Erkan, M., Esposito, I., Kleeff, J., & Michalski, C. W. (2015). Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, *6*(31), 32154-32160. doi:10.18632/oncotarget.5168
- Koorstra, J. B., Feldmann, G., Habbe, N., & Maitra, A. (2008). Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). *Langenbecks Arch Surg*, *393*(4), 561-570. doi:10.1007/s00423-008-0282-x
- Korc, M. (2003). Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, *2*, 8.
- Krasna, M. J., Flancbaum, L., Cody, R. P., Shneibaum, S., & Ben Ari, G. (1988). Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma. Incidence and prognostic significance. *Cancer*, *61*(5), 1018-1023.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., & Gage, F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci*, *17*(15), 5820-5829.

- Kurosawa, N., Chen, G. Y., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sakuma, S., & Muramatsu, T. (2001). Glypican-2 binds to midkine: the role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconj J*, *18*(6), 499-507.
- Labianca, R., Beretta, G., Gatta, G., de Braud, F., & Wils, J. (2004). Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *51*(2), 145-170. doi:10.1016/j.critrevonc.2004.03.003
- LaConti, J. J., Laiakis, E. C., Mays, A. D., Peran, I., Kim, S. E., Shay, J. W., Riegel, A. T., Fornace, A. J., Jr., & Wellstein, A. (2015). Distinct serum metabolomics profiles associated with malignant progression in the KrasG12D mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Genomics*, *16 Suppl 1*, S1. doi:10.1186/1471-2164-16-S1-S1
- Lesina, M., Kurkowski, M. U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Kloppel, G., Yoshimura, A., Reindl, W., Sipos, B., Akira, S., Schmid, R. M., & Algul, H. (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell*, *19*(4), 456-469. doi:10.1016/j.ccr.2011.03.009
- Levy, M. J., Topazian, M., Keeney, G., Clain, J. E., Gleeson, F., Rajan, E., Wang, K. K., Wiersema, M. J., Farnell, M., & Chari, S. (2006). Preoperative diagnosis of extrapancreatic neural invasion in pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *4*(12), 1479-1482. doi:10.1016/j.cgh.2006.08.012
- Licht, T., Rothe, G., Kreisel, T., Wolf, B., Benny, O., Rooney, A. G., Ffrench-Constant, C., Enikolopov, G., & Keshet, E. (2016). VEGF preconditioning leads to stem cell remodeling and attenuates age-related decay of adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(48), E7828-E7836. doi:10.1073/pnas.1609592113
- Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J., Verstovsek, G., Liu, H., Agarwal, N., Berger, D. H., & Albo, D. (2009). Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, *27*(31), 5131-5137. doi:10.1200/JCO.2009.22.4949
- Liebl, F., Demir, I. E., Mayer, K., Schuster, T., D'Haese, J. G., Becker, K., Langer, R., Bergmann, F., Wang, K., Rosenberg, R., Novotny, A. R., Feith, M., Reim, D., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2014). The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Ann Surg*, *260*(5), 900-907; discussion 907-908. doi:10.1097/SLA.0000000000000968
- Liggett, W. H., Jr., & Sidransky, D. (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*, *16*(3), 1197-1206.
- Liu, B., & Lu, K. Y. (2002). Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, *1*(3), 469-476.
- Liu, F. (2001). SMAD4/DPC4 and pancreatic cancer survival. Commentary re: M. Tascilar et al., The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, *7*: 4115-4121, 2001. *Clin Cancer Res*, *7*(12), 3853-3856.
- Lohr, M., Kloppel, G., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B., & Luttges, J. (2005). Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*, *7*(1), 17-23. doi:10.1593/neo.04445
- Longo, V., Brunetti, O., Gnoni, A., Cascinu, S., Gasparini, G., Lorusso, V., Ribatti, D., & Silvestris, N. (2016). Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: A controversial issue. *Oncotarget*, *7*(36), 58649-58658. doi:10.18632/oncotarget.10765
- Mace, T. A., Shakya, R., Pitarresi, J. R., Swanson, B., McQuinn, C. W., Loftus, S., Nordquist, E., Cruz-Monserrate, Z., Yu, L., Young, G., Zhong, X., Zimmers, T. A., Ostrowski, M. C., Ludwig, T., Bloomston, M., Bekaii-Saab, T., & Lesinski, G. B. (2018). IL-6 and

- PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut*, 67(2), 320-332. doi:10.1136/gutjnl-2016-311585
- Maeda, S., Shintani, H., Kurahara, H., Mataka, Y., Noma, H., Maemura, K., Aridome, K., Yokomine, T., Natsugoe, S., Aikou, T., & Takao, S. (2007). Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer*, 97(3), 405-411. doi:10.1038/sj.bjc.6603879
- Mahadevan, D., & Von Hoff, D. D. (2007). Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1186-1197. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0686
- Makohon-Moore, A., Brosnan, J. A., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2013). Pancreatic cancer genomics: insights and opportunities for clinical translation. *Genome Med*, 5(3), 26. doi:10.1186/gm430
- Makohon-Moore, A., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2016). Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer*, 16(9), 553-565. doi:10.1038/nrc.2016.66
- Marchesi, F., Locatelli, M., Solinas, G., Erreni, M., Allavena, P., & Mantovani, A. (2010). Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer. *J Neuroimmunol*, 224(1-2), 39-44. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.007
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361(25), 2449-2460. doi:10.1056/NEJMra0804588
- McCarthy, D. M., Brat, D. J., Wilentz, R. E., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling. *Hum Pathol*, 32(6), 638-642. doi:10.1053/hupa.2001.24991
- Meduri, F., Diana, F., Merenda, R., Losacco, L., Zuin, A., Cecchetto, A., Gerunda, G. E., Neri, D., Zangrandi, F., & Maffei-Faccioli, A. (1994). Pancreatic cancer and retroperitoneal neural tissue invasion. Its implication for survival following radical surgery. *Zentralbl Pathol*, 140(3), 277-279.
- Meeke, A. K., & De Marzo, A. M. (2004). Recent advances in telomere biology: implications for human cancer. *Curr Opin Oncol*, 16(1), 32-38.
- Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., & Chedotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer*, 11(3), 188-197. doi:10.1038/nrc3005
- Miao, H. Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., & Klagsbrun, M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J*, 14(15), 2532-2539. doi:10.1096/fj.00-0250com
- Michikawa, M., Kikuchi, S., Muramatsu, H., Muramatsu, T., & Kim, S. U. (1993). Retinoic acid responsive gene product, midkine, has neurotrophic functions for mouse spinal cord and dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurosci Res*, 35(5), 530-539. doi:10.1002/jnr.490350509
- Miron, N., Miron, M. M., Milea, V. G., & Cristea, V. (2010). Proinflammatory cytokines: an insight into pancreatic oncogenesis. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 69(4), 183-189.
- Mitry, E., Guiu, B., Coscinea, S., Jooste, V., Faivre, J., & Bouvier, A. M. (2010). Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut*, 59(10), 1383-1388. doi:10.1136/gut.2010.211557

- Mitsunaga, S., Okusaka, T., Ikeda, M., Ozaka, M., Ohkawa, S., Ioka, T., Shimura, T., Sato, K., Terao, K., Ochiai, A., & Furuse, J. (2017). Multicenter, Open-Label, Phase I/II Study of Tocilizumab, an Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody, Combined with Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *Journal of Medical Diagnostic Methods*, *06*(01). doi:10.4172/2168-9784.1000234
- Morris, J. P. t., Wang, S. C., & Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*, *10*(10), 683-695. doi:10.1038/nrc2899
- Morton, J. P., Timpson, P., Karim, S. A., Ridgway, R. A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N. B., Oien, K. A., Lowy, A. M., Brunton, V. G., Frame, M. C., Evans, T. R., & Sansom, O. J. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(1), 246-251. doi:10.1073/pnas.0908428107
- Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (1997). p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, *57*(11), 2140-2143.
- Muller, M. W., Friess, H., Kleeff, J., Dahmen, R., Wagner, M., Hinz, U., Breisch-Girbig, D., Ceyhan, G. O., & Buchler, M. W. (2007). Is there still a role for total pancreatectomy? *Ann Surg*, *246*(6), 966-974; discussion 974-965. doi:10.1097/SLA.0b013e31815c2ca3
- Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, *25*(3), 304-317. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.021
- Murtaugh, L. C., & Leach, S. D. (2007). A case of mistaken identity? Noductal origins of pancreatic "ductal" cancers. *Cancer Cell*, *11*(3), 211-213. doi:10.1016/j.ccr.2007.02.020
- Na'ara, S., Gil, Z., & Amit, M. (2016). In Vitro Modeling of Cancerous Neural Invasion: The Dorsal Root Ganglion Model. *J Vis Exp*(110), e52990. doi:10.3791/52990
- Nagaraju, G. P., Zhu, S., Ko, J. E., Ashritha, N., Kandimalla, R., Snyder, J. P., Shoji, M., & El-Rayes, B. F. (2015). Antiangiogenic effects of a novel synthetic curcumin analogue in pancreatic cancer. *Cancer Lett*, *357*(2), 557-565. doi:10.1016/j.canlet.2014.12.007
- Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M., & Takeyama, H. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*, *110*(2), 469-478. doi:10.1038/bjc.2013.748
- Neesse, A., Michl, P., Frese, K. K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M. A., Lolkema, M. P., Buchholz, M., Olive, K. P., Gress, T. M., & Tuveson, D. A. (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, *60*(6), 861-868. doi:10.1136/gut.2010.226092
- 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., Darby, S., Meyer, T., Gillmore, R., Anthoney, A., Lind, P., Glimelius, B., Falk, S., Izbicki, J. R., Middleton, G. W., Cummins, S., Ross, P. J., Wasan, H., McDonald, A., Crosby, T., Ma, Y. T., Patel, K., Sherriff, D., Soomal, R., Borg, D., Sothi, S., Hammel, P., Hackert, T., Jackson, R., Buchler, M. W., & European Study Group for Pancreatic, C. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label,

- randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 389(10073), 1011-1024. doi:10.1016/S0140-6736(16)32409-6
- Nolan, D. J., Ciarrocchi, A., Mellick, A. S., Jaggi, J. S., Bambino, K., Gupta, S., Heikamp, E., McDevitt, M. R., Scheinberg, D. A., Benezra, R., & Mittal, V. (2007). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev*, 21(12), 1546-1558. doi:10.1101/gad.436307
- Ogawa, T., Takayama, K., Takakura, N., Kitano, S., & Ueno, H. (2002). Anti-tumor angiogenesis therapy using soluble receptors: enhanced inhibition of tumor growth when soluble fibroblast growth factor receptor-1 is used with soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cancer Gene Ther*, 9(8), 633-640. doi:10.1038/sj.cgt.7700478
- Okada, Y., Eibl, G., Duffy, J. P., Reber, H. A., & Hines, O. J. (2003). Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer. *Surgery*, 134(2), 293-299. doi:10.1067/msy.2003.239
- Okusaka, T., Okada, S., Ueno, H., Ikeda, M., Shimada, K., Yamamoto, J., Kosuge, T., Yamasaki, S., Fukushima, N., & Sakamoto, M. (2001). Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings. *Pancreas*, 22(3), 279-284.
- 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., Frese, K. K., Denicola, G., Feig, C., Combs, C., Winter, S. P., Ireland-Zecchini, H., Reichelt, S., Howat, W. J., Chang, A., Dhara, M., Wang, L., Ruckert, F., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Izeradjene, K., Hingorani, S. R., Huang, P., Davies, S. E., Plunkett, W., Egorin, M., Hruban, R. H., Whitebread, N., McGovern, K., Adams, J., Iacobuzio-Donahue, C., Griffiths, J., & Tuveson, D. A. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933), 1457-1461. doi:10.1126/science.1171362
- Olson, S. H., Xu, Y., Herzog, K., Saldia, A., DeFilippis, E. M., Li, P., Allen, P. J., O'Reilly, E. M., & Kurtz, R. C. (2016). Weight Loss, Diabetes, Fatigue, and Depression Preceding Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 45(7), 986-991. doi:10.1097/MPA.0000000000000590
- Oncotrends. (2018). <Fortschritte insbesondere im Bereich der adjuvanten Therapie bei Patienten mit Pankreaskarzinom - On.pdf>.
- 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., De Jesus-Acosta, A., Sharma, P., Heidari, P., Mahmood, U., Chin, L., Moses, H. L., Weaver, V. M., Maitra, A., Allison, J. P., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25(6), 719-734. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005
- Palmer, T. D. (2000). Vascular Niche for Adult Hippocampal Neurogenesis.
- Paratcha, G., Ibanez, C. F., & Ledda, F. (2006). GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci*, 31(3), 505-514. doi:10.1016/j.mcn.2005.11.007
- Parikh, A. A., Fan, F., Liu, W. B., Ahmad, S. A., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bielenberg, D., Bucana, C. D., Klagsbrun, M., & Ellis, L. M. (2004). Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol*, 164(6), 2139-2151. doi:10.1016/S0002-9440(10)63772-8

- Pasca di Magliano, M., & Hebrok, M. (2003). Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 3(12), 903-911. doi:10.1038/nrc1229
- Phillips, P. A., McCarroll, J. A., Park, S., Wu, M. J., Pirola, R., Korsten, M., Wilson, J. S., & Apte, M. V. (2003). Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover. *Gut*, 52(2), 275-282.
- Pour, P. M., Bell, R. H., & Batra, S. K. (2003). Neural invasion in the staging of pancreatic cancer. *Pancreas*, 26(4), 322-325.
- Pour, P. M., Egami, H., & Takiyama, Y. (1991). Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications. *Gastroenterology*, 100(2), 529-536.
- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 418-429. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*, 11(11), 761-774. doi:10.1038/nrc3106
- Qiagen. (2010a). Human Angiogenesis PCR Array. Retrieved from http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-024Z.html
- Qiagen. (2010b). Human Neurotrophins & Receptors PCR Array. Retrieved from http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-031Z.html
- Rad, R., Rad, L., Wang, W., Strong, A., Ponstingl, H., Bronner, I. F., Mayho, M., Steiger, K., Weber, J., Hieber, M., Veltkamp, C., Eser, S., Geumann, U., Ollinger, R., Zukowska, M., Barenboim, M., Maresch, R., Cadinanos, J., Friedrich, M., Varela, I., Constantino-Casas, F., Sarver, A., Ten Hoeve, J., Prosser, H., Seidler, B., Bauer, J., Heikenwalder, M., Metzakopian, E., Krug, A., Ehmer, U., Schneider, G., Knosel, T., Rummele, P., Aust, D., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Ning, Z., Wessels, L., Schmid, R. M., Quail, M. A., Vassiliou, G., Esposito, I., Liu, P., Saur, D., & Bradley, A. (2015). A conditional piggyBac transposition system for genetic screening in mice identifies oncogenic networks in pancreatic cancer. *Nat Genet*, 47(1), 47-56. doi:10.1038/ng.3164
- Rawnaq, T., Dietrich, L., Wolters-Eisfeld, G., Uzunoglu, F. G., Vashist, Y. K., Bachmann, K., Simon, R., Izbicki, J. R., Bockhorn, M., & Gungor, C. (2014). The multifunctional growth factor midkine promotes proliferation and migration in pancreatic cancer. *Mol Cancer Res*, 12(5), 670-680. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0467
- Renz, B. W., Takahashi, R., Tanaka, T., Macchini, M., Hayakawa, Y., Dantes, Z., Maurer, H. C., Chen, X., Jiang, Z., Westphalen, C. B., Ilmer, M., Valenti, G., Mohanta, S. K., Habenicht, A. J. R., Middelhoff, M., Chu, T., Nagar, K., Tailor, Y., Casadei, R., Di Marco, M., Kleespies, A., Friedman, R. A., Remotti, H., Reichert, M., Worthley, D. L., Neumann, J., Werner, J., Iuga, A. C., Olive, K. P., & Wang, T. C. (2018). beta2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 33(1), 75-90 e77. doi:10.1016/j.ccell.2017.11.007
- 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., Westphalen, C. B., Kitajewski, J., Fernandez-Barrena, M. G., Fernandez-Zapico, M. E., Iacobuzio-Donahue, C., Olive, K. P., & Stanger, B. Z. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 25(6), 735-747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021
- Robert Koch Institut, Z. f. K. (2015). Krebs in Deutschland: Bauchspeicheldrüse C25, 50-53. Retrieved from Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts

website:

- http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c25_bauchspeicheldruese.pdf?__blob=publicationFile
- Robert Koch Institut, Z. f. K. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. doi:10.17886/rkipubl-2017-07
- Rodier, F., Kim, S. H., Nijjar, T., Yaswen, P., & Campisi, J. (2005). Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 977-990. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.012
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J., & Kern, S. E. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 57(9), 1731-1734.
- Rulyak, S. J., Kimmey, M. B., Veenstra, D. L., & Brentnall, T. A. (2003). Cost-effectiveness of pancreatic cancer screening in familial pancreatic cancer kindreds. *Gastrointest Endosc*, 57(1), 23-29. doi:10.1067/mge.2003.28
- Safi, F., Beger, H. G., Bittner, R., Buchler, M., & Krautzberger, W. (1986). CA 19-9 and pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 57(4), 779-783.
- Sage, E. H., & Vernon, R. B. (1994). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J Hypertens Suppl*, 12(10), S145-152.
- Saif, M. W., Li, J., Lamb, L., Kaley, K., Elligers, K., Jiang, Z., Bussom, S., Liu, S. H., & Cheng, Y. C. (2014). First-in-human phase II trial of the botanical formulation PHY906 with capecitabine as second-line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73(2), 373-380. doi:10.1007/s00280-013-2359-7
- Sakaguchi, N., Muramatsu, H., Ichihara-Tanaka, K., Maeda, N., Noda, M., Yamamoto, T., Michikawa, M., Ikematsu, S., Sakuma, S., & Muramatsu, T. (2003). Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res*, 45(2), 219-224.
- Sakamoto, K., & Kadomatsu, K. (2012). Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathology International*, 62(7), 445-455. doi:10.1111/j.1440-1827.2012.02815.x
- Salvia, R., Festa, L., Butturini, G., Tonsi, A., Sartori, N., Biasutti, C., Capelli, P., & Pederzoli, P. (2004). Pancreatic cystic tumors. *Minerva Chir*, 59(2), 185-207.
- Scheede-Bergdahl, C., Watt, H. L., Trutschnigg, B., Kilgour, R. D., Haggarty, A., Lucar, E., & Viganò, A. (2012). Is IL-6 the best pro-inflammatory biomarker of clinical outcomes of cancer cachexia? *Clin Nutr*, 31(1), 85-88. doi:10.1016/j.clnu.2011.07.010
- Semenza, G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* (1985), 88(4), 1474-1480. doi:10.1152/jappl.2000.88.4.1474
- Seufferlein, T., Porzner, M., Becker, T., Budach, V., Ceyhan, G., Esposito, I., Fietkau, R., Follmann, M., Friess, H., Galle, P., Geissler, M., Glanemann, M., Gress, T., Heinemann, V., Hohenberger, W., Hopt, U., Izbicki, J., Klar, E., Kleeff, J., Kopp, I., Kullmann, F., Langer, T., Langrehr, J., Lerch, M., Lohr, M., Luttges, J., Lutz, M., Mayerle, J., Michl, P., Moller, P., Molls, M., Munter, M., Nothacker, M., Oettle, H., Post, S., Reinacher-Schick, A., Rocken, C., Roeb, E., Saeger, H., Schmid, R., Schmiegel, W., Schoenberg, M., Siveke, J., Stuschke, M., Tannapfel, A., Uhl, W., Unverzagt, S., van Oorschot, B., Vashist, Y., Werner, J., Yekebas, E., Guidelines Programme Oncology, A., German Cancer Society e, V., & German Cancer, A. (2013). [S3-guideline exocrine pancreatic cancer]. *Z Gastroenterol*, 51(12), 1395-1440. doi:10.1055/s-0033-1356220

