

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. vet.  
Manfred Stangassinger

Angefertigt an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums  
rechts der Isar der Technischen Universität München  
(PD Dr. med. Güralp O. Ceyhan)

**Zur Rolle von beta 1 Integrin und von Neural cell adhesion  
molecule (NCAM) in der heterotypen Schwanzzell-  
Tumorzell-Adhäsion im Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Eva Dorothea Brunner

aus Feuchtwangen

München 2013



Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 09. Februar 2013



**Meinen Eltern Gabi und Gerhard in Dankbarkeit und  
meinem Mann Reiner in Liebe gewidmet.**







## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>Pankreastumoren beim Kleintier .....</b>	<b>4</b>
1.1	Epidemiologie .....	4
1.2	Klinik.....	5
1.3	Diagnose.....	6
1.4	Therapie und Prognose.....	7
<b>2</b>	<b>Humanes Pankreaskarzinom .....</b>	<b>7</b>
2.1	Epidemiologie .....	8
2.2	Pathophysiologie .....	8
2.3	Klinik.....	9
2.4	Diagnose.....	10
2.5	Therapie und Prognose.....	11
<b>3</b>	<b>Nervenveränderungen im Zusammenhang mit Pankreaskarzinom ...</b>	<b>12</b>
3.1	Neurale Invasion .....	12
3.1.1	Definition .....	13
3.1.2	Klinische Relevanz der neuralen Invasion .....	14
3.1.3	Pathomechanismus der neuralen Invasion .....	16
3.2	Rolle der Schwannschen Zellen bei der neuralen Invasion.....	18
<b>4</b>	<b>Adhäsionsmoleküle auf Schwannschen Zellen .....</b>	<b>20</b>
4.1	Relevanz für die neurale Invasion.....	20
4.2	Beta 1 Integrin.....	21
4.3	NCAM.....	23
<b>5</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>25</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Zellbiologische Untersuchungen .....</b>	<b>27</b>
2.1	Zellkulturmaterialien .....	27
2.1.1	Geräte .....	27
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	28

---

2.1.4	Zelllinien .....	30
2.1.5	Antikörper .....	30
2.2	Zellkultur .....	30
2.2.1	Zellzahlbestimmung .....	31
2.2.2	Auftauen und Gefrierkonservierung von Zellen .....	31
2.2.3	Beschichtungen von Zellkulturoberflächen für Schwannsche Zellen .....	32
2.3	Migrationsassay .....	32
2.3.1	Antikörper-Behandlung der Zellen .....	32
2.3.2	Anordnung des Assays .....	33
2.3.3	Time-Lapse Mikroskopie .....	36
2.3.4	Auswertung .....	36
2.4	Adhäsionsassay .....	37
2.5	Software .....	42
<b>3</b>	<b>Histologische Untersuchungen .....</b>	<b>42</b>
3.1	Materialien .....	42
3.1.1	Geräte .....	42
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	42
3.1.3	Chemikalien .....	43
3.1.4	Antikörper .....	44
3.2	Methoden .....	44
3.2.1	Gewebeaufbereitung .....	44
3.2.2	Herstellung der Gewebeschnitte .....	44
3.2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) .....	45
3.2.4	Immunhistochemie .....	45
3.2.4.1	Beta 1 Integrin und NCAM .....	45
3.2.4.2	Auswertung .....	46
3.3	Software .....	49
<b>4</b>	<b>Proteinchemische Untersuchungen .....</b>	<b>49</b>
4.1	Materialien .....	49
4.1.1	Geräte .....	49
4.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	50
4.1.3	Chemikalien .....	51
4.1.4	Antikörper .....	54
4.2	Methoden .....	55

---

4.2.1	Probenextraktion: Zellen .....	55
4.2.2	Probenextraktion: Gewebe .....	55
4.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	55
4.2.4	Western Blot.....	56
4.2.5	Auswertung Western Blot .....	59
4.3	Software .....	60
<b>5</b>	<b>RNA-Untersuchungen.....</b>	<b>61</b>
5.1	Materialien .....	61
5.1.1	Geräte .....	61
5.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	61
5.1.3	Chemikalien und Kits.....	61
5.1.4	Primer .....	62
5.2	Methoden.....	63
5.2.1	RNA Extraktion.....	63
5.2.1.1	Aus Zellen .....	63
5.2.1.2	Aus Gewebe .....	64
5.2.2	Synthese von cDNA .....	65
5.2.3	PCR .....	67
5.2.4	Real Time PCR (qRT-PCR).....	69
5.3	Software .....	72
<b>6</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>72</b>
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>73</b>
<b>1</b>	<b>Expressionsanalyse: beta 1 Integrin und NCAM.....</b>	<b>73</b>
1.1	Immunhistochemie .....	73
1.2	Western Blot.....	76
1.2.1	In Schwanschen Zellen.....	76
1.2.2	Im Pankreaskarzinom- und normalen Pankreas Gewebe .....	80
1.2.3	In Karzinomzellen .....	83
1.3	qRT-PCR.....	86
1.3.1	In Schwanschen Zellen.....	86
1.3.2	Im Pankreaskarzinom- und normalen Pankreas Gewebe .....	88
1.3.3	In Karzinomzellen .....	90

<b>2</b>	<b>Korrelation der neuralen Expression der Schwanzzell- Adhäsionsmoleküle mit der neuralen Invasion im PCa.....</b>	<b>91</b>
2.1	Beta 1 Integrin .....	91
2.2	NCAM .....	94
<b>3</b>	<b>Rolle von beta 1 Integrin und NCAM bei der Zell-Zell-Adhäsion zwischen Schwannschen Zellen und Karzinomzellen.....</b>	<b>96</b>
3.1	Beta 1 Integrin: Schwannsche Zellen- SU86.86.....	96
3.2	Beta 1 Integrin: Schwannsche Zellen-Mia-PaCa-2 .....	99
3.3	NCAM: Schwannsche Zellen-SU86.86.....	102
3.4	NCAM: Schwannsche Zellen-Mia-PaCa-2 .....	104
<b>4</b>	<b>Spezifität der Schwanzzell Migration.....</b>	<b>106</b>
4.1	Vergleich der Migration zwischen Fibroblasten und Pankreaskarzinomzellen .....	107
4.2	Vergleich der Migration zwischen Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinomzellen .....	109
<b>5</b>	<b>Die Rolle von beta 1 Integrin in der tumorgerichteten Migration ....</b>	<b>112</b>
5.1	Beta 1 Integrin: Schwann-Zell geblockter Ansatz.....	112
5.2	Beta 1 Integrin: SU86.86 geblockter Ansatz .....	115
<b>V</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>119</b>
<b>1</b>	<b>Allgemeine Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für die neurale Invasion im Pankreaskarzinom.....</b>	<b>119</b>
<b>2</b>	<b>Vorkommen von beta 1 Integrin und NCAM auf Schwannschen Zellen und Karzinomzellen.....</b>	<b>121</b>
<b>3</b>	<b>Relevanz von beta 1 Integrin und NCAM in Bezug auf die Zelladhäsion .....</b>	<b>123</b>
3.1	In Bezug auf Schwannsche Zellen.....	123
3.2	In Bezug auf Karzinomzellen .....	125
<b>4</b>	<b>Relevanz von beta 1 Integrin und NCAM in Bezug auf die Zellmigration.....</b>	<b>127</b>
4.1	In Bezug auf Schwannsche Zellen.....	127
4.2	In Bezug auf Karzinomzellen .....	127
<b>5</b>	<b>In vivo Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse.....</b>	<b>129</b>

---

<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>131</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>133</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>135</b>
<b>IX</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>146</b>
<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>146</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>152</b>
<b>X</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>153</b>



## I EINLEITUNG

Das Adenokarzinom des Pankreas ist mit 85-90% die häufigste Form der Pankreastumoren und liegt auf Platz vier der durch Krebs bedingten Todesfälle in den USA. Durchschnittlich sind etwa 17 von 100.000 Menschen pro Jahr betroffen. Dies entspricht einem Anteil von 6% aller Krebserkrankungen. Die mediane Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Feststellung der Erkrankung ist die kürzeste überhaupt bei allen Tumoren (Li, Xie et al. 2004). Besonders gefährdet sind Raucher, Menschen mit familiärer Vorbelastung, Diabetiker und Personen, die an Übergewicht oder chronischem Alkoholismus leiden (American Cancer Society, 2012). Zum Zeitpunkt der Diagnose sind nur ca. 20% der Patienten für eine Operation geeignet (Besmer, Curry et al. 2011), die anderen befinden sich bereits in einem weit fortgeschrittenen Stadium, in dem der Tumor metastasiert ist und keine vollständige Resektion mehr erfolgen kann (Lenz, Karasek et al. 2011). Die chirurgische Therapie ist allerdings die einzige Möglichkeit, den Patienten zu helfen, da Bestrahlungs- oder Chemotherapie häufig nicht den gewünschten Effekt zeigen (Besmer, Curry et al. 2011). Zytostatikagaben, Immuntherapien oder strahlentherapeutische Interventionen führen bisher bestenfalls zu einer Verlangsamung des Pankreaskarzinomwachstums, sodass die Prognose trotz der Anwendung aller klinisch genutzten kurativen Behandlungsoptionen als infaust zu beurteilen ist. Ursächlich verantwortlich für die späte Diagnosestellung dieser Tumorart sind die unspezifischen Symptome, die damit einhergehen (DiMagno, Reber et al. 1999). Besonders häufig fallen bei den Betroffenen Gewichtsverlust, Ikterus, sowie abdominaler- und Rückenschmerz auf (Ceyhan, Michalski et al. 2008). Bei 60-80% aller PCa konnten metastasierende Karzinomzellen entdeckt werden (Issa, Nummer et al. 2009). Durch die hohe Metastasierungsrate bedingt, ist die Prognose bei dieser Krebserkrankung äußerst schlecht. Die 5-Jahres Überlebenszeit liegt bei unter 5% (Jemal, Siegel et al. 2006). Die Überlebenszeit der Patienten korreliert mit den Schmerzen, an denen die Betroffenen leiden. So besteht ein signifikanter Zusammenhang mit starken Schmerzen und kurzer Überlebenszeit (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

Die Schmerzen, die typisch für das Krankheitsbild sind, resultieren unter anderem aus der neuralen Invasion durch Pankreaskarzinomzellen. Bei nahezu 100% der PCa konnte eine Besiedelung der Nerven mit Karzinomzellen festgestellt werden

(Liu und Lu 2002). Die Karzinomzellen zerstören dabei zum Teil das Peri- bzw. Endoneurium und dringen in das Nerveninnere vor. Hier kommen sie in Kontakt mit hSC und Axonen (Bockman, Buchler et al. 1994). Es wird zwischen der perineuralen und der endoneuralen Invasion unterschieden, wobei die endoneurale Invasion eine eindeutig schlechtere Prognose aufweist und mit stärkeren Schmerzen verbunden ist (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die Invasion entlang des perineuralen Spalts wird auch als der Weg des geringsten Widerstandes für die Karzinomzellen bezeichnet (Demir, Ceyhan et al. 2010). Nach Besiedelung der intrapancreatischen Nerven breiten sich die Karzinomzellen entlang der neuralen Strukturen weiter aus. Es kommt zu einer Invasion der extrapancreatischen retroperitoneal gelegenen Plexus. Dieses Phänomen geht mit einer hohen Lokalrezidivrate und starken Schmerzen einher (Ceyhan, Demir et al. 2009). Neurale Invasion ist allerdings nicht das einzige Ereignis, was sich in den Nerven im Falle eines PCa abspielt. Es treten weitere neuropathische Veränderungen wie Erhöhung der neuralen Dichte, neurale Hypertrophie und pankreatische Neuritis auf (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Es existieren zahlreiche Theorien, um den Pathomechanismus der Invasion zu erklären. So wird in der Literatur die perineurale Invasion mit der lymphogenen und vaskulären Metastasierung in Verbindung gebracht (Liu und Lu 2002). Andere Autoren gehen von einem Neurotropismus der Karzinomzellen aus und machen verschiedene neurotrophe Faktoren wie NGF, Artemin oder Chemokine dafür verantwortlich (Kenmotsu 1990; Zhu, Friess et al. 1999; Marchesi, Piemonti et al. 2008). Neue, bisher unveröffentlichte Forschungsarbeiten geben jedoch auch Anlass zu der Annahme, dass ebenso ein Tropismus der Nervenzellen hin zu den Karzinomzellen besteht (Boldis et.al, UEGW 2010, unpubliziert). Ein ebenfalls noch nie da gewesener Ansatz im Bereich der neuralen Invasion beschreibt, dass Zell-Zell-Verbindungen zwischen Glia- und Karzinomzellen die Einwanderung von Karzinomzellen in Nerven bedingen (Swanson, McDermott et al. 2007). So konnte eine direkte Zell-Zell-Adhäsion zwischen einem gliagebundenen Protein (MAG) und einem Oberflächenmolekül auf Pankreaskarzinomzellen (MUC1) nachgewiesen werden. Diese interessante Herangehensweise an das Problem „neurale Invasion“ führte dazu, die Rolle der Adhäsionsmoleküle beta 1 Integrin und NCAM auf hSC im Zusammenhang mit neuraler Invasion näher zu untersuchen.

Beta 1 Integrin ist ein wichtiges heterodimeres Transmembranprotein und agiert als Rezeptor, der die Adhäsion, Migration, Invasion und Proliferation von Zellen reguliert (Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Die Migration von Pankreaskarzinomzellen hin zu Kollagen Typ I und IV, Laminin und Fibronectin wurde durch die Behandlung der Tumorzellen mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörpern signifikant reduziert (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009). Interessanterweise kommen die genannten extrazellulären Matrixproteine in besonders hoher Anzahl im Perineurium vor, sodass beta 1 Integrin bei der Migration von Karzinomzellen zu Nervenzellen eine wichtige Rolle spielen kann (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009). NCAM, ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, vermittelt als Rezeptor vor allem Neuron zu Neuron bzw. Neuron zu Glia Verbindungen (Seki und Arai 1993). Im Bereich der Tumorbiologie nimmt es unterschiedliche Positionen ein. So bedeutet eine NCAM Expression im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom eine schlechte Prognose, wohingegen das Vorkommen von NCAM im PCa mit einer positiven Vorhersage verbunden ist (Kenmotsu 1990; Kibbelaar, Moolenaar et al. 1991).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bedeutung der beiden Oberflächenmoleküle beta 1 Integrin und NCAM auf hSC für die neurale Invasion im PCa. Besonders interessant erscheint dabei die Rolle der zwei Moleküle in Bezug auf die Zell-Zell-Adhäsion und Migration zwischen Glia- und Karzinomzellen.

## **II LITERATURÜBERSICHT**

### **1 Pankreastumoren beim Kleintier**

Beim Vergleich Mensch, Hund und Katze, bezogen auf die allgemeine Tumorprävalenz, steht der Mensch an erster Stelle. Ihm folgt der Hund und bei der Katze kommen die wenigsten Neoplasien vor (Nolte 2000). Bei allen drei Spezies sind weibliche Individuen häufiger betroffen als männliche. Durch Kastrationen in der Tiermedizin kann man dieses Risiko bei bestimmten Tumorarten wie beispielsweise Mammakarzinomen drastisch reduzieren.