- Seymour, A. B., Hruban, R. H., Redston, M., Caldas, C., Powell, S. M., Kinzler, K. W., Yeo, C. J., & Kern, S. E. (1994). Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, *54*(10), 2761-2764.
- Sharma, S., & Green, K. B. (2004). The pancreatic duct and its arteriovenous relationship: an underutilized aid in the diagnosis and distinction of pancreatic adenocarcinoma from pancreatic intraepithelial neoplasia. A study of 126 pancreatotomy specimens. *Am J Surg Pathol*, *28*(5), 613-620.
- 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., Martin, P., Tseng, T. W., Dawson, D. W., Donahue, T. R., Masamune, A., Shimosegawa, T., Apte, M. V., Wilson, J. S., Ng, B., Lau, S. L., Gunton, J. E., Wahl, G. M., Hunter, T., Drebin, J. A., O'Dwyer, P. J., Liddle, C., Tuveson, D. A., Downes, M., & Evans, R. M. (2014). Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell*, *159*(1), 80-93. doi:10.1016/j.cell.2014.08.007
- Shibaji, T., Nagao, M., Ikeda, N., Kanehiro, H., Hisanaga, M., Ko, S., Fukumoto, A., & Nakajima, Y. (2003). Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res*, *23*(6C), 4721-4727.
- Singh, M., & Maitra, A. (2007). Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications. *Pancreatology*, *7*(1), 9-19. doi:10.1159/000101873
- Sohn, T. A., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Hruban, R. H., Fukushima, N., Campbell, K. A., & Lillemoe, K. D. (2004). Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: an updated experience. *Ann Surg*, *239*(6), 788-797; discussion 797-789.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, *92*(6), 735-745.
- Solorzano, C. C., Baker, C. H., Bruns, C. J., Killion, J. J., Ellis, L. M., Wood, J., & Fidler, I. J. (2001). Inhibition of growth and metastasis of human pancreatic cancer growing in nude mice by PTK 787/ZK222584, an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases. *Cancer Biother Radiopharm*, *16*(5), 359-370. doi:10.1089/108497801753354267
- Spivak-Kroizman, T. R., Hostetter, G., Posner, R., Aziz, M., Hu, C., Demeure, M. J., Von Hoff, D., Hingorani, S. R., Palculict, T. B., Izzo, J., Kiriakova, G. M., Abdelmelek, M., Bartholomeusz, G., James, B. P., & Powis, G. (2013). Hypoxia triggers hedgehog-mediated tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Cancer Res*, *73*(11), 3235-3247. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1433
- Stathis, A., & Moore, M. J. (2010). Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*, *7*(3), 163-172. doi:10.1038/nrclinonc.2009.236
- Sugiyama, M., Izumisato, Y., Abe, N., Masaki, T., Mori, T., & Atomi, Y. (2003). Predictive factors for malignancy in intraductal papillary-mucinous tumours of the pancreas. *Br J Surg*, *90*(10), 1244-1249. doi:10.1002/bjs.4265
- Taipale, J., & Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, *411*(6835), 349-354. doi:10.1038/35077219
- Takahashi, T., Nakamura, F., Jin, Z., Kalb, R. G., & Strittmatter, S. M. (1998). Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci*, *1*(6), 487-493. doi:10.1038/2203
- Takaori, K. (2007). Current understanding of precursors to pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, *14*(3), 217-223. doi:10.1007/s00534-006-1165-6

- Takaori, K., Kobashi, Y., Matsusue, S., Matsui, K., & Yamamoto, T. (2003). Clinicopathological features of pancreatic intraepithelial neoplasias and their relationship to intraductal papillary-mucinous tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, *10*(2), 125-136. doi:10.1007/s00534-003-0756-8
- Takebayashi, Y., Aklyama, S., Yamada, K., Akiba, S., & Aikou, T. (1996). Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma. *Cancer*, *78*(2), 226-231. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960715)78:2<226::AID-CNCR6>3.0.CO;2-J
- Tang, M. J., Worley, D., Sanicola, M., & Dressler, G. R. (1998). The RET-glia cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. *J Cell Biol*, *142*(5), 1337-1345.
- Tang, R. F., Itakura, J., Aikawa, T., Matsuda, K., Fujii, H., Korc, M., & Matsumoto, Y. (2001). Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer. *Pancreas*, *22*(3), 285-292.
- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*, *13*(1), 120-135. doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103
- Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L., & Hebrok, M. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, *425*(6960), 851-856. doi:10.1038/nature02009
- Tian, H., Callahan, C. A., DuPree, K. J., Darbonne, W. C., Ahn, C. P., Scales, S. J., & de Sauvage, F. J. (2009). Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(11), 4254-4259. doi:10.1073/pnas.0813203106
- Tol, J. A., Gouma, D. J., Bassi, C., Dervenis, C., Montorsi, M., Adham, M., Andren-Sandberg, A., Asbun, H. J., Bockhorn, M., Buchler, M. W., Conlon, K. C., Fernandez-Cruz, L., Fingerhut, A., Friess, H., Hartwig, W., Izbicki, J. R., Lillemoe, K. D., Milicevic, M. N., Neoptolemos, J. P., Shrikhande, S. V., Vollmer, C. M., Yeo, C. J., Charnley, R. M., & International Study Group on Pancreatic, S. (2014). Definition of a standard lymphadenectomy in surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma: a consensus statement by the International Study Group on Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*, *156*(3), 591-600. doi:10.1016/j.surg.2014.06.016
- Tse, B. W. C., Volpert, M., Ratther, E., Stylianou, N., Nouri, M., McGowan, K., Lehman, M. L., McPherson, S. J., Roshan-Moniri, M., Butler, M. S., Caradec, J., Gregory-Evans, C. Y., McGovern, J., Das, R., Takhar, M., Erho, N., Alshalafa, M., Davicioni, E., Schaeffer, E. M., Jenkins, R. B., Ross, A. E., Karnes, R. J., Den, R. B., Fazli, L., Gregory, P. A., Gleave, M. E., Williams, E. D., Rennie, P. S., Buttyan, R., Gunter, J. H., Selth, L. A., Russell, P. J., Nelson, C. C., & Hollier, B. G. (2017). Neuropilin-1 is upregulated in the adaptive response of prostate tumors to androgen-targeted therapies and is prognostic of metastatic progression and patient mortality. *Oncogene*, *36*(24), 3417-3427. doi:10.1038/onc.2016.482
- Vainer, N., Dehlendorff, C., & Johansen, J. S. (2018). Systematic literature review of IL-6 as a biomarker or treatment target in patients with gastric, bile duct, pancreatic and colorectal cancer. *Oncotarget*, *9*(51), 29820-29841. doi:10.18632/oncotarget.25661
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, *378*(9791), 607-620. doi:10.1016/s0140-6736(10)62307-0
- Walter, K., Omura, N., Hong, S. M., Griffith, M., Vincent, A., Borges, M., & Goggins, M. (2010). Overexpression of smoothed activates the sonic hedgehog signaling

- pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Clin Cancer Res*, 16(6), 1781-1789. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1913
- Wang, L., Zhi, X., Zhu, Y., Zhang, Q., Wang, W., Li, Z., Tang, J., Wang, J., Wei, S., Li, B., Zhou, J., Jiang, J., Yang, L., Xu, H., & Xu, Z. (2015). MUC4-promoted neural invasion is mediated by the axon guidance factor Netrin-1 in PDAC. *Oncotarget*, 6(32), 33805-33822. doi:10.18632/oncotarget.5668
- Warner-Schmidt, J. L., & Duman, R. S. (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16(3), 239-249. doi:10.1002/hipo.20156
- Wehr, A. Y., Furth, E. E., Sangar, V., Blair, I. A., & Yu, K. H. (2011). Analysis of the human pancreatic stellate cell secreted proteome. *Pancreas*, 40(4), 557-566. doi:10.1097/MPA.0b013e318214efaf
- Wei, D., Le, X., Zheng, L., Wang, L., Frey, J. A., Gao, A. C., Peng, Z., Huang, S., Xiong, H. Q., Abbruzzese, J. L., & Xie, K. (2003a). Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 22(3), 319-329. doi:10.1038/sj.onc.1206122
- Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Lai, K. B., Lee, C. N., & Hsieh, C. Y. (2003b). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22(10), 1517-1527. doi:10.1038/sj.onc.1206226
- Wilentz, R. E., Albores-Saavedra, J., & Hruban, R. H. (2000a). Mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol*, 17(1), 31-42.
- Wilentz, R. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., McCarthy, D. M., Parsons, J. L., Yeo, C. J., Kern, S. E., & Hruban, R. H. (2000b). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res*, 60(7), 2002-2006.
- Wille, C., Kohler, C., Armacki, M., Jamali, A., Gossele, U., Pfizenmaier, K., Seufferlein, T., & Eiseler, T. (2014). Protein kinase D2 induces invasion of pancreatic cancer cells by regulating matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell*, 25(3), 324-336. doi:10.1091/mbc.E13-06-0334
- Wong, G. Y., Schroeder, D. R., Carns, P. E., Wilson, J. L., Martin, D. P., Kinney, M. O., Mantilla, C. B., & Warner, D. O. (2004). Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, 291(9), 1092-1099. doi:10.1001/jama.291.9.1092
- Yachida, S., White, C. M., Naito, Y., Zhong, Y., Brosnan, J. A., Macgregor-Das, A. M., Morgan, R. A., Saunders, T., Laheru, D. A., Herman, J. M., Hruban, R. H., Klein, A. P., Jones, S., Velculescu, V., Wolfgang, C. L., & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2012). Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res*, 18(22), 6339-6347. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1215
- Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Bradley, W. D., Lee, R. J., Schostack, K., Simcox, M. E., Kopetz, S., Heimbrosk, D., Lestini, B., Bollag, G., & Su, F. (2012). Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Res*, 72(3), 779-789. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2941
- Yao, J., Li, W. Y., Li, S. G., Feng, X. S., & Gao, S. G. (2014). Midkine promotes perineural invasion in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 20(11), 3018-3024. doi:10.3748/wjg.v20.i11.3018
- Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J. C., Rubin, L. L., &

- de Sauvage, F. J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, *455*(7211), 406-410. doi:10.1038/nature07275
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & DePinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, *30*(4), 355-385. doi:10.1101/gad.275776.115
- Yoshimura, H., Dhar, D. K., Kohno, H., Kubota, H., Fujii, T., Ueda, S., Kinugasa, S., Tachibana, M., & Nagasue, N. (2004). Prognostic impact of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. *Clin Cancer Res*, *10*(24), 8554-8560. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0946-03
- Yuan, H., Chen, R., Wu, L., Chen, Q., Hu, A., Zhang, T., Wang, Z., & Zhu, X. (2015). The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice. *Mol Neurobiol*, *51*(2), 512-522. doi:10.1007/s12035-014-8717-6
- Zamboni, G., Scarpa, A., Bogina, G., Iacono, C., Bassi, C., Talamini, G., Sessa, F., Capella, C., Solcia, E., Rickaert, F., Mariuzzi, G. M., & Kloppel, G. (1999). Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol*, *23*(4), 410-422.
- Zhang, H. R., Chen, F. L., Xu, C. P., Ping, Y. F., Wang, Q. L., Liang, Z. Q., Wang, J. M., & Bian, X. W. (2009). Incorporation of endothelial progenitor cells into the neovasculature of malignant glioma xenograft. *J Neurooncol*, *93*(2), 165-174. doi:10.1007/s11060-008-9757-4
- Zhang, Y., Yan, W., Collins, M. A., Bednar, F., Rakshit, S., Zetter, B. R., Stanger, B. Z., Chung, I., Rhim, A. D., & di Magliano, M. P. (2013). Interleukin-6 is required for pancreatic cancer progression by promoting MAPK signaling activation and oxidative stress resistance. *Cancer Res*, *73*(20), 6359-6374. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1558-T
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, *132*(4), 645-660. doi:10.1016/j.cell.2008.01.033
- Zhao, X., Liu, H. Q., Li, J., & Liu, X. L. (2016). Endothelial progenitor cells promote tumor growth and progression by enhancing new vessel formation. *Oncol Lett*, *12*(2), 793-799. doi:10.3892/ol.2016.4733
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., & Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, *17*(8), 2419-2428.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, nach Geschlecht, ICD-10 C25, Deutschland 1999-2014/2015 (Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts, 2017).....	8
Abbildung 2: Altersspezifische Erkrankungsrate nach Geschlecht, ICD-10 C25, Deutschland 2013-2014 je 100.000 (Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts, 2017).	9
Abbildung 3: PanIN-Progression über Akkumulation genetischer Mutationen und morphologischer Aberrationen zum invasiven Karzinom im zeitlichen Verlauf (Arnold et al., 2001), überarbeitete Abbildung nach (Hruban et al., 2000), adaptiert von (Wilentz et al., 2000b), Illustration Jennifer L. Parsons	14
Abbildung 4: Blutgefäße und Tumorzellen im PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und H.E.-Färbung, a-c: normal, d-f: beginnende Angioinvasion (TZ: Tumorzellen, BM: Basalmembran des Blutgefäßes), eigene Färbungen.....	18
Abbildung 5: Nerven im humanen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und H.E., a-c: normal, d-f: Beginn perineuraler Invasion (Nerv-Tumor-Interaktion), eigene Färbungen	21
Abbildung 6: Nerv im Längsschnitt im humanen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und H.E.-Färbung, a-c: massive endoneurale Invasion, eigene Färbung.....	22
Abbildung 7: Topografie der extrapankreatischen Invasion der retropankreatisch gelegenen Nervenplexus. Siehe auch "Extrapankreatic perineural invasion in pancreatic adenocarcinoma" (Patel et al., 2018)	24
Abbildung 8: A conditional piggyBac transposition system for tissue-specific mutagenesis in mice (Rad et al., 2015).....	28
Abbildung 9: Intrapankreatisches Ganglion und umgebende Gefäße in der IHC-IF Triplefärbung (humanes PDAC).....	37
Abbildung 10: Pankreaskarzinomzellen in der IHC-IF-Triplefärbung (humanes PDAC)	37
Abbildung 11: Nerven im murinen PDAC, PGP9.5-Hämalaunfärbung.....	39
Abbildung 12: Ausgeprägte Nerv-Tumor-Interaktion mit peri- und endoneuraler Invasion im murinen PDAC, PGP9.5-Hämalaunfärbung.....	40
Abbildung 13: Durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße (A), Vaskularisierte und innervierte Fläche (B), Gefäß- und Nervendichte (jeweils Gefäß- bzw. Nervenanzahl pro mm ²) (C) und Subgruppenanalyse für das Ausmaß neuraler Invasion (D) im humanen PDAC	45
Abbildung 14: Neurale Invasion und Vaskularisation (E), neurale Invasion und Innervation (F), neurale Invasion und Gefäßdichte (G) und neurale Invasion und Nervendichte (H) im humanen PDAC.....	46
Abbildung 15: Hohe Innervation und hohe Vaskularisation im humanen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung	47
Abbildung 16: Niedrige Innervation und niedrige Vaskularisation im humanen PDAC in der Triplefärbung und der H.E.-Färbung	48
Abbildung 17: Durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße (A), Vaskularisierte und innervierte Fläche (B), Gefäß- und Nervendichte (C) und Subgruppenanalyse für das Ausmaß neuraler Invasion (D) im murinen PDAC	49
Abbildung 18: Neurale Invasion und Vaskularisation (E), neurale Invasion und Innervation (F), neurale Invasion und Gefäßdichte (G) und neurale Invasion und Nervendichte (H) im murinen PDAC	50
Abbildung 19: Innervationsranking (I) und Vaskularisationsranking (J) der murinen PDACs	51
Abbildung 20: Ranking für das Ausmaß der Tumorzell-Nerv-Interaktion im murinen PDAC: Cut-off 1: 2% neurale Invasion zeigt 15 Tiere. Cut-off 2: 5% neurale Invasion identifiziert 11 Tiere mit häufigster neuraler Invasion. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtnervenanzahl.	52
Abbildung 21: Nerven und Blutgefäße im murinen PDAC in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung.....	53
Abbildung 22: Durchschnittliche Gefäß- und Nervengröße (A), Vaskularisierte und innervierte Fläche (B), Gefäß- und Nervendichte (C) und Subgruppenanalyse für das Ausmaß neuraler Invasion (D) im humanen CRC.....	54