Bei den Pankreastumoren muss man zwischen den Tumoren des endokrinen und exokrinen Pankreas unterscheiden. Endokrine Pankreastumoren sind Insulinome oder Gastrinome, diese werden auch als Zollinger-Ellison Syndrom bezeichnet und werden durch  $\beta$ -Zell unabhängige Tumoren des Pankreas hervorgerufen (Fossum 2009). Insulinome sind beim Hund, im Gegensatz zum Menschen, meist maligne und metastasieren häufig in die regionalen Lymphknoten, das Omentum und die Leber. Dabei wird von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans Inseln vermehrt Insulin produziert, was zu einer anhaltenden Hypoglykämie führt (Fossum 2009). Gastrinome sind  $\beta$ -Zell unabhängig und gehen mit einer übermäßigen Produktion von Gastrin einher. Dies führt zu einer Übersäuerung des Magens, und es kommt zu Ulzerationen in der Magen- bzw. Duodenalschleimhaut (Nelson 2006). Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit soll jedoch auf die Tumore des exokrinen Pankreas und hierbei vor allem auf das Adenokarzinom des Pankreas gelegt werden. Daneben können im exokrinen Pankreas noduläre Hyperplasien oder Adenome auftreten, die allerdings beide keine klinische Relevanz haben (McGavin und Zachary 2009).

#### **1.1 Epidemiologie**

Insgesamt kommen Pankreasadenokarzinome bei Hund und Katze selten vor. Meist erkranken ältere Tiere ab einem Alter von ca. 10 Jahren. Häufiger betroffen sind Katzen, wobei jedoch keine Rassen- oder Geschlechtsdisposition besteht (Nolte 2000). Bei Hunden ist eine Rassendisposition für Airedale Terrier und Boxer beschrieben (Fossum 2009). Eine etwas ältere Studie von 1974, bei der Daten aus 11 amerikanischen und kanadischen Veterinäruniversitäten

zusammengefasst wurden, konnte zeigen, dass sich innerhalb von 10500 Primärtumoren 54 PCa befanden. Davon wurden 42 in Hunden, neun in Katzen, zwei in Pferden und eine in der Kuh entdeckt. Bei den Hunden war erneut der Airedale Terrier überrepräsentiert. Das Alter der Tiere hing stark von der Diagnose PCa ab; so erkrankten vor allem ältere Katzen und Hunde ab einem Alter von ca. 10 Jahren (Priester 1974). In einer retrospektiven, pathologischen Studie zu den Erkrankungen des exokrinen Pankreas wurden 9342 Bauchspeicheldrüsen von verstorbenen Hunden untersucht, davon waren 192 pathologisch verändert (1,73%) (Minkus, Reusch et al. 1991). Die Tiere verstarben an unterschiedlichen Primärerkrankungen. Mit 93 Fällen (1,03 % der 9342 untersuchten Tiere) war die Pankreatitis die am häufigsten festgestellte pathologische Veränderung. Der Befund eines PCa wurde immerhin bei 40 Tieren (0,43%) erhoben, während bei 20 Hunden (0,21%) eine Pankreasatrophie vorlag, welche wiederum auf eine exokrine Pankreasinsuffizienz hinweist. Im Konflikt zu diesen Daten stehen die klinischen Beobachtungen. Dort werden PCa nur selten und weit weniger häufig als die Pankreasatrophie diagnostiziert. Dies kann jedoch an den erst sehr spät auftretenden Symptomen des PCa liegen. Bei weiteren 0,06% der untersuchten Hunde wurden andere, nicht näher beschriebene pathologische Veränderungen des exokrinen Pankreas festgestellt. Im Rahmen derselben Studie wurden auch 6504 Katzenpankreatata untersucht. Die Pankreatitis war auch hier mit 0,6% die am häufigsten aufgetretene pathologische Veränderung, worauf das PCa mit 0,4% folgte (Minkus, Reusch et al. 1991).

## 1.2 Klinik

Die klinischen Symptome bei Hund und Katze ähneln sich weitestgehend, sind jedoch bei beiden Tierarten nicht spezifisch. Meist werden die Tiere mit Erbrechen, Anorexie und Gewichtsverlust vorgestellt (Kraft). In späteren Stadien stellt sich auch Kachexie und Durchfall ein. Bei der klinischen Untersuchung kann abdominaler Palpationsschmerz, Aszites oder Ikterus festgestellt werden. Der Ikterus entsteht durch Obstruktion des Ductus choledochus oder durch ausgeprägte Metastasierung in die Leber, die Aszites durch Kompression der Pfortader oder anderer großer Gefäße und der abdominale Palpationsschmerz durch die Umfangsvermehrung im Abdomen bzw. durch die weitreichende Metastasierung des Tumors (Fossum 2009). Nur sehr selten kann eine Umfangsvermehrung im kranialen Abdomen getastet werden, wenn dann nur in

sehr weit fortgeschrittenen Stadien. Die betroffenen Patienten weisen zudem Lethargie und Dehydratation auf.

### 1.3 Diagnose

Für die Diagnosestellung eignen sich Laborwerte und bildgebende Verfahren. Bei der Blutuntersuchung zeigen sich häufig Leukozytose, Anämie und Azotämie. Falls durch den Tumor bedingt eine extrahepatische Cholestase vorliegt, kommt es zu einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase und des Bilirubins (Kessler 2005). Bei einem Erguss in die Bauchhöhle kann versucht werden, ein Punktat zu gewinnen, in manchen Fällen können dabei neoplastisch veränderte Zellen nachgewiesen werden (Horzinek 2005). Röntgenologisch lassen sich meist eine abdominale Masse und eine Erweiterung der Gallengänge darstellen, bei vorliegendem Erguss kommt es jedoch zu einer verminderten Detailgenauigkeit der Organe. Auf der Suche nach Metastasen sollte die Lunge in zwei Ebenen geröntgt werden (Kessler 2005). Weiter ist es möglich eine Kontrastaufnahme des oberen Intestinaltraktes vorzunehmen, dabei zeigt sich häufig eine Abflussstörung im Bereich des Magens (Fossum 2009). Die Ultraschalluntersuchung ist bei der Diagnosestellung PCa eine weitere hilfreiche Methode. Hierbei lässt sich eine Umfangsvermehrung im Bereich des Pankreas darstellen, allerdings ist die Abgrenzung hin zur Pankreatitis sehr schwierig bis nicht möglich (Fossum 2009). Eine sonographisch schlecht umschriebene, hypoechogene Masse zwischen Magen und Duodenum ist jedoch sehr verdächtig im Hinblick auf Pankreasadenokarzinom (Kessler 2005). In diesem Zusammenhang lassen sich oft auch Metastasen beispielsweise in der Leber mittels Ultraschall darstellen. Eine endgültige Diagnose kann aber nur histologisch durch Biopsie- oder Resektionsmaterial des Tumors erbracht werden (Christoph 2007). Histopathologisch stellen sich die Pankreastumore des exokrinen Pankreas meist als tubuläre Adenokarzinome oder undifferenzierte solide Karzinome dar, wobei der fibröse Anteil sehr unterschiedlich sein kann (McGavin und Zachary 2009). Die wichtigste Differentialdiagnose zum PCa stellt die chronische Pankreatitis dar (Nelson 2006).

#### **1.4 Therapie und Prognose**

Die beste Therapieform beim PCa ist die chirurgische Entfernung des Tumors. Nicht zuletzt wegen der unspezifischen klinischen Symptomatik werden die Tiere meist jedoch in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung vorgestellt, weshalb eine Resektion nur selten durchgeführt werden kann (Fossum 2009). Ein großes Problem in diesem Zusammenhang stellt die schnelle und weitreichende Metastasierung des Tumors dar. Häufig zeigen sich Metastasen in der Leber, den abdominalen und thorakalen Lymphknoten, im Mesenterium, im Dünndarm oder der Lunge (Ettinger 2010). Falls allerdings keine Metastasen sonographisch oder röntgenologisch vor der Operation festgestellt wurden, ist die Resektion des Tumors die einzige therapeutische Möglichkeit. Dazu wird eine partielle Pankreatektomie vorgenommen und vor dem Verschluss der Bauchhöhle die Durchgängigkeit des Ductus choledochus überprüft (Fossum 2009). In manchen Fällen wird auch eine totale Pankreatektomie mit teilweiser Duodenektomie durchgeführt, hierbei muss jedoch der Besitzer im Vorhinein ausführlich aufgeklärt werden. Denn die dadurch resultierende exokrine und endokrine Pankreasinsuffizienz muss durch entsprechende Substitutionstherapie dauerhaft behandelt werden (Kessler 2005). Ist die Metastasierung allerdings schon weit fortgeschritten, sollte das Tier während der Operation euthanasiert werden. Chemotherapie und Bestrahlungstherapie haben beim Kleintier bisher keine Relevanz und werden nicht routinemäßig bei der Therapie des PCa eingesetzt, nicht zuletzt auch aufgrund der äußerst schlechten Prognose (Horzinek 2005). Die Prognose für Tiere mit PCa ist äußerst ungünstig, da sich die meisten Patienten bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden und oft während der Operation euthanasiert werden müssen. Die Überlebenszeit der anderen Patienten liegt im Schnitt unter drei Monaten (Fossum 2009).

## **2 Humanes Pankreaskarzinom**

Beim PCa des Menschen handelt es sich um eine bösartige und höchstgradig aggressive Neoplasie der Bauchspeicheldrüse. Bei 90% der Pankreastumoren wird die Diagnose Adenokarzinom des Pankreas gestellt (Lenz, Karasek et al. 2011). Dieses metastasiert äußerst schnell und wird erst spät diagnostiziert. Der Sitz des Primärtumors ist zu 70% der Pankreaskopf, danach folgen Corpus (20%) und

Cauda (10%) (Kelly und Benjamin 1995).

## 2.1 Epidemiologie

Das PCa ist die viert häufigste, durch Krebs bedingte Todesursache in den USA und ist weltweit für 227000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich (Vincent, Herman et al. 2011). Der internationale Vergleich zeigt, dass insgesamt mehr Männer als Frauen erkranken. 2008 lag die Inzidenz an PCa zu erkranken bei Männern bei 8,2%, bei Frauen bei 5,4% (Jemal, Bray et al. 2011). Auf der Liste der Krebsneuerkrankungen in den USA lag das PCa auf Platz 10, bei den geschätzten Todesfällen bedingt durch Krebs ist es auf Platz vier. Ein besonders hohes Risiko besteht für Raucher, für Menschen mit familiärer Vorbelastung und für Personen mit Pankreatitis, Diabetes mellitus oder Übergewicht (American Cancer Society, 2012). Rund 20% der PCa werden durch Rauchen verursacht. Außerdem weisen 7-10% der Patienten eine Familienhistorie auf. So steigt das Risiko an einem PCa zu erkranken um das Neunfache, falls ein Verwandter ersten Grades an dieser Tumorart leidet (Vincent, Herman et al. 2011). Diabetes mellitus spielt im Zusammenhang mit PCa ebenfalls eine große Rolle, weil 60-81% der PCa Patienten an Diabetes mellitus leiden (DiMagno, Reber et al. 1999). Die Inzidenz des PCa zeigt geographisch große Unterschiede. So liegt die Erkrankungsrate von Afroamerikanern 50% über der Erkrankungsrate von Kaukasiern. Mit steigender mittlerer Lebenserwartung hat die Häufigkeit dieser Tumorerkrankung stark zugenommen und der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60. und dem 80. Lebensjahr, mit einem medianen Erkrankungsalter von 72 Jahren (Lowenfels und Maisonneuve 2005).

## 2.2 Pathophysiologie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas entstammt höchstwahrscheinlich den Zellen des Gangepithels oder den Azinuszellen. Es entwickelt sich häufig aus nicht invasiven Vorstufen, wobei zwischen drei unterschieden wird: Die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), die intraduktalen papillären muzinösen Neoplasien (IPMN) und die muzinösen zystischen Neoplasien (MCN) (Mazur und Siveke 2011). PanINs kommen mit 90 % am häufigsten vor. Sie stellen Läsionen in den Epithelien der Ausführungsgänge des Pankreas dar und sind sehr klein (<5mm). Man kann anhand der Zellmorphologie drei Stadien von PanINs beschreiben. PanIN 1 kommt häufig im fortgeschrittenen Alter vor; PanIN

3 hingegen trifft man bei Patienten mit invasiven PCa an (Vincent, Herman et al. 2011). Die Zellproliferationsrate steigt mit zunehmendem PanIN-Stadium. IPMN und MCN sind zystische Läsionen, deren Bedeutung für die Karzinogenese noch weiter untersucht werden müssen. Allerdings geht man davon aus, dass IPMNs Anlass zu einem intraduktalen papillär-muzinösen Karzinom (IPMC) geben können. Alle drei Vorstufen können in einem PCa enden (Mazur und Siveke 2011). Weiter gilt die chronische Pankreatitis als eine gesicherte Präkanzerose für die spätere Entwicklung eines PCa (Schoppmeyer und Mossner 2003).

Die häufigste genetische Veränderung bei Menschen mit PCa, ist die Mutation des Onkogens KRAS. Dieses wird durch den Tyrosin-Kinase-Rezeptor aktiviert und regt im weiteren Verlauf Signalwege an, die Gene für das Zellwachstum und die Initiation des Zellzyklus zu mobilisieren. Durch die Mutation bleiben diese Gene aktiviert und es kommt zu einer gesteigerten Zellproliferation (Li, Xie et al. 2004). Die Mutation des KRAS-Onkogens betrifft fast alle Patienten mit PCa, deshalb kann man hierbei von einem Wegbereiter des karzinogenen Prozesses sprechen. Zusätzlich werden während der PanIN Veränderung weitere Tumor Supressor Gene, wie beispielsweise INK4a/ARF, TP53 oder SMAD4 inaktiviert (Mazur und Siveke 2011).

### **2.3 Klinik**

Ein frühes Pankreaskarzinomstadium ist klinisch kaum zu erkennen. Meist stellen sich die Patienten erst in fortgeschrittenen Stadien vor, dann wenn der Primärtumor bereits metastasiert ist (Lenz, Karasek et al. 2011). Es gibt keine typischen Symptome, die die Krankheit sofort erkennen lassen. Die zwei Hauptsymptome sind Gewichtsverlust bei 92% der Patienten und Ikterus bei 82%. Abdominaler – und Rückenschmerz sind mit 72% ebenfalls häufige Beschwerden im fortgeschrittenen Stadium (Ceyhan, Michalski et al. 2008). Die Kombination aus Schmerz und Ikterus tritt bei 50% der Patienten mit nicht resezierbaren Tumoren auf (DiMagno, Reber et al. 1999). Das klinische Bild ist sehr stark von der Lokalisation des Tumors abhängig. Ikterus zeigt sich besonders häufig bei papillennahen Tumoren; dahingegen zeigen sich bei Tumoren des Corpus oder der Cauda eher unspezifische Symptome (Büchler, Uhl et al. 2004). Gewichtsverlust kann aus Anorexie, Maldigestion oder Kachexie resultieren (Vincent, Herman et al. 2011). Ikterus kommt durch die Obstruktion des Gallengangs bedingt durch die Tumormasse zustande. Durch die Verlegung des Ductus pancreaticus kann es zu

einer akuten Pankreatitis kommen, verbunden mit starken Schmerzen. In einer sehr weit fortgeschrittenen Phase der Erkrankung leiden die Patienten an Magenentleerungsstörungen und damit verbundenem Erbrechen (Vincent, Herman et al. 2011). Das Adenokarzinom des Pankreas metastasiert sehr schnell, betroffen davon sind zuerst die umliegenden Lymphknoten, anschließend die Leber und schließlich das Peritoneum (Vincent, Herman et al. 2011). Starke Schmerzen und sehr zeitnah auftretende postoperative Lokalrezidive sind durch die Invasion der Karzinomzellen in die intrapankreatischen Nerven begründet. Die perineurale Invasion breitet sich bis in den extrapankreatischen Nervenplexus aus. Dadurch ist eine R0 Resektion (= mikroskopisch ist kein Resttumor erkennbar) bei den wenigstens Patienten überhaupt möglich (Ceyhan, Giese et al. 2006).

#### **2.4 Diagnose**

Die Diagnose PCa lässt sich am besten anhand von Bildern einer Dünnschicht-Computertomografie (CT) mit Kontrastmitteln stellen. Außerdem gibt sie mit bis zu 80% Sicherheit darüber Auskunft, ob der Tumor resektabel ist oder nicht und erspart dem Patienten dadurch unnötige Laparotomien. Weitere Informationen wie Größe des Tumors, Staging des Karzinoms, Befall von Gefäßen oder Metastasierung vor allem in Leber und Lunge können durch diese Methode gesammelt werden (Vincent, Herman et al. 2011). Bei Verdacht auf Gefäßinfiltration kann fakultativ eine Angiographie des Truncus coeliacus vorgenommen werden. Die weiterentwickelte Kernspintomographie (MRT) verbunden mit Kontrastmittelgabe bietet ebenfalls gute diagnostische Möglichkeiten. Dadurch können Gefäß- und Gangverhältnisse gut dargestellt und der Patient mit Hilfe eines „all-in-one“ MRT abgeklärt werden (Büchler, Uhl et al. 2004). Besonders erfolgreich bei der Diagnostik ist der endoskopische Ultraschall. Hier liegen die Sensivität bei 99% und die Spezifität bei 100%. Weiter lässt sich dabei auch gleich eine Feinnadelaspiration des Tumors entnehmen, womit weiterführende Diagnostik durchgeführt werden kann (DiMagno, Reber et al. 1999). Laborparameter, die bei Betroffenen verändert sein können, sind, bei Verlegung des Ductus choledochus, Bilirubin und alkalische Phosphatase. Die Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) zeigen durch eine obstruktionsbedingte Leberzellzytolyse zum Teil ebenfalls einen Anstieg.

## 2.5 Therapie und Prognose

Bei Diagnosestellung haben nur 10-20% der Patienten chirurgisch resezierbare Tumoren, die anderen Betroffenen können allein einer palliativen Therapie unterzogen werden (Lenz, Karasek et al. 2011). Die einzige Chance auf eine kurative Therapie bzw. Verlängerung der Palliation bei dieser Erkrankung ist die radikale Resektion des Tumors. Allerdings profitieren Patienten mit Fernmetastasen von operativen Eingriffen nicht (Li, Xie et al. 2004). Die etablierte Operationsmethode beim Pankreaskopfkarzinom ist die Pylorus-erhaltende Whipple-Operation: Dabei wird unter Erhaltung des Magens, der Pankreaskopf, das Duodenum, der proximale Teil des Jejunums, ein Teil des Hauptgallengangs und die Gallenblase entfernt. Die Mortalitätsrate bei dieser OP beträgt  $\leq 2\%$ , vorausgesetzt die Operation wird in einem Klinikzentrum von einem erfahrenen Chirurgen durchgeführt (DiMagno, Reber et al. 1999). Eine Lymphknotendissektion wird dabei ebenfalls vorgenommen, da Lokalrezidive häufig auf Lymphknotenmetastasen zurückzuführen sind (Büchler, Uhl et al.). Bei Tumoren im Corpus- oder Caudabereich stellt die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie das übliche operative Vorgehen dar. Bei nicht resezierbaren Tumoren werden palliative Operationen zur Freilegung des Gallengangs oder Wiederherstellung der Magen-Darm-Passage vorgenommen.

In der Chemotherapie (adjuvant oder neoadjuvant) ist das Zytostatikum Gemcitabine das Mittel der Wahl (Vincent, Herman et al. 2011). Der Wirkungsmechanismus beruht darauf, dass anstatt des Nukleosids Cytidin die aktive Form des Gemcitabins in die DNA eingebaut wird. Dadurch wird die DNA Synthese unterbrochen, was letztendlich zur Apoptose der Karzinomzellen führt (DiMagno, Reber et al. 1999). Eine Radiochemotherapie unter Verwendung von Fluorouracil kann ebenfalls durchgeführt werden. Die Wirkungsweise ähnelt dem Zytostatikum Gemcitabine. Hier wird bei einer Zellteilung anstatt der Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin bzw. Uracil ein Syntheseprodukt des Medikaments eingebaut. Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften RNA Synthese und letztendlich zu einer Inhibierung der Zellteilung (Vincent, Herman et al. 2011). Eine Therapie mit dem Präparat Fluorouracil kommt häufig bei lokal begrenzten Tumoren zum Einsatz, bei metastasierenden Verläufen setzt man vor allem Gemcitabine ein (Li, Xie et al. 2004). Neben diesen Standardverfahren (Operation, Chemotherapie mit Zytostatika) werden in klinischen Studien neue,

ergänzende Therapieansätze wie z.B. die Immuntherapie mit Interferon alpha-2b erprobt, mit deren Hilfe die Effizienz der bisherigen Behandlungsstrategien verbessert werden soll (Knaebel, Marten et al. 2005).

Die Prognose für Patienten mit Pankreasadenokarzinom ist trotz aller Bemühungen äußerst schlecht. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 6 Monate (Issa, Nummer et al. 2009). Patienten mit lokal begrenzten Tumoren überleben jedoch deutlich länger (mittlere Überlebenszeit 9-15 Monate) als Patienten, die Metastasen aufweisen (mittlere Überlebenszeit 3-6 Monate). Die mediane Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die kürzeste überhaupt bei allen Tumorerkrankungen. Ohne Behandlung liegt sie beim fortgeschrittenen PCa bei 3,5 Monaten, bei adäquater Behandlung kann sie auf sechs Monate ansteigen (Vincent, Herman et al. 2011). Die 5-Jahres Überlebenszeit liegt trotz der Radikalität der Operation sogar unter 5% (Lenz, Karasek et al. 2011). Andere Studien unterscheiden bei der 5-Jahres Überlebenszeit zwischen lokal begrenzten und metastasierenden Tumoren. Patienten in einem frühen Stadium mit lokal begrenztem Tumor haben danach eine 5-Jahres Überlebensrate von 22%, Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium mit Metastasen weisen nur eine Rate von 2% auf (American Cancer Society, 2012). Aufgrund der schlechten Prognose sollten Menschen mit familiärer Vorgeschichte zu Vorsorgeuntersuchungen gehen und sich auf Vorstufen eines PCa untersuchen lassen. Dies geschieht mittels endoskopischem Ultraschall (DiMagno, Reber et al. 1999). Hierbei können präinvasive Läsionen erkannt und entfernt werden (Vincent, Herman et al. 2011).

### **3      Nervenveränderungen      im      Zusammenhang      mit Pankreaskarzinom**

#### **3.1      Neurale Invasion**

Die neurale Invasion ist neben der Metastasierung in Lymphknoten und Blutgefäße ein weiterer Weg der Karzinomzellen, den sie sich außerhalb des Primärtumors bahnen. Dieser Metastasierungsweg spielt eine wichtige Rolle beim PCa, kommt jedoch auch bei anderen Tumorarten, wie Gallengangs-, Prostata-, Magen-, Ösophagus- und Rektumkarzinom vor (Liu und Lu 2002). Das besondere Interesse an der neuralen Invasion beim PCa resultiert aus der äußerst schlechten Prognose dieser Tumorart, der hohen Prävalenz des Auftretens von neuraler

Invasion (bis zu 100%) und der häufigen Lokalrezidive bedingt durch die Nerveninvasion (Demir, Ceyhan et al. 2010).

### 3.1.1 Definition

Neurale Invasion wird definiert als das Vorkommen von Karzinomzellen im oder innerhalb von Nerven. Periphere Nerven werden üblicherweise von drei Schichten umgeben, dem Endoneurium, dem Perineurium und dem Epineurium (Liu und Lu 2002). Die Invasion der Karzinomzellen erfolgt entlang der intrapankreatischen Nerven in Richtung der retroperitonealen und somit extrapankreatisch gelegenen Nervenplexus. Das lässt sich dadurch begründen, dass das retroperitoneal gelegene Pankreas von vielen neuralen Plexus umgeben ist, wie dem Plexus coeliacus, dem dorsalen Plexus hepaticus und dem Arteria mesenterica superior Plexus (Kayahara, Nagakawa et al. 1995). Japanische Forscher stellten sich die Frage, inwieweit die Lokalisation des Tumors davon abhängt, in welche Nervenplexus die Karzinomzellen wandern. Dabei fanden sie heraus, dass Pankreaskopftumore vor allem in den Plexus coeliacus und den hinteren Teil des Plexus hepaticus invadieren, Tumore des Corpus bzw. der Cauda in den Plexus lienalis oder Plexus coeliacus metastasieren (Kayahara, Nagakawa et al. 1995). Die erste umfassende Studie zum Thema neurale Invasion beim PCa wurde von Dale Bockman 1994 erstellt. Dabei untersuchte er befallene Nerven mittels Elektronenmikroskopie und fand heraus, dass die Karzinomzellen nicht auf das Perineurium beschränkt sind, sondern durchaus auch Kontakt zum Endoneurium und somit auch zu dessen Strukturen, wie Axone oder hSC, aufnehmen. Der Begriff der neuralen Zerstörung („Neural damage“) im PCa wurde auch von Bockman geprägt. Er beobachtete eine Zerstörung des Perineuriums und des Nerveninneren, und desweiteren hatten die Axone ein ödematöses Aussehen (Bockman, Buchler et al. 1994). 2009 folgte eine ausführliche Studie von Ceyhan et al. zu den Nervenveränderungen bei Pankreaserkrankungen. Seither existiert ein Score, der die neurale Invasion beim PCa näher beschreibt. Dabei wird zwischen drei Gruppen unterschieden. NI=0 bedeutet, dass der Nerv nicht von neuraler Invasion betroffen ist, NI=1 heißt, dass sich Karzinomzellen am Perineurium befinden, jedoch noch nicht durch dieses hindurch gedrungen sind (perineurale Invasion) und bei NI=2 können Karzinomzellen im Nerveninneren festgestellt werden (endoneurale Invasion). Dadurch hat Ceyhan et al. erstmals die Unterscheidung zwischen perineuraler- und endoneuraler Invasion getroffen, was

besonders für die Patienten eine Rolle spielt. Betroffene, die eine endoneurale Invasion aufweisen, haben wesentlich stärkere und häufig wiederkehrende Schmerzen als Patienten mit einer perineuralen Invasion. Zudem wird bei dieser Studie klar, dass die neuralen Veränderungen des PCa nicht nur auf die neurale Invasion reduziert werden dürfen. Es treten daneben noch weitere neuroplastische Umbildungen auf, wie neurale Hypertrophie, erhöhte neuronale Dichte und eine neurale entzündliche Zellinfiltration (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

### **3.1.2 Klinische Relevanz der neuralen Invasion**

Die neurale Invasion hat eine große klinische Relevanz und steht in einem engen Zusammenhang mit Schmerzen und Überlebenszeit der Patienten. Die Inzidenz für neurale Invasion schwankt in der Literatur zwischen 45 und 100% (Liu und Lu 2002). In der Arbeit von Pour et al. wurden Pankreastumore primär induziert, dabei war die perineurale Invasion mit 88% der häufigste Metastasierungsweg, gefolgt vom lymphogenen (33%) und vaskulären (2%) Weg (Pour, Egami et al. 1991). In aktuelleren Studien lag die Inzidenz für neurale Invasion bei 79%, dabei fällt interessanterweise auf, dass der Grad der Invasion im PCa, verglichen zu anderen Tumoren der Bauchspeicheldrüse, wesentlich höher liegt. Hier kommt es durch die erhöhte Aggressivität der Karzinomzellen zu einer vermehrt endoneuralen Invasion. Weiter ist zu beobachten, dass Patienten, die einen hohen Schmerzscore haben, auch einen erhöhten Grad an neuraler Invasion aufweisen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Den Zusammenhang zwischen neuraler Invasion und Schmerz konnten Zhu et al. erstmals darlegen. Ihre Studie konnte zeigen, dass Patienten mit einer hohen NGF (Nerv growth factor) und NGF-Rezeptor (TrkA) Expression ein stärkeres Schmerzempfinden und vermehrt auftretende neurale Invasion aufwiesen. Bei Bindung dieser beiden Moleküle kommt es zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors und zum Auslösen der intrazellulären Signalkette (Zhu, Friess et al. 1999). Neurale Invasion besteht nicht allein aus der Besiedelung der Nerven mit Karzinomzellen, sondern es kommt daneben noch zu weiteren neuroplastischen Veränderungen, wie neurale Hypertrophie, erhöhte neuronale Dichte und entzündliche Infiltration der Nerven. Diese Parameter und die neurale Invasion weisen interessanterweise keine Korrelation mit dem Überleben der Patienten auf, jedoch hat der Schmerz einen signifikanten Einfluss auf das Überleben von Betroffenen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten ohne Schmerz eine mittlere Überlebensrate von 21,8 Monaten aufwiesen,

mittelgradige Schmerzen eine Überlebenszeit von 15,0 Monaten bedeuten und Patienten mit mäßigem bis schweren Schmerz nur 10,0 Monate überleben (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Infolgedessen geht man davon aus, dass die Schwere des Schmerzes mit dem Grad der neuralen Invasion ansteigt. Damit wäre der Schmerz ein zuverlässiger prognostischer Faktor. Dies konnte Okusaka in einer Studie ebenfalls bestätigen: Dort waren Patienten mit keinen oder nur milden Schmerzen diejenigen mit resektablen Tumoren, verbunden mit einer besseren Prognose (Okusaka, Okada et al. 2001). Im Zusammenhang mit Schmerz konnte auch bewiesen werden, dass es zu einem Umbau innerhalb der Nerven kommt. Der Anteil von sympathischen und cholinergen Nervenfasern geht zurück, ein Vorgang, der neuronaler Umbau („neural remodeling“) genannt wird (Ceyhan, Demir et al. 2009). Dabei haben Nerven mit neuraler Invasion einen noch geringeren Anteil an sympathischen und cholinergen Fasern. Hier stellt sich die Frage, ob Karzinomzellen genau solche Nerven bevorzugen oder ob der geringe sympathische und cholinerge Anteil aus der Invasion resultiert (Ceyhan, Demir et al. 2009). In einer folgende Studie wurde dargelegt, dass allein die Mikroumwelt eines PCa neurale Plastizität auslösen kann. Dafür wurden myenterische Plexus-Neurone und Spinalganglien mit dem Zellüberstand von Pankreaskarzinomzellen behandelt. Diese zeigten dadurch eine erhöhte neuronale Dichte, eine Zellhypertrophie und ein vermehrtes Neuriten Wachstum (Demir, Ceyhan et al. 2010). Durch diese Erkenntnisse kommt man zu dem Schluss, dass die neuroplastischen Veränderungen und der Schmerz beim PCa in enger Verbindung zueinander stehen. Man spricht hierbei von einem neuropathischen Schmerzmechanismus (Demir, Ceyhan et al. 2010).

Die zweite wichtige klinische Relevanz der neuralen Invasion besteht in der hohen lokalen Rezidivrate des Tumors bedingt durch die extrapankreatische Invasion in die umliegenden Nervenplexus. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei 72% der Patienten eine Invasion in die extrapankreatischen Plexus erfolgt war (Nagakawa, Kayahara et al. 1992). Infolgedessen empfehlen einige Autoren, bei einem Pankreaskopfkarcinom eine Resektion des Arteria mesenterica superior Plexus und des Plexus coeliacus vorzunehmen (Kayahara, Nagakawa et al. 1995). Andere wiederum fanden heraus, dass eine radikale Chirurgie im Bereich des Plexus zwar zu einer verminderten Rate an Lokalrezidiven führt, die Überlebenszeit dadurch jedoch nicht verlängert wird.

Deshalb sollten Ergebnisse größerer Studien abgewartet werden (Nakao, Kaneko et al. 2001; Demir, Ceyhan et al. 2010). Es ist weiter bekannt, dass Patienten mit Plexusinvasion ein hohes Vorkommen an Invasion der Venen haben und sich am Rande des Resektats weitere Karzinomzellen befinden, eine R0 Resektion also nicht stattgefunden hat (Nagakawa, Nagamori et al. 1996; Liu und Lu 2002). Extrapankreatische Plexusinvasion ist ein histopathologisches Charakteristikum beim PCa, das zu abdominalen Schmerzen, retropankreatischer Tumorextension und einer hohen Rate an Lokalrezidiven führt (Okusaka, Okada et al. 2001; Ceyhan, Giese et al. 2006). Daher stellt die Invasion in die extrapankreatischen Plexus ein großes Problem dar, und die Betroffenen haben eine schlechtere Prognose.

### **3.1.3 Pathomechanismus der neuralen Invasion**

Der genaue Pathomechanismus der neuralen Invasion wird bis heute nicht vollständig verstanden (Ceyhan, Demir et al. 2008). Kayahara et al. beschreibt zwei wahrscheinliche Mechanismen, wie die Invasion der Nerven mit Karzinomzellen vonstattengehen kann. Die erste Theorie besagt, dass die Tumorzellen nach direkter Zerstörung des Perineuriums in den perineuralen Spalt invadieren. Der zweite Erklärungsansatz geht von einer Invasion durch die perforierenden Gefäße des Perineuriums aus (Kayahara, Nakagawara et al. 2007). Es wurde untersucht, wie die Karzinomzellen in einer kontinuierlichen Art und Weise in das Perineurium vordringen, sich zusammen mit Nerven verzweigen und dazu neigen, umliegende Lymphknoten zu befallen (Ceyhan, Demir et al. 2008). Diese Studie beweist, dass neurale Invasion das kontinuierliche Wachstum von Karzinomzellen entlang von Nerven in Richtung extrapankreatische Plexus beinhaltet (Kayahara, Nakagawara et al. 2007). Dieser Weg der Ausbreitung ist jedoch nicht der Einzige. Denn es konnte in anderen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass interessanterweise 50% der untersuchten PCa Gewebe neurale Invasion in unveränderten Arealen des Pankreas und weit entfernt vom Haupttumor aufwiesen. Dieses Phänomen wird als „nex“ bezeichnet und als intrapankreatische extratumorale perineurale Invasion definiert. Das Vorkommen von „nex“ korreliert mit dem Auftreten von extrapankreatischer Plexusinvasion und ist somit mit einer schlechten Prognose verbunden (Takahashi, Ishikura et al. 1992; Takahashi, Ishikura et al. 1997; Demir, Ceyhan et al. 2010). Es werden verschiedene Ansatzpunkte herangezogen, um den Mechanismus der neuralen

Invasion zu erklären. Manche Autoren sehen einen Zusammenhang zwischen vaskulärer, lymphogener und neuraler Invasion. So konnte beim Gallengangskarzinom gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen lymphogener, perineuraler und vaskulärer Invasion besteht (Seki, Tanaka et al. 1993; Liu und Lu 2002). Diese Beziehung wurde auch beim PCa bezüglich der Plexusinvasion nachgewiesen. Denn das Auftreten von neuraler Invasion im retroperitonealen Plexus steht im Zusammenhang mit dem Auftreten von Metastasen nahegelegener Lymphknoten (Takahashi, Ishikura et al. 1997). Eine weitere Theorie ist die Ausbreitung der Karzinomzellen über den perineuralen Spalt. Dieser Spalt ist eine eigene anatomische Struktur und enthält keine Lymphgefäße (Hassan und Maksem 1980). Der perineurale Spalt stellt zuerst eine Barriere für die Karzinomzellen dar. Sie invadieren den Nerv an der primären Läsion und breiten sich von dort entlang der neuralen Strukturen aus. Dieser Spalt wird auch als der Weg des kleinsten Widerstands für die Karzinomzellen beschrieben (Ceyhan, Schafer et al. 2010). Diese können dort jedoch nur sehr selten proliferieren, weshalb der Spalt auch als eine Art Speicherplatz für Karzinomzellen angesehen wird (Nagakawa, Kayahara et al. 1992). Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der bei der Nerveninvasion eine Rolle spielt, ist der Neurotropismus. Dabei geht man davon aus, dass einige spezifische Faktoren die gegenseitige Interaktion zwischen Karzinomzellen und Nerven verbessern (Liu und Lu 2002). Die Idee vom Neurotropismus ging von Kenmotsu et al. aus. Er vertritt die Theorie, dass in einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinomstadium mit neuraler Invasion eine Vielzahl von neuroendokrinen Markern exprimiert werden, wie beispielsweise S-100, Synaptophysin, Substanz-P, Enkephalin und NCAM (Kenmotsu 1990). Ein weiterer wichtiger Vertreter im Zusammenhang mit Neurotropismus ist der Epidermale growth factor Rezeptor (EGF-Rezeptor), ein Transmembranrezeptor, der in allen menschlichen Zellarten vorkommt. Dieser wird im PCa hochreguliert. Ein Bindungspartner dieses Rezeptors, das Zytokin Transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), kommt im PCa ebenfalls in größeren Mengen als im NP vor. Interessanterweise wurde TGF- $\alpha$  vor allem in befallenen Nerven detektiert. Wenn diese beiden Bindungspartner miteinander agieren, kommt es zu einer gegenseitigen Chemoattraktion mit verbesserter zellulärer Proliferation und die Metastasierungsrate steigt. Damit konnte eine Wachstumsstimulation des Tumors ausgehend von den Nerven nachgewiesen werden (Bockman, Buchler et al. 1994). Neurotrophe Faktoren, die in diesem

Zusammenhang untersucht worden sind, sind der neurotrophe Faktor nerve growth factor (NGF) und die Mitglieder der GDNF Familie (Gliazell abgeleitete neurotrophe Faktoren). NGF wird in Karzinomzellen hochreguliert und steht ebenso in engem Zusammenhang mit Schmerz und neuraler Invasion (Zhu, Friess et al. 1999; Ceyhan, Demir et al. 2008). Auch bei Artemin konnte eine vermehrte Expression im PCa, vor allem an hypertrophierten Nerven, dokumentiert werden. Eine Verbindung zu Schmerz wurde allerdings nicht hergestellt (Ceyhan, Giese et al. 2006). Weiter wurden auf der Suche nach Auslösern von Neurotropismus Chemokine untersucht. Marchesi et al. konnten zeigen, dass der Rezeptor für das Chemokin Fraktalkin (CX3CR1) in perineuralen Invasionsläsionen hochreguliert ist. Eine hohe Expression von CX3CR1 und perineurale Invasion sind mit einem frühen, lokalen Tumorrezidiv assoziiert (Marchesi, Piemonti et al. 2008). Eine erhöhte Fraktalkin Expression konnte auch bei Patienten mit chronischer Pankreatitis gezeigt werden, diese litten unter starken Schmerzen und Neuritis (Ceyhan, Deucker et al. 2009). So kommt man zu dem Schluss, dass der Neurotropismus, der eine Anziehung auf die Karzinomzellen ausübt, durchaus eine wichtige Rolle bei der neuralen Invasion spielt. Allerdings geben neuere Forschungen auch Anlass zu dem Glauben, dass ein gegenseitiger Tropismus zwischen Karzinomzellen und Neuronen besteht (Demir, Ceyhan et al. 2010).

### **3.2 Rolle der Schwannschen Zellen bei der neuralen Invasion**

Die hauptsächliche Veränderung, die im Falle eines PCa auftritt, ist, neben steigender neuraler Dichte, Hypertrophie und pankreatischer Neuritis, die intra- und extrapancreatische perineurale Invasion (Ceyhan, Demir et al. 2009). Dabei beschränken sich die Karzinomzellen nicht immer nur auf die Peripherie der Nerven, sondern penetrieren auch das Perineurium und kommen in engen Kontakt mit hSC und Axonen des Endoneuriums (Bockman, Buchler et al. 1994). hSC stellen die Gliazellen des peripheren Nervensystems dar. In einer Untersuchung wurde bewiesen, dass sich hSC im Fall einer Nervenverletzung entdifferenzieren, proliferieren und chemische Signale wie NGF (Nerv growth factor) freisetzen. Dies führt zu axonalem Wachstum, Remyelinisierung und Sensibilisierung der Nozizeptoren (Scholz und Woolf 2007). In einer weiteren Studie wurde die Sox-10 Expression in intrapancreatischen Nerven untersucht. Sox-10 ist ein Transkriptionsfaktor der Gliazellen. Die Sox-Proteine befinden sich auf einer DNA Bindungsdomäne, die große Ähnlichkeit zu dem SRY Gen

(Geschlechtsbestimmende Region des Y-Gens) hat. Während der Embryonalentwicklung taucht Sox-10 das erste Mal in der Neuralleiste auf, wird weiter in den sich entwickelnden Zellen des PNS exprimiert, die sich dann schließlich in hSC differenzieren. Im ZNS ist man lange Zeit davon ausgegangen, dass Sox-10 nur in den Glia Vorläuferzellen vorkommt, allerdings wurde es auch in den Oligodendrozyten nachgewiesen (Kuhlbrodt, Herbarth et al. 1998). Bei der Untersuchung von Sox-10 in hSC kam man zu dem Ergebnis, dass Sox-10 in reifen hSC kontinuierlich exprimiert wird (Kuhlbrodt, Herbarth et al. 1998). Es wurde sich daraufhin gefragt, ob sich die Expression im PCa verändert. Dies untersuchte Ceyhan et al. und kam dabei zu der Erkenntnis, dass Sox-10 in PCa im Vergleich zum normalen Pankreas herunterreguliert wird. Ein Erklärungsansatz geht davon aus, dass die Herunterregulierung durch die erhöhte Apoptose von hSC her rührt. Der andere Vorstoß besagt, dass die Reduktion von Sox-10 durch die Entdifferenzierung der Gliazellen im Falle einer Nervenschädigung ausgelöst wird (Ceyhan, Demir et al. 2009). In der derselben Arbeit wurde auch die Nestin Expression im PCa beobachtet. Nestin ist ein Marker für neuronale Vorläuferzellen und wird im PCa hochreguliert (Ceyhan, Demir et al. 2009). Dieses Protein steht im Zusammenhang mit erhöhter Aggressivität von Karzinomzellen und Invasion (Thomas, Messam et al. 2004; Kleeberger, Bova et al. 2007). So sprechen die Hochregulation von Nestin und die Herunterregulierung von Sox-10 für aktivierte und möglicherweise entdifferenzierte hSC. hSC sind nach Nervenschädigung zu einer axonalen Regeneration in der Lage, und daher könnten die neurale Hypertrophie und die erhöhte Nervendichte auf die aktivierte hSC-Population im PCa zurückzuführen sein (Scholz und Woolf 2007; Ceyhan, Demir et al. 2009). Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Gliazellen zu einer Sensibilisierung der intrapancreatischen Nozizeptoren beitragen (Ceyhan, Demir et al. 2009).

## **4 Adhäsionsmoleküle auf Schwannschen Zellen**

Auf der Suche nach neuen Anhaltspunkten beim Verständnis der perineuralen Invasion, bezog man neuerlich auch direkte Zell-Zell-Verbindungen zwischen Karzinom- und Nervenzellen in die Überlegungen mit ein. Die ersten Zellen, mit denen Karzinomzellen nach Überwinden des Perineuriums in Kontakt kommen, sind die Gliazellen. Im Falle des peripheren Nervensystems sind das die hSC, die dabei zum Teil zerstört werden (Bockman, Buchler et al. 1994). Die Relevanz der Adhäsionsmoleküle der hSC wird im Weiteren näher betrachtet.

### **4.1 Relevanz für die neurale Invasion**

Eine neue Theorie bezüglich der neuralen Invasion beim PCa stellte Swanson et al. auf. MUC1 ist ein Typ I membrangebundenes transmembranöses Muzin, das die Adhäsions-, Differenzierungs- und Wachstumseigenschaften von Zellen beeinflussen kann (Hollingsworth und Swanson 2004). Dieses Muzin, das in allen Organen des Menschen vorkommt, wird bei einigen Adenokarzinomen hochreguliert und anders glykosyliert, als beispielsweise beim Mammakarzinom, wo es mittlerweile als Tumormarker dient (Hanisch, Stadie et al. 1996). Auch im PCa kommt es zu einer Hochregulation von MUC1 in den Karzinomzellen (Burdick, Harris et al. 1997). Durch MUC1 kann es zu adhäsiven oder antiadhäsiven Effekten kommen, je nachdem ob sich der Rezeptor auf derselben Zelloberfläche (antiadhäsiv) oder einer anderen Zelloberfläche (adhäsiv) befindet (Swanson, McDermott et al. 2007). Mittlerweile ist bekannt, dass MUC1 in 60% der Pankreastumore und 100% der Metastasen überexprimiert wird und anders glykosyliert vorliegt (Acres und Limacher 2005). MAG ist ein membrangebundenes myelinassoziertes Glykoprotein und wird von myelinisierten hSC und Oligodentrozyten exprimiert (Trapp, Andrews et al. 1989). Es hat die Funktion eines Adhäsionsmoleküls und bindet Myelin an Axone (Schachner und Bartsch 2000). Bindungspartner für MAG können Proteine oder Glykolipide sein. MAG auf hSC bindet an Ganglioside auf Axonen, um eine Adhäsion herzustellen und die Nervenregeneration zu unterdrücken (Vyas, Patel et al. 2002). In einer interessanten Studie konnte die Expression sowohl von MUC1, als auch von MAG in den von Invasion betroffenen Nervenläsionen nachgewiesen werden. Auch die Pankreaskarzinomzellen exprimieren MUC1. Durch einen heterotypen Zell-Zell-Adhäsionsassay zwischen Pankreaskarzinomzellen und hSC, konnte die spezifische Verbindung von MAG

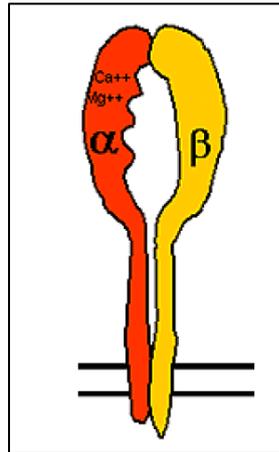
an MUC1 bewiesen werden und diese Bindung wurde durch eine höhere Expression der beiden Bindungspartner sogar noch verbessert. Die Adhäsion zwischen Karzinom- und hSC konnte durch anti-MAG Antikörper teilweise blockiert werden, anti-MUC1 Antikörper hingegen zeigte keinen Effekt. Damit wurde bewiesen, dass die Interaktion zwischen MUC1 und MAG zu der Adhäsion zwischen Pankreaskarzinomzellen und hSC beiträgt. Es wird weiter vermutet, dass Pankreaskarzinomzellen mit hoher MUC1 Expression einen Vorteil haben, sobald sie das Endoneurium zerstört haben und in Kontakt mit MAG exprimierenden hSC kommen. Dieser Adhäsionsvorteil ist ein weiterer Grund, warum die Karzinomzellen in den Nerven überleben und proliferieren können (Swanson, McDermott et al. 2007). In einer anderen Untersuchung wurde ein Mausmodell herangezogen, um die Bedeutung von MUC1 im PCa besser zu verstehen. Dafür gab es eine Tiergruppe, die kein MUC1 (MUC1 Null) und eine andere Gruppe, die humanes MUC1 exprimierten (Besmer, Curry et al. 2011). Die Mäuse entwickelten jeweils spontan ein PCa. Folgendes Ergebnis wurde dabei erzielt: Die MUC1 Null Mäuse hatten eine signifikant langsamere Tumorprogression, eine niedrigere Metastasierungsrate und eine bessere Überlebenschance als die Gruppe mit humaner MUC1 Expression. In vitro konnte außerdem gezeigt werden, dass Zellen ohne MUC1 Expression eine reduzierte Proliferation und Invasion zeigten (Besmer, Curry et al. 2011).

Dadurch, dass die Bindung der beiden Zellarten durch den anti-MAG Antikörper in der wissenschaftlichen Untersuchung von Swanson, McDermott et al. (2007) nicht vollständig blockiert werden konnte, geht man davon aus, dass noch andere Oberflächenmoleküle auf den hSC zu einer Adhäsion an den Karzinomzellen beitragen. Deshalb wird nun im Anschluss auf die zwei Oberflächenmoleküle beta 1 Integrin und NCAM eingegangen und deren Verbindung zur neuralen Invasion beim PCa dargelegt.

## **4.2 Beta 1 Integrin**

Beta 1 Integrin gehört zu den Integrinen. Diese sind heterodimere Transmembranproteine, die in fast allen Zellen, mit Ausnahme der roten Blutkörperchen, vorkommen und eine Rezeptorfunktion in der Zellmembran erfüllen. Die Integrin Familie besteht aus 18  $\alpha$  und acht  $\beta$  Untereinheiten, die untereinander 24 verschiedene Heterodimere bilden können (Abb. 1) (Hynes 2002; Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Die größte Untergruppe wird von der beta

1 Untereinheit gebildet. Dieser gehören 12 Mitglieder an, die verschiedene Bindungseigenschaften besitzen. Alle beta 1 Integrine binden an extrazelluläre Matrixproteine.  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$  und  $\alpha_{11}\beta_1$  binden an Kollagen,  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  und  $\alpha_7\beta_1$  binden an Laminin,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_1$  binden an Fibronectin,  $\alpha_9\beta_1$  bindet an Tenascin C und  $\alpha_v\beta_1$  bindet an Vitronectin (Brakebusch und Fassler 2005). Das molekulare Gewicht von beta 1 Integrin beträgt zwischen 140 und 150 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/P05556>).



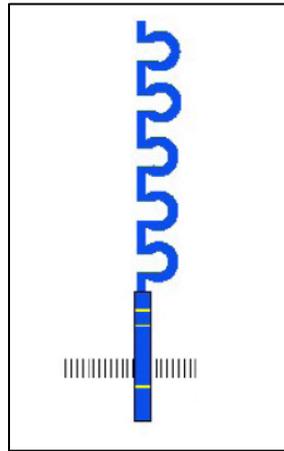
**Abb. 1: Die Struktur von Integrinen.** Eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ - Untereinheit bilden zusammen das heterodimere Transmembranprotein, das dauerhaft in der Zellmembran verankert ist und dort als Rezeptor agiert. Quelle der Abb: <http://userpage.chemie.fu-berlin.de/biochemie/aghucho/Einfuehrung2000/image40D.JPG>

Integrine regulieren eine Vielzahl an Tumorzellfunktionen, wie zum Beispiel Adhäsion, Migration, Invasion und Proliferation von Zellen (Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Im Zusammenhang mit PCa konnte herausgefunden werden, dass eine hohe Expression der  $\alpha_6\beta_1$  Untereinheit mit einer schlechten Prognose und dem Auftreten von Lebermetastasen korreliert (Sawai, Funahashi et al. 2003; Sawai, Okada et al. 2008). In einer anderen Studie wurde untersucht, welche Auswirkungen sich durch ein Knockdown der beta 1 Untereinheit im PCa in vitro und in vivo ergeben. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass es bei Ausschaltung der beta 1 Untereinheit auf den Karzinomzellen in vitro zu einer Unterdrückung der Zelladhäsion, Migration und Proliferation gegenüber Kollagen Typ I und IV, Fibronectin und Laminin kommt. In vivo wurde das primäre Tumorwachstum interessanterweise um 50% reduziert und spontan auftretende Metastasierung wurde komplett unterdrückt. Diese Ergebnisse sprechen beta 1 Integrin eine wichtige Rolle bei der Progression und Metastasierung im PCa zu (Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Bei einer weiteren Untersuchung wurde die Korrelation

zwischen der Expression von Basalmembranproteinen und der Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen untersucht. Dazu beobachtete man die Basismigration verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien und registrierte den Effekt nach Zugabe von Kollagen Typ I und IV, Laminin und Fibronectin. Die Migration nahm nach Zugabe der Basalmembranproteine signifikant zu und wurde interessanterweise durch Behandlung der Karzinomzellen mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper stark gehemmt. Die erwähnten Basalmembranproteine zeigen eine besonders hohe Expression im Bereich des Perineuriums. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Perineurium einen beliebten Ort für die Tumorzellmigration darstellt, die durch einen beta 1 Integrin blockierenden Antikörper gehemmt werden kann (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009).

### 4.3 NCAM

Neural cell adhesion molecule (NCAM) ist ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie der Adhäsionsmoleküle. Es ist durch seine Rezeptorfunktion an homophilen interzellulären Adhäsionen beteiligt, wie beispielsweise während der Embryogenese; es spielt allerdings auch eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung (Tezel, Kawase et al. 2001). CAMs (Cell Adhesion Molecules) sind komplexe Transmembranproteine mit einer großen extrazellulären Region und einer kürzeren zytoplasmatischen Domäne, die reversibel an das Aktin Zytoskelett gebunden ist (Maness und Schachner 2007). NCAM wurde als erstes CAM identifiziert. Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf Immunglobulin ähnlichen, mit Disulfidbrücken stabilisierten, und zwei Fibronectin Typ III Regionen, gefolgt von verschiedenen gespleißten zytoplasmatischen Domänen (Abb.2). Aus den zytoplasmatischen Domänen entstehen die zwei wichtigsten Isoformen bei 140 und 180 kDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/P13591>). Die Isoform bei 120 kDa ist mit der Plasmamembran durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verbunden (Schmid und Maness 2008).



**Abb. 2: Die Struktur der Ig Superfamilie.** Gut zu erkennen ist die große extrazelluläre Domäne, die mit Disulfidbrücken verbunden ist. Die kürzere zyttoplasmatische Domäne folgt daraufhin. Quelle der Abb.: <http://userpage.chemie.fu-berlin.de/biochemie/aghucho/Einfuehrung2000/image40D.JPG>

NCAM vermittelt eine Neuron zu Neuron oder Neuron zu Glia Verbindung, dies geschieht entweder homophil oder heterophil (Seki und Arai 1993). Während der Entwicklung des Nervensystems liegt NCAM in der polysialylierten Form vor. Das bedeutet, dass Polysialinsäure (PSA) an NCAM bindet. Dieser Komplex wird auch als embryonale Form von NCAM bezeichnet. In dieser polysialysierten Form, auch als NCAM-H definiert, wird die Adhäsion zwischen den Zellen gelockert, und der Zell-Zell Abstand wird größer (Seki und Arai 1993). NCAM Expression konnte schon in einigen Tumorarten nachgewiesen werden, wie beispielsweise im Neuroblastom oder nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Hier ist die NCAM Expression jeweils mit einer schlechteren Prognose verbunden (Kibbelaar, Moolenaar et al. 1991). Dabei kommt NCAM auch jeweils in der polysialisierten Form vor und steht im Verdacht eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung zu spielen (Seki, Koyama et al. 1995; Tezel, Kawase et al. 2001). Kameda fand heraus, dass in 66,7% der PCa, die er untersucht hat, NCAM Expression aufgetreten ist. Neun davon wiesen daneben eine massive perineurale Invasion auf. Weiter wurde eine Korrelation zwischen NCAM Expression und der extrapankreatischen neuralen Invasion festgestellt (Kameda, Shimada et al. 1999). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von NCAM in Karzinomzellen, die an einer perineuralen Invasion beteiligt sind, signifikant erhöht ist. Daneben wurde in dieser Untersuchung auch festgestellt, dass NCAM positive Patienten weniger Lebermetastasen zeigen und eine bessere Prognose haben, als NCAM negative Patienten (Kenmotsu 1990).

Weiterhin wurde gezeigt, dass das Vorkommen von NCAM in mäßig differenzierten tubulären PCa mit einer besseren Prognose korreliert (Tezel, Kawase et al. 2001). Über die genaue Rolle von NCAM bei der neuralen Invasion ist man sich noch unschlüssig, aber man vermutet, dass PSA einen entscheidenden Einfluss auf die Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen hat (Kameda, Shimada et al. 1999).

## 5 Ziele der Arbeit

Die hSC wurden als ein neuer Ausgangspunkt im Verständnis der neuralen Invasion im PCa entdeckt. Zurückliegende Forschungsarbeiten lassen darauf schließen, dass spezielle Oberflächenmoleküle auf den hSC zu der Zell-Zell-Adhäsion zwischen Glia- und Karzinomzellen beitragen. Beruhend darauf sollte die Bedeutung der beiden Adhäsionsmoleküle beta 1 Integrin und NCAM auf die neurale Invasion hin analysiert werden, da beide in der Zell-Zell-Adhäsion und interzellulären Interaktion eine Rolle spielen. Sowohl mit beta 1 Integrin, als auch mit NCAM sind bisher noch keine funktionellen Studien, bezogen auf die neurale Invasion im PCa, durchgeführt worden. Deshalb gaben die beiden Moleküle Anlass zur genaueren Erforschung in Bezug auf Zell-Zell Kontakte zwischen hSC und Pankreaskarzinomzellen während des Prozesses der neuralen Invasion. So wurde zu Beginn des Projektes eine ausführliche Expressionsanalyse dieser beiden Moleküle auf den hSC und den Karzinomzellen durchgeführt, um zu erfahren, ob und in welchen Mengen sie auf diesen Zellen auf RNA- und Proteinebene exprimiert werden. Im Anschluss daran lag das Interesse auf der quantitativen Analyse dieser Oberflächenmoleküle in intrapankreatischen Nerven im PCa und im NP. Man wollte der Frage nachgehen, ob sich eine Veränderung des Expressionsmusters von beta 1 Integrin und NCAM im PCa, insbesondere aber im Falle einer neuralen Invasion ergibt. Großes Interesse galt im Anschluss auch dem Sachverhalt, inwieweit beta 1 Integrin und NCAM tatsächlich an der direkten Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Dazu wurde ein heterotyper Adhäsionsassay mit hSC und Pankreaskarzinomzellen etabliert, bei dem die Adhäsionsmoleküle sowohl auf den hSC, als auch auf den Karzinomzellen durch blockierende Antikörper inaktiviert und der Effekt beobachtet wurde. Außerdem war natürlich wichtig, welche Zellart durch die Behandlung mit dem Antikörper

auf die Adhäsion mehr Einfluss nehmen kann. Gerade in dem zuvor dargelegten Zusammenhang von MUC1 und MAG war es besonders spannend zu erfahren, ob diese beiden Moleküle die Fähigkeit haben, die Zell-Zell-Adhäsion von hSC und Pankreaskarzinomzellen zu beeinflussen. Ein Migrationsassay sollte im Anschluss die Frage beantworten, auf welche Art und Weise die Anziehung zwischen Karzinomzellen und hSC besteht. Zeigen die hSC eine gerichtete Migration hin zu den Pankreaskarzinomzellen und kann das durch blockierenden Antikörper eingeschränkt werden? Dazu sollte die Migration der hSC hin zu einer Pankreaskarzinomzelllinie beobachtet und mit der Migration zu einer Kolonkarzinomzelllinie bzw. zu Fibroblasten verglichen werden.

Durch das in der Arbeitsgruppe entwickelte neue 3D Migrationsmodell lassen sich Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelllinien gut beobachten, und es kann eine Aussage über die Direktionalität der Zellwanderung, die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz der Zellen getroffen werden. Mit dieser Methode ist es in vielen Bereichen der Tiermedizin ebenfalls möglich, spezifische Fragestellungen zu beantworten. Die neurale Invasion im PCa spielt bei Tieren bis jetzt zwar eine untergeordnete Rolle, da die Tiere meist sehr schnell versterben. Sobald allerdings die palliativen Möglichkeiten in der Tiermedizin weiter ausgebaut werden, kommt dieses Phänomen ebenfalls zum Tragen. So sollte man bei betroffenen Tieren besonderen Wert auf die Schmerztherapie legen und präoperativ die Lokalrezidivproblematik mit dem Besitzer ausführlich besprechen.

Dieses Projekt war Teilprojekt einer größeren Forschungsarbeit zur Charakterisierung der Rolle der peripheren Gliazellen in der neuralen Invasion im PCa am Klinikum rechts der Isar.

### **III MATERIAL UND METHODEN**

#### **1 Patienten**

Das Material für die nachfolgend beschriebenen Methoden setzte sich folgendermaßen zusammen: die Pankreaskarzinomproben, die für die Arbeit verwendet wurden, wurde Patienten im Rahmen eines operativen Eingriffes mit vorangegangener Einwilligung entnommen. Das Patientenkollektiv (n=49) setzte sich wie folgt zusammen: 34% Frauen, 66% Männer. Das Durchschnittsalter betrug median 59,7 Jahre. Im Tumorstadium 1 befanden sich vier Patienten, acht Personen waren im Tumorstadium 2, 33 Patienten im Tumorstadium 3 und vier Person im Tumorstadium 4. Die Proben des NP (n=42) wurden aus Geweben hergestellt, die von gesunden, verstorbenen Organspendern stammten, für die kein passender Empfänger gefunden wurde.

#### **2 Zellbiologische Untersuchungen**

##### **2.1 Zellkulturmaterialien**

###### **2.1.1 Geräte**

- Fluoreszenzlampe: HBO 100, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Zellkultur: FASTER BHA 72, BHA 72M 1013 (Ferrara, Italien)
- Große Zentrifuge: Centrifuge, 5810 R, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)
- Inkubator: Galaxy 170S, New Brunswick an Eppendorf company (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Primärzellkultur: FASTER S.R.L., BHA-48 (Ferrara, Italien)
- Kleine Zentrifuge: Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Mikroskop 1: Primo Vert, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikroskop 2: Observer Z1, Zeiss (Oberkochen, GER)

- Pipet Boy, Integra (Fernwald, GER)
- Vortexer: IKA Works, INC., MS 1 Minishaker (Wimington, USA)
- Wasserbad: Aqualine AL 18, Lauda (Lauda Königshofen, GER)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- 96 well Platten: 96 well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Migrationsassay Dish: Fluoro Dish TM, dish 35mm, glass 23mm, WPI (Sarasota, USA)
- Pipetten: Tip One, Star lab (Hamburg, GER)
- Pipetten, Glas: Serological Pipette, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Reagenzröhrchen: Falcon Röhrchen, Ratiolab (Dreieich, GER)
- Tubes: Reagiergefäße Safe Seal, Sarstedt (Nürnberg, GER)
- Zellkulturflaschen: Cellstar, 75cm<sup>2</sup>, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Zellschaber: Cell Lifter, Costar (Washington, USA)

### 2.1.3 Zellkulturmedien, Zusätze und Gebrauchslösungen

- Cell Dissociation Solution, non-enzymatic 1x, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- DMSO: Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- ECM-Gel: Extracellular cell matrix gel from Engelbreth Holm Swarm mouse sarcoma, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- HEPES buffer solution, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Isotyp Antikörper: IgG rabbit, Dako (Hamburg, GER)

- Isotyp Antikörper: IgG1 mouse, Dako (Hamburg, GER)
- Neurobasal Medium, L- Glutamine, Invitrogen-GIBCO (Darmstadt, GER)
- Paraformaldehyd 8%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Penicillin-Streptomycin, Bio Reagent, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Poly-D-Lysine hydrobromide, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Trypan Blue Stain 0.4%, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- Trypsin- EDTA, Solution 1x, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen (Darmstadt, GER)

**Tabelle 1: Zellkulturmedien inkl. Zusätze**

<b>Medien:</b>	<b>Zelllinien:</b>
<b>DMEM High Glucose (4,5 g/l)</b>  <b>With L-Glutamine</b>  <b>+ 10% FCS</b>  <b>+ 1% P/S</b>  <b>E15-810, PAA (Cölbe, GER)</b>	<b>BJ (ATCC Nr.: CRL-2522)</b>  <b>Mia-PaCa-2 (ATCC Nr.: CRL-1420)</b>  <b>DLD-1 (ATCC Nr.: CCL-221)</b>
<b>RPMI 1640</b>  <b>With L-Glutamine</b>  <b>+ 10% FCS</b>  <b>+ 1% P/S</b>  <b>E15-840, PAA (Cölbe, GER)</b>	<b>SU86.86 (ATTC Nr.: CRL-1837)</b>  <b>T3M4</b>
<b>SCM Schwann Cell Medium</b>  <b>+ 5% FCS (Scien Cell, USA)</b>  <b>+ 1% P/S Solution (Scien Cell, USA)</b>	<b>hSC</b>

+ 1% SCGS (Scien Cell, USA)	
Scien Cell (Carlsbad, USA)	

#### 2.1.4 Zelllinien

Als Zelllinien wurden für das Projekt BJ, Mia-PaCa-2, SU86.86, T3M4 und DLD-1 verwendet (Tabelle 1). Humane Schwannsche Zellen (Human Schwann Cells, hSC) wurden von der Firma Scien Cell bezogen, die humanen Spinalnerven entstammen und primäre Zellen darstellen. BJ ist eine humane Fibroblastenzelllinie, die aus menschlicher Vorhaut neugeborener Jungen gewonnen wird. Mia-PaCa-2, SU86.86 und T3M4 Zellen sind allesamt Pankreaskarzinomzelllinien. Bis auf T3M4 wurden alle Zelllinien von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Mia-PaCa-2 gibt es seit 1975. Damals wurden sie aus einem PCa eines 65 Jahre alten Mannes isoliert. SU86.86 stammt ursprünglich aus einer Lebermetastase eines duktales PCa einer 57-jährigen Frau. Die T3M4 Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. R.S. Metzgar (Duke University) zur Verfügung gestellt. DLD-1 ist eine Kolonkarzinomzelllinie, stammt aus einem colorektalen Adenokarzinom eines Mannes und wurde ebenfalls von der ATCC bezogen.

#### 2.1.5 Antikörper

- $\beta 1$  Integrin: monoklonaler Antikörper aus der Maus, Konzentration variabel, Millipore (Massachusetts, USA)
- NCAM: monoklonaler Antikörper aus der Maus, Anti-neural cell adhesion molecule, Konzentration: 1mg/ml, Millipore (Massachusetts, USA)

## 2.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei konstanten Bedingungen, 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit gelagert.

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80%. Der Vorgang ging folgendermaßen vonstatten: das Medium wurde abgesaugt, anschließend wurde mit ca. 5ml PBS-Puffer Lösung gewaschen und ein Volumen von 1 ml Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen pipettiert. Nach 3-4 Min. im

Brutschrank und vorsichtigem Beklopfen der Flasche hatten sich die Zellen gelöst und durch das Hinzugeben von 9 ml des entsprechenden Mediums mit FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Um die Zellen gut zu resuspendieren und die noch am Flaschenboden anhaftenden Zellen abzulösen, wurde das Volumen mit einer Pipette mehrmals auf und ab pipettiert. Anschließend wurden die Zellen in bereits vorbereitete Flaschen 1:5 bis 1:10 gesplittet.

### 2.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung einer Zellsuspension erfolgte in einer mit einem Deckglas verschlossenen Neubauerzählkammer (0,0225 mm<sup>2</sup> Fläche bei einer Tiefe von 0,1 mm). Dazu wurden 10µl der 1:1 mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Das Prinzip der Zellzählung beruht auf der Tatsache, dass lebende Zellen den Farbstoff aus ihrem Zellkern heraustransportieren können, tote Zellen allerdings nicht. Somit kann man bei Betrachtung unter einem Lichtmikroskop lebendige und tote Zellen leicht voneinander abgrenzen. Die vitalen Zellen wurden mäanderförmig und unter Beachtung des L-Randes in den vier großen Eckquadraten ausgezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times 10^4 = \text{Anzahl vitaler Zellen/ml}$$

### 2.2.2 Auftauen und Gefrierkonservierung von Zellen

Viele Zellen können in flüssigem Stickstoff sehr lange gelagert werden. Das Einfrieren von Zellen ist problematisch, da durch Eiskristallbildung die Zellen irreversibel zerstört werden können. DMSO dient beim Einfrierprozess als kryoprotektive Substanz zum Schutz vor Eiskristallbildung, indem es Löcher in der Zellwand induziert. Das Einfriermedium besteht aus FCS mit 10% DMSO. Es wurden eine Million Zellen/Tube eingefroren. Das Einfrieren der Zellen sollte stufenweise erfolgen, damit das Wasser aus den Zellen nach und nach austreten kann. Der Einfrierprozess geschieht zuerst auf Eis und anschließend kommen die Zellen, geschützt durch Isopropanol, für 24h auf -80°C und dann in flüssigen Stickstoff.

Beim Auftauen der Zellen ist es wichtig, dass der Vorgang schnell erfolgt und das DMSO aus den Zellen ausgewaschen wird. Die Zellen mit DMSO werden in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt, für 5 Min. bei 1000rpm zentrifugiert, das

Medium abgesaugt und mit frischem Medium in Kultur genommen.

### **2.2.3 Beschichtungen von Zellkulturoberflächen für Schwannsche Zellen**

Zellkulturflaschen, in denen hSC kultiviert wurden, wurden gemäß der Empfehlung der zur Verfügung stellenden Firma mit Poly-D-Lysin beschichtet (1ml an 0,1mg/ml pro 75 cm<sup>2</sup> Fläche). Nach 15 Min. saugte man das restliche Poly-D Lysin ab und die Flasche wurde mit 5 ml PBS-Puffer Lösung gewaschen.

## **2.3 Migrationsassay**

Das durchgeführte dreidimensionale neurale Migrationsassay wurde zum zeitnahen Monitoring der Neuron-gerichteten Tumorzellmigration entwickelt und war zur Zeit der Durchführung der Arbeit als Technik bereits veröffentlicht (Ceyhan, Demir et al. 2008). Dazu werden die Zelllinien, die man beobachten möchte, in einem ECM-Gel (extrazelluläres Matrix Gel), das unter anderem Laminin und Fibronectin enthält, aufgenommen, 1 mm voneinander entfernt pipettiert und mit Gel Brücken verbunden. Je nach Zelllinie kann man bereits nach 12-24h eine gerichtete Migration erkennen (Ceyhan, Demir et al. 2008). Dazu müssen die Zellen das Gel degradieren und sich durch die Brücke hindurch einen Weg zu der anderen Zelllinie bahnen.

### **2.3.1 Antikörper-Behandlung der Zellen**

Die benötigten Zelllinien wurden soweit kultiviert bis der Monolayer ca. 80% konfluent war. Dann wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst, in frischem Medium aufgenommen und in ein 15er Falcon überführt. Die Zellzahl pro Zelllinie wurde bestimmt. Für die hSC wurde eine Zellzahl von 50.000 Zellen pro Ansatz, für alle anderen Zelllinien eine Zellzahl von 100.000 Zellen pro Ansatz verwendet. Die erforderliche Menge an Zellsuspension wurde in kleine Tubes abgefüllt und für 5 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert.

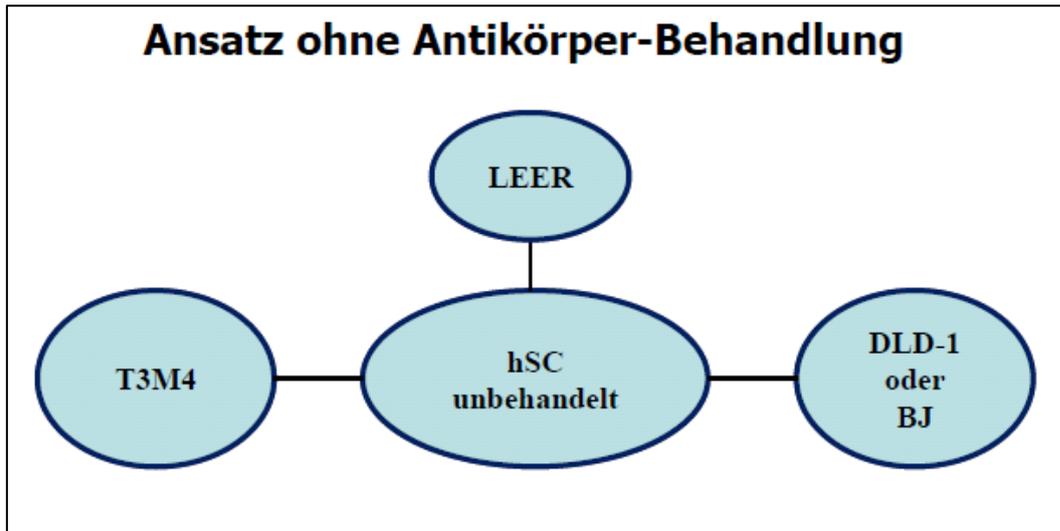
Da Trypsin-EDTA Lösung die Adhäsionsepitope auf den Zellen zerstört, an denen der Antikörper binden soll, dürfen die Zellen, die für die Antikörper-Behandlung vorgesehen sind, nicht mit Trypsin-EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst werden. Deshalb wurde für diesen Fall eine nicht-enzymatische Zell-Dissoziations-Lösung verwendet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1 Million Zellen für die Antikörper-Behandlung eingesetzt. Die

Antikörperverdünnung für beta 1 Integrin lag hier bei 1:50. Als Isotypkontrolle wurde sowohl ein Kaninchen (20mg/ml) als auch ein Maus (100µg/ml) Isotyp in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und in 400µl FCS freiem Medium verdünnt. Die Falcons wurden für 1h in den Brutschrank bei 37°C gelegt. Im Anschluss wurden die Röhren erneut zentrifugiert, das Medium über dem Pellet vorsichtig abgenommen und mit 10 ml PBS Puffer resuspendiert.

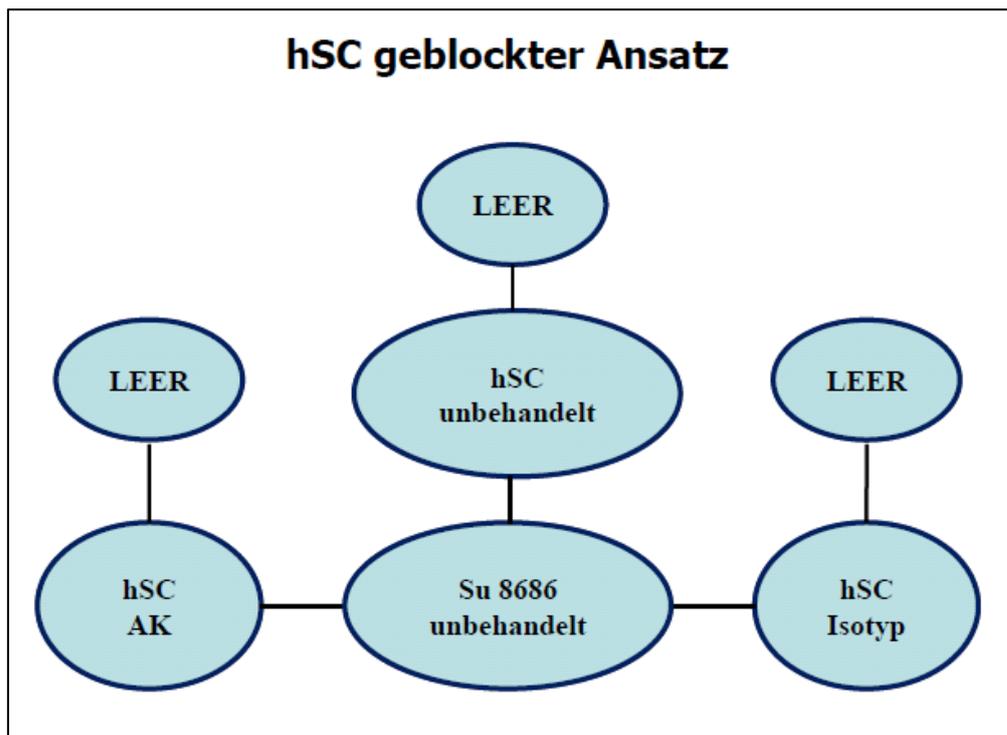
Bedingt durch die zahlreichen Zwischenschritte wurde die Zellzahl an dieser Stelle erneut bestimmt. Wie oben schon erwähnt, wurden bei den hSC 50.000 Zellen und bei den anderen Zelllinien 100.000 Zellen pro Ansatz verwendet.

### **2.3.2 Anordnung des Assays**

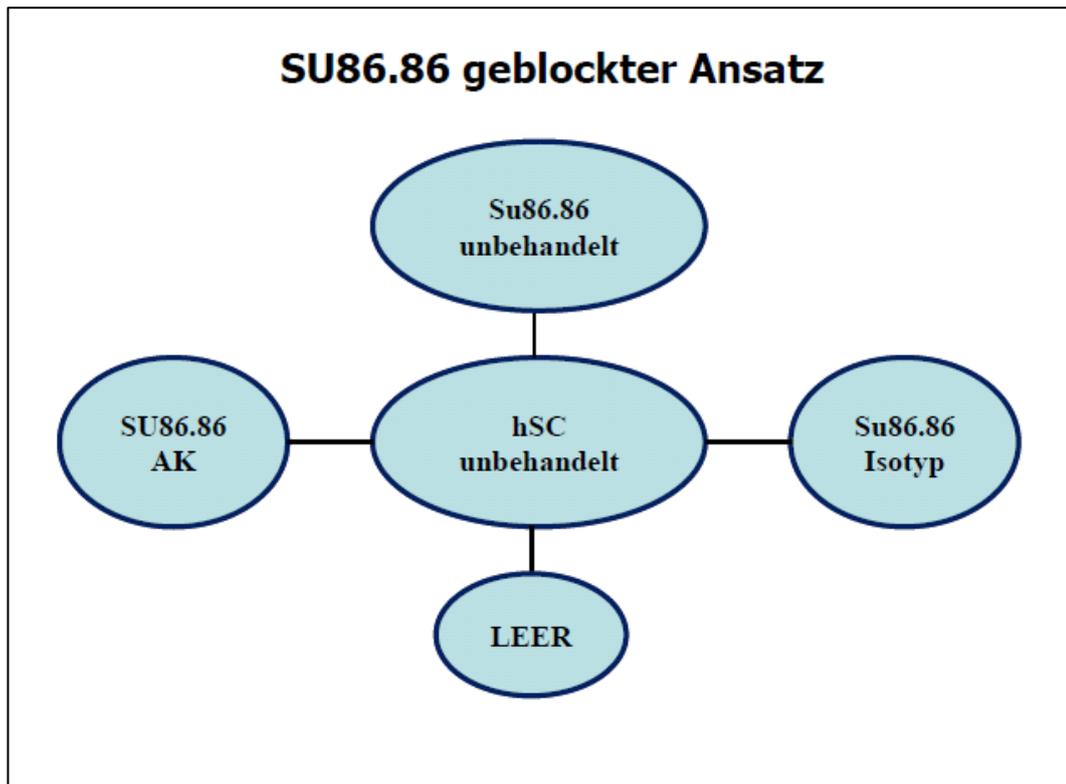
Nach dem Zentrifugieren der vorher bestimmten Zellmenge wurde der Überstand über dem Pellet vorsichtig abgenommen. Die Zellen wurden in 25µl ECM-Gel durch vorsichtiges Resuspendieren aufgenommen. Je nachdem, ob bei einem Ansatz keine Antikörper (AK)-Behandlung (Abb.3) stattgefunden hat, die hSC (Abb.4) oder die Karzinomzellen (Abb.5) mit Antikörper blockiert wurden, ergab sich folgendes Bild:



**Abb. 3:** Pipettierschema für Migrationsassays ohne Antikörper (AK)-Behandlung. Die unbehandelte hSC befinden sich in der Mitte des Assays, links davon T3M4 Zellen, rechts davon je nach Ansatz DLD-1 oder BJ Zellen und nach oben hin wurde ein ECM-Gel ohne Zellen pipettiert.



**Abb. 4:** Pipettierschema für Migrationsassays bei AK-Behandlung der hSC. Das Zentrum der Migrationsassay Anordnung bilden unbehandelte SU86.86 Zellen, um diese herum werden hSC platziert, die zum einen unbehandelt, zum anderen mit AK bzw. mit Isotyp vorbehandelt worden sind. Die leeren ECM-Gele außen herum dienen als Negativkontrolle.



**Abb. 5: Pipettierschema für Migrationsassays bei AK-Behandlung der SU86.86.** In der Mitte des Assays befinden sich unbehandelte hSC, links davon werden SU86.86 pipettiert, die vorher mit AK inkubiert worden sind. Rechts werden SU86.86 platziert, die mit Isotyp behandelt worden sind. Über den unbehandelten hSC in der Mitte befinden sich ebenfalls unbehandelte SU86.86 und darunter ein leeres ECM-Gel.

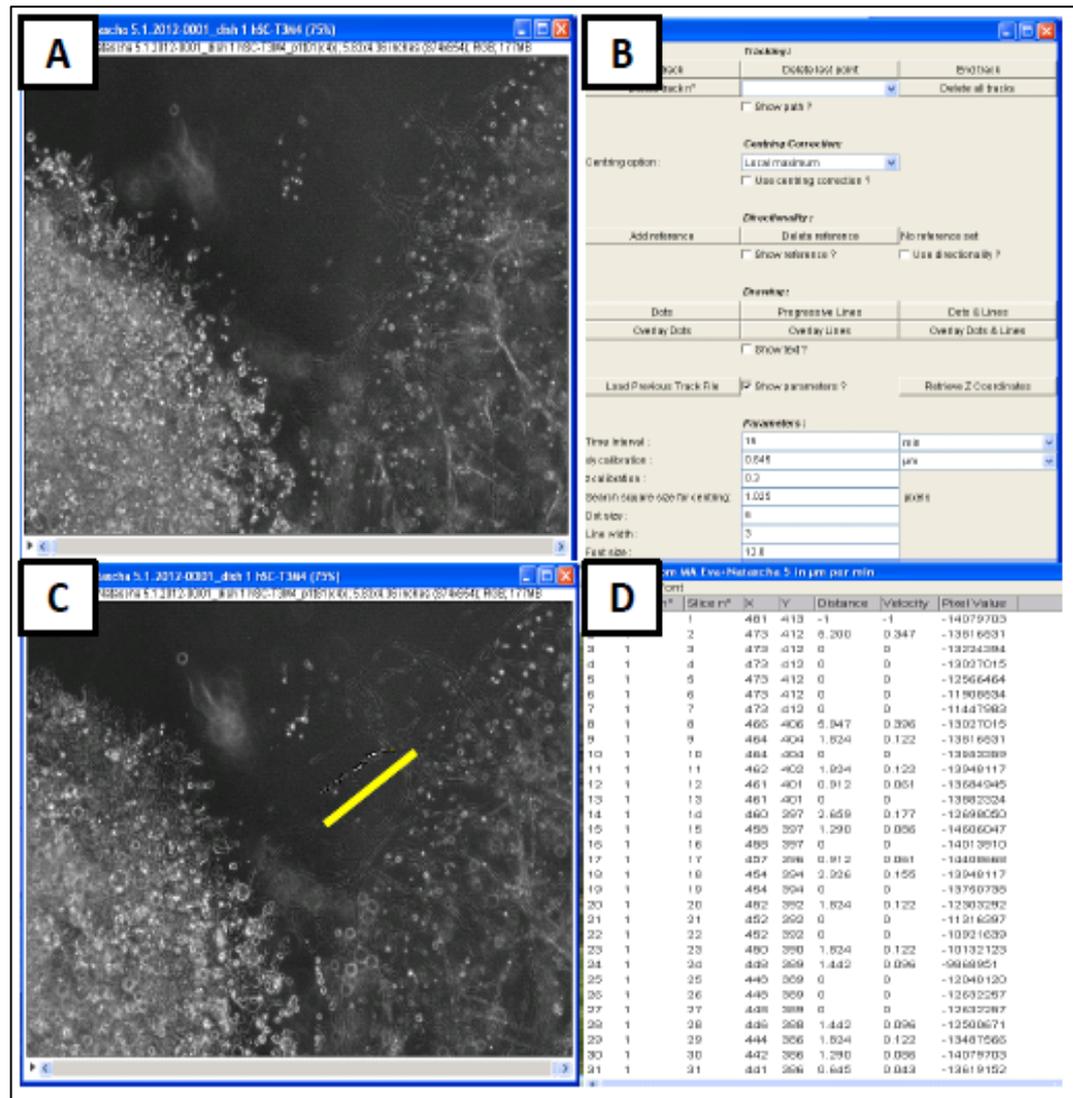
Beim Pipettieren des Assays geht man folgendermaßen vor: zuerst wurde die Zelllinie, die sich in der Mitte des Assays befindet, in 25µl ECM-Gel aufgenommen und genau ins Zentrum der 35mm x 10 mm Petri Schale platziert. Im Anschluss wurden die anderen Zelllinien in 25µl ECM-Gel resuspendiert und genau 1 mm neben das zentrale Zell-Gel-Gemisch pipettiert (siehe Abb.3-5). Um eine unspezifische Migration auszuschließen, wurde jeweils unter bzw. über die Zelllinie, die besonders interessiert, ein ECM-Gel ohne Zellen platziert. Die kleine Petri Schale kam im Anschluss für 20 Min. in den Inkubator, damit das ECM-Gel bei 37°C polymerisieren kann. Um überhaupt eine Migration zu ermöglichen bzw. einen Gradienten herzustellen, wurde zwischen den einzelnen Zelllinien eine 1 mm lange Brücke pipettiert. Auch die Brücken benötigten Zeit zum Polymerisieren, deshalb wurde der Ansatz erneut für 15 Min. in den Brutschrank gestellt, um anschließend das Ganze mit 2 ml Neurobasal Medium (+10% FCS) zu bedecken. Der Migrationsassay Ansatz wurde für 12-16h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

### 2.3.3 Time-Lapse Mikroskopie

Nach 12-16h erfolgte die Time-Lapse Mikroskopie für eine Zeitdauer von 20h. Um für stabile pH-Wert Verhältnisse zu sorgen, wurden pro ml eingesetztem Neurobasalmedium 25µl Hepes Puffer dazu gegeben. Die Zeitrafferaufnahmen erfolgten in einer Inkubationskammer, in der ebenfalls konstante 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre herrschten. Bei diesem Mikroskop war es durch den fahrbaren Tisch möglich, verschiedene Positionen einzustellen, die dann in der vorgegebenen Reihenfolge alle 15 Min. gefilmt wurden. So ergab sich bei 20h Aufnahmedauer eine Bildersequenz von 81 Bildern pro Front.

### 2.3.4 Auswertung

Die Auswertung der Migrationsassays wurde mit dem Chemotaxis und Migration Plug-In von Ibidi für Image J durchgeführt (Abb.6). Dazu wurden pro Front 30 Zellen auf ihrem Weg innerhalb der 20h Aufnahmedauer verfolgt (Cell Tracking). Hierbei wurde bei jedem Klick auf die Zelle die Position der Zelle innerhalb des Bildes gespeichert (Abb.6, D). Diese Tabelle mit den gespeicherten Positionen der Zelle wurde im Anschluss in einen Chemotaxis tool überführt. Hier werden diese Ergebnisse in statistisch auswertbare Daten wie Geschwindigkeit der Zelle, Direktionalität der Wanderung sowie euklidische Strecke der Zelle umgerechnet und in einer Excel-Tabelle abgespeichert.

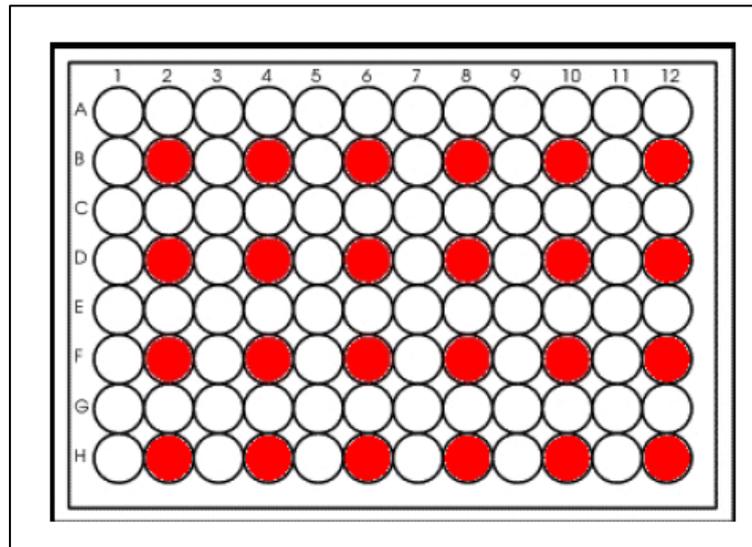


**Abb. 6: Auswertung des Migrationsassays.** Links befinden sich Pankreaskarzinomzellen (T3M4), rechts die hSC. A: Bildsequenz von 81 Einzelbildern wird in Image J importiert. B: Einstellung für das Manual tracking. C: Ende eines Track Vorgangs, zurückgelegter Weg einer Zelle wird graphisch durch die vielen Punkte dargestellt (hier durch gelben Strich verdeutlicht). D: Teil einer Ergebnistabelle, Position der Zelle wird bei jedem Klick gespeichert. Diese Informationen werden anschließend im Chemotaxis tool von IbiDi für Image J verarbeitet.

## 2.4 Adhäsionsassay

Das Prinzip des Adhäsionsassays beruht darauf, zu beobachten, wie viel Prozent einer Zellpopulation an eine andere Zellpopulation, die auf einer 96 well Platte ausgesät worden ist, anhaftet (Issa, Nummer et al. 2009). In diesem Versuchsaufbau wurde die Prozent-Adhäsion der Pankreaskarzinomzellen an hSC unter Blockade von beta-1-Integrin bzw. NCAM auf einer der beiden oder beiden Zellarten untersucht.

Je nach Passage der hSC wurden ca. 3-5 Tage vor dem geplanten Versuch die hSC mit einer Dichte von 6000 Zellen pro well auf 96 well Platten ausgesät. Um eine bessere Pipettierbarkeit zu ermöglichen, wurden die Platten jeweils mit einem well Abstand beschickt (Abb.7). Es ist hierbei wichtig, dass die hSC einen konfluenten Rasen innerhalb der wells bilden, um unspezifische Bindung der zu adhätierenden Zellart an die Plastikoberfläche zu vermeiden. Die Konfluenz des Zellrasens wurde vor jedem Versuch mittels eines Lichtmikroskops untersucht.



**Abb. 7:** Schema einer mit hSC beschichteten 96 well Platte. In jedem rot markiertem well wurden 6000 hSC ausgesät und über 3-4 Tage inkubiert bis ein vollständig dichter Rasen mit hSC entstanden ist.

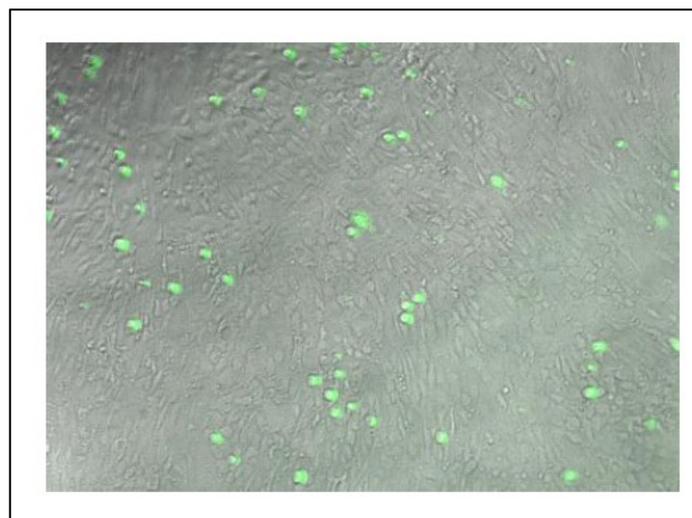
Bei jedem Versuchsdurchgang wurden drei mit hSC beschichtete 96 well Platten verwendet. Bei einer Platte wurden nur die hSC mit Antikörper, bei der zweiten nur die Karzinomzellen mit Antikörper und bei der dritten Platte sowohl die hSC wie auch die Karzinomzellen mit Antikörper vorbehandelt. Als Karzinomzellen sind für diesen Versuch sowohl SU86.86 als auch Mia-PaCa-2 verwendet worden. Die Antikörper für die hSC Behandlung wurden zur Vermeidung einer unspezifischen Antikörper-Bindung in FCS-freiem DMEM-Medium gelöst. Pro well wurden 50µl Antikörperlösung vorbereitet. Sowohl NCAM-, als auch beta 1 Integrin-blockierende Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

Bei jeder Platte erfolgte eine Kontrolle über einen nicht immunisierten Isotyp-Antikörper derselben Spezies. Hierzu wurde der Kaninchen- (20mg/ml) und der Maus- (100µg/ml) Isotyp in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und ebenfalls in

einem Volumen von 50µl pro well auf die Platte pipettiert und eine Stunde lang bei 37°C inkubiert

Um später den Adhäsionsassay auswerten zu können, müssen die Karzinomzellen, die auf den Platten adhären, sichtbar gemacht werden. Dies geschah durch eine Fluoreszenzmarkierung der Zellen mittels Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit von Invitrogen. Dazu wird das pulverförmige CFDA (Carboxy- Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) mit 90µl DMSO, das ebenfalls im Kit enthalten ist, vermischt.

Es ist zu beachten, dass auch 1 Million Zellen gefärbt werden müssen, die vorher nicht mit Antikörper vorbehandelt worden sind. Denn auf die Platte, auf der nur die hSC mit Antikörper vorbehandelt werden, müssen völlig unbehandelte, aber dennoch gefärbte Karzinomzellen pipettiert werden. Nach der einstündigen Antikörper-Behandlung und Waschen mit PBS wurde diesem Zell-Puffer-Gemisch 1 µl der Färbelösung hinzugefügt und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wieder zentrifugiert und die Zellen in 3 ml FCS-haltigem Medium gelöst, um noch überschüssigen Farbstoff am FCS zu binden. Es kommt so zu keinerlei Hintergrundfärbung bei diesem Farbstoff und die gefärbten Karzinomzellen heben sich durch ihre Grünfluoreszenz von den ungefärbten hSC im Hintergrund deutlich ab (Abb.8).



**Abb. 8:** Beispiel einer Zellfärbung mit Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit von Invitrogen. Die sich grün darstellenden Punkte sind fluoreszenzgefärbte SU86.86 Zellen, die ungefärbten, dicht gedrängten Zellen im Hintergrund sind hSC.

Nach 30 Min. bei 37°C wurden die Karzinomzellen einmal mit PBS-Puffer Lösung gewaschen und im Anschluss in 2 ml FCS-haltigem Medium resuspendiert. Durch die vielen Zwischenschritte gehen von den ursprünglich 1 Million Zellen einige Zellen verloren. Deshalb wurde am Ende der Färbung die Zellzahl erneut bestimmt.

Platte A: nur hSC mit Antikörper behandelt:

Nach der einstündigen Behandlung der hSC mit Antikörper wurde die Lösung mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und jedes Well mit 200µl PBS-Puffer Lösung gewaschen und anschließend mit den gefärbten aber unbehandelten Karzinomzellen inkubiert.

Platte B: hSC und Karzinomzellen mit Antikörper behandelt:

Die hSC beschichtete Platte wurde nach der Antikörper-Behandlung einmal mit PBS gewaschen und mit den mit Antikörper vorbehandelten, gefärbten Karzinomzellen inkubiert.

Platte C: nur Karzinomzellen werden mit Antikörper behandelt:

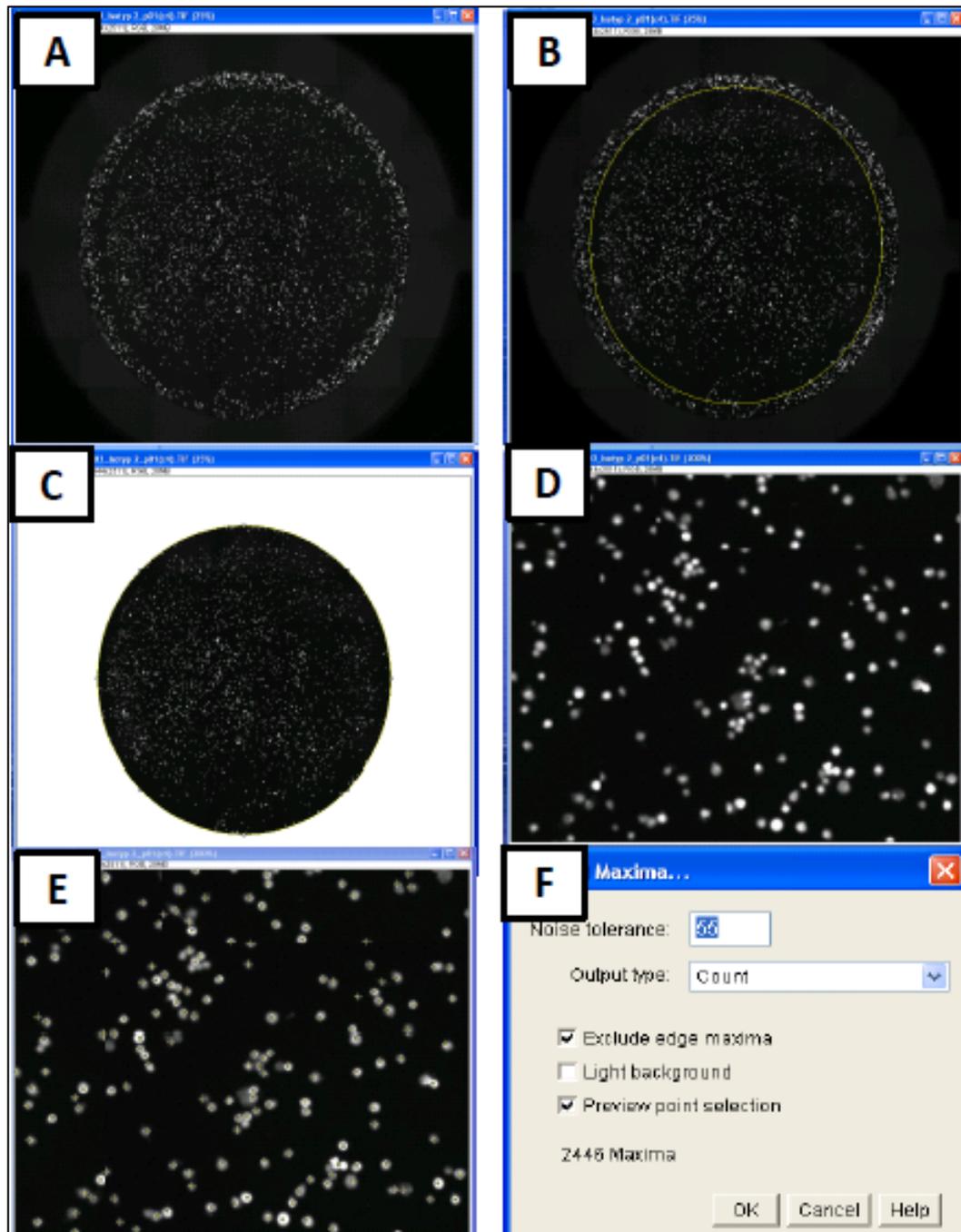
Die bis jetzt völlig unberührte Platte wurde nach dem Abnehmen des SCM Mediums ebenfalls einmal mit PBS-Puffer Lösung gewaschen. Dann wurden pro well 3000 antikörperbehandelte und gefärbte Karzinomzellen hinzu gegeben.

In der Inkubationszeit können die Karzinomzellen absinken und an die hSC adhären. Nach 30 Min. wurden die vorhandenen 200µl mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und jede Platte insgesamt zweimal mit 200µl PBS-Puffer Lösung gewaschen. Dadurch bleiben nur die Karzinomzellen zurück, die eine echte Zell-Zell-Adhäsion mit den hSC eingegangen sind.

Nach den beiden Waschschrritten wurden die Zellen fixiert, indem jeweils 100µl 4% Formalin in jedes well pipettiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. wurde das Formalin wieder abgenommen und jedes Well mit 200µl PBS-Puffer Lösung aufgefüllt. Die fluoreszenzmarkierten Karzinomzellen sind lichtempfindlich, deshalb sollten die Platten soweit es möglich ist, mit Alufolie abgedeckt werden. Nach der Formalinfixierung sind die Platten lichtgeschützt im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

Die Adhäsionsassays wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop well für well

abfotografiert. Mittels Image J konnte daraufhin die adhärierende Krebszellzahl ermittelt und bezogen auf die Isotyp-Kontrolle statistisch ausgewertet werden. Die Randbereiche der Wells wurden aufgrund unspezifischer Zelladhäsion ausgeschlossen, und die Anzahl der grünmarkierten Zellen durch automatisches Zählen der Farbmaxima mittels Image J ermittelt (Abb.9).



**Abb. 9: Auswertung eines Adhäsionsassays mittels Image J.** A: Bild eines Wells, mit Mikroskop abfotografiert. B: Ein bestimmter Bereich mit Ausschluss der Ränder wird markiert. C: Alles außerhalb des gelben Randes wird abgeschnitten. D: Hineinvergrößern in einen Teil des Wells. E: Zellen werden vom Programm erkannt und gelb markiert. F: Anzahl der gefundenen Maximas wird angezeigt. In diesem Fall befinden sich 2446 Zellen in dem Well.

## 2.5 Software

Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft, 14.0.4760.1000, Redmond, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, version 1.44
AxioVision	Zeiss, V 4.8.2.0, Göttingen, GER

## 3 Histologische Untersuchungen

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

- Entwässerungsmaschine: Vakuum Gewebeinfiltrationsautomat, Leica ASP 200S (Nussloch, GER)
- Kühlplatte: Medite Medizintechnik (Burgdorf, GER)
- Magnetrührer: MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
- Microtom: Leica JUNG RM2055, (Nussloch, GER)
- Mikroskop: Axioskop40, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikrowelle: Sharp (Ōsaka, Japan)
- Paraffineinbettautomat: EG 1160, Leica (Nussloch, GER)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- Trockenschrank : UNB 400 Memmert GmbH + CoKG (Schwabach, GER)
- Waage: Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
- Wasserbad: GFL (Burgwedel, GER)

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Dako Pen: Dako Pen, Dako (Hamburg, GER)
- Pipetten: Tip One, Star lab (Hamburg, GER)

- Reagenzröhrchen: Falcon-Röhrchen, Ratiolab (Dreieich, GER)
- Tubes: Reagiergefäße Safe Seal, Sarstedt (Nürnberg, GER)

### 3.1.3 Chemikalien

- 10% Normal Goat serum ready to use, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako (Hamburg, GER)
- DAKO Envision system für Kaninchen und Maus, Dako (Hamburg, GER)
- Eosin Y, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Ethanol, Merck (Darmstadt, GER)
- HCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Paraformaldehyd 8%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Triton X, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tween 20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Vecta Mount, Permanent mounting medium, H5000, Vector (Burlingame, USA)
- Wasserstoffperoxid 30%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Lösungen für IHC**

<b>Lösungen:</b>	<b>Zusammensetzung:</b>
10x TBS	Tris 24,22g; NaCl 87,66g; ad 1L H <sub>2</sub> O
TBST	100ml 10x TBS, 1ml Tween 20, ad 1L H <sub>2</sub> O
Tris EDTA Puffer	Tris 1,21g; EDTA 0,37g; 0,5ml Tween20, ad 1L H <sub>2</sub> O

### 3.1.4 Antikörper

#### Erst-Antikörper:

- AK für IHC: NCAM: monoklonaler Antikörper aus der Maus, NCAM (123C3), Konzentration 200µg/ml, Santa Cruz (Heidelberg, GER)
- AK für IHC: β1 Integrin: monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, clone EP1041Y, Anti- Integrin beta1 (CD29), Konzentration variabel, Millipore (Massachusetts, USA)

#### Zweit-Antikörper:

- HRP, Labelled Polymer, anti-Kaninchen Antikörper, Dako (Hamburg, GER)
- HRP, Labelled Polymer, anti-Maus Antikörper, Dako (Hamburg, GER)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Gewebeaufbereitung

Direkt nach der Organentnahme wurden die Stücke 24h in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, über 24h in 70% Ethanol ausgewaschen und im Gewebeeinfiltrationsautomat durch aufsteigende Alkohol-Reihe entwässert und paraffiniert. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

### 3.2.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden gekühlt und mit dem Mikrotom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten. Die so entstandenen Schnitte wurden in einem Wasserbad (ca. 40°C) aufgefangen, um gestreckt und glatt auf

einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### **3.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)**

Eine der Standardfärbungen, in denen basische und saure Proteine angefärbt werden, ist die HE-Färbung. Dabei werden Zellkerne blauviolett und Zytoplasma und Kollagenfasern durch Eosin rosa angefärbt. Um den Grad der neuralen Invasion beurteilen zu können, wurde eine HE-Färbung der Schnitte angefertigt. Dazu inkubierten die Schnitte zur Entparaffinisierung für jeweils 10 Min. im Roticlear, um dann anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 50%) rehydriert und im Aqua dest. gewaschen zu werden. Nach dem Anfärben in Hämatoxylin für ca. 30 Sec. wurden die Schnitte nach einer kurzen Spülung in Aqua dest. für 10-15 Min. in Leitungswasser gebläut. Nach einer erneuten Spülung in Aqua dest. erfolgte das Anfärben in Eosin für 1 Minute mit anschließender Leitungswasserspülung für 10-15 Min. In einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 Min. (70%, 95%, 100%) wurden die Schnitte entfärbt, dehydriert und nach abschließendem Bad im Roticlear eingedeckelt.

### **3.2.4 Immunhistochemie**

Mittels Immunhistochemie können histologische Strukturen im Gewebe mit Hilfe eines speziellen Antikörpers angefärbt werden.

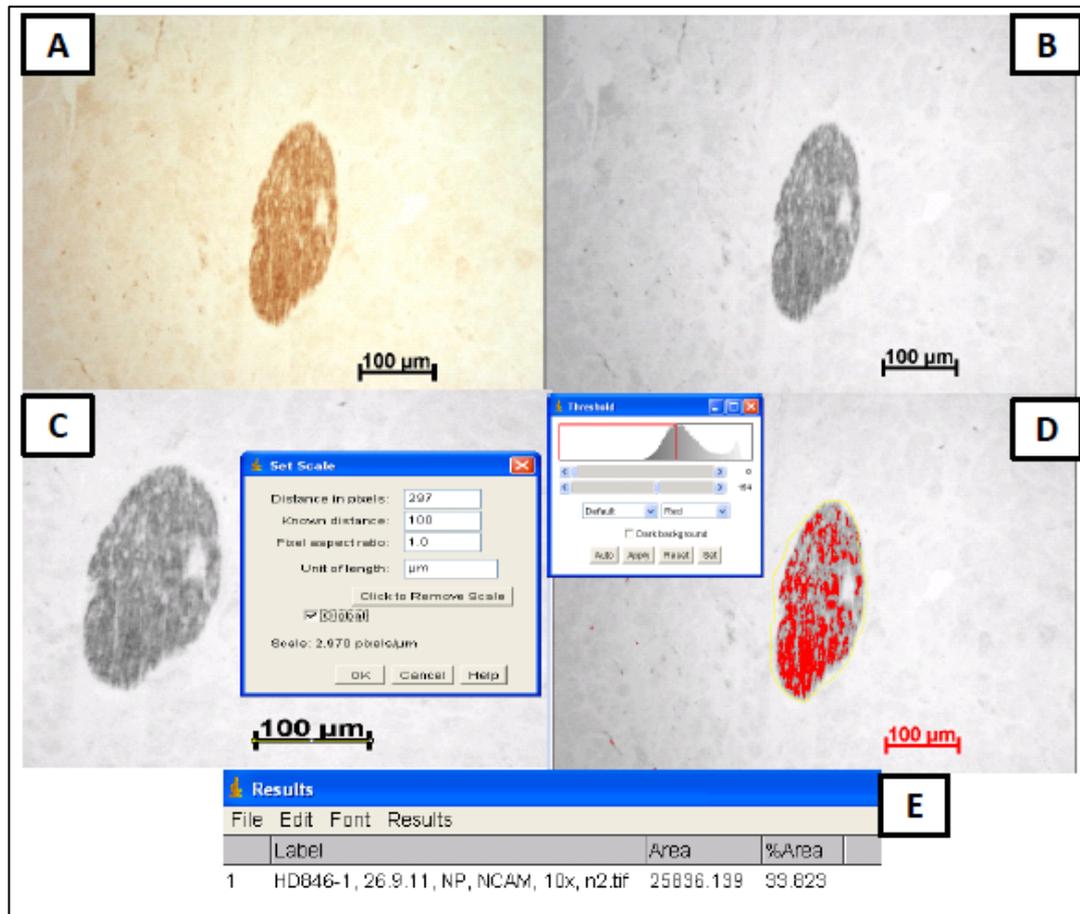
#### **3.2.4.1 Beta 1 Integrin und NCAM**

Zuerst mussten die Gewebeschnitte entparaffinisiert werden. Dazu wurden die Objektträger drei Mal für jeweils 10 Min. in Roticlear inkubiert