Abbildung 23: Neurale Invasion und Vaskularisation (E), neurale Invasion und Innervation (F), neurale Invasion und Gefäßdichte (G) und neurale Invasion und Nervendichte (H) im humanen CRC.....	55
Abbildung 24: Hohe Innervation und hohe Vaskularisation im humanen Colonkarzinom in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung. (Tumorzellen zeigen sich im Colonkarzinom nicht in der Nähe der großen Blutgefäße)	56
Abbildung 25: Niedrige Innervation und niedrige Vaskularisation im humanen Colonkarzinom in der IHC-IF-Triplefärbung und in der H.E.-Färbung. (Tumorzellen zeigen sich im Colonkarzinom nicht in der Nähe der großen Blutgefäße)	57
Abbildung 26: Expressionsmuster von angiogeneseassoziierten Genen im humanen PDAC: Hohe Vaskularisation versus niedrige Vaskularisation	58
Abbildung 27: Expressionsmuster von angiogeneseassoziierten Genen im humanen CRC: Hohe Vaskularisation versus niedrige Vaskularisation	59
Abbildung 28: Expressionsmuster von neurogeneseassoziierten Genen im humanen PDAC: Hohe Neurogenese versus niedrige Neurogenese.....	60
Abbildung 29: Expressionsmuster von neurogeneseassoziierten Genen im humanen CRC: Hohe Neurogenese versus niedrige Neurogenese.....	62
Abbildung 30: Expressionsmuster von angiogeneseassoziierten Genen im humanen CRC: Hohe neurale Invasion bei niedriger Vaskularisation versus niedrige neurale Invasion bei hoher Vaskularisation	63

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des postoperativen Resektionsstatus	10
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Pankreaskarzinom nach AJCC/UICC (Stand 2016)	11
Tabelle 3: Stadieneinteilung des PDAC nach AJCC/UICC	11
Tabelle 4: Differenzierungsgrad der Tumorzellen (Grading)	12
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien	31
Tabelle 6: Antikörper	32
Tabelle 7: Geräte und Software.....	32
Tabelle 8: Zubehör.....	32
Tabelle 9: Protokoll zur Immunhisto-Immunfluoreszenz-Triplefärbung mit CD31-S100-CK19-Antikörpern.....	35
Tabelle 10: Protokoll zur PGP9.5-Hämalaunfärbung.....	38
Tabelle 11: Genexpression bei gesteigerter Angiogenese im humanen PDAC	58
Tabelle 12: Genexpression bei gesteigerter Angiogenese im humanen Colonkarzinom.....	59
Tabelle 13: Genexpression bei gesteigerter Neurogenese im humanen PDAC	60
Tabelle 14: Genexpression bei gesteigerter Neurogenese im humanen Colonkarzinom	62
Tabelle 15: Genexpression bei häufiger neuraler Invasion und geringer Vaskularisation im humanen Colonkarzinom	63

10. Danksagung

Mein Dank gilt an allererster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Güralp Onur Ceyhan.

Lieber Güralp, Du hast mich im Sommer 2014 ins Labor geholt, und mir umgehend das vorliegende spannende Thema als Promotionsprojekt zugeteilt. Du meinstest damals es wäre perfekt für mich geeignet. Jetzt ist es vollbracht. Es war nicht immer einfach, aber Dank der hervorragenden Strukturen, die Du für die AG und das Labor geschaffen hast, konnte ich es – mit Unterstützung und Rückhalt des Teams – realisieren. Vielen Dank für Deine fordernde Art und Deine klare Kommunikation. Daran kann man als Mitarbeiter wachsen. Ich bin dankbar, dass du mir diese Dissertation ermöglicht hast, und dass ich für Dich arbeiten durfte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir.

Lieber Ekin, vielen Dank für die hervorragende Betreuung. Du warst immer innerhalb kürzester Zeit verfügbar, wenn ich an einer Stelle nicht weiterkam oder Fragen hatte. Dein Einsatz für Deine Doktoranden sucht seinesgleichen. Ohne Deine Tatkraft und Deine Leidenschaft für die Tumorforschung wäre mein Dissertationsprojekt nie so geworden, wie es nun vorliegt. Ich möchte mich ganz herzlich für Deinen hohen Arbeitseinsatz und Dein Engagement bedanken.

Einen großen Beitrag zur Verwirklichung der vorliegenden Arbeit habt das Laborteam, und hier insbesondere Ulrike und Steffen geleistet: Ulrike, ich danke Dir für die freundliche Aufnahme ins Labor, die Einarbeitung durch Dich und Deine strukturierte und verantwortungsbewusste Art, mit der Du stets für gute Arbeitsbedingungen im Labor gesorgt hast. Steffen, Dir danke ich für die fachliche und hochkompetente Beratung zu jederzeit, die lustigen Momente im Labor, und meinen Wissenszugewinn bezüglich Metal, Schweden, Biersorten und manch politischer Thematik. Ohne euch beide wäre meine Zeit im Labor nicht die gewesen, die sie war!

Ich möchte mich auch noch bei meiner Familie, meinen Eltern Dagmar und Werner sowie meinem Bruder Moritz bedanken. Ihr wart jederzeit für mich da, hattet ein offenes Ohr und habt mich in der langen Zeit des Studiums und der Dissertation immer unterstützt. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle erneut bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Freunden, die mich zu dieser Zeit unterstützt haben, mir in Gesprächen zu neuen Denkansätzen verholfen haben, und immer an den Erfolg meiner Arbeit geglaubt haben. Danke auch an Harry, Gabi, Verena und Max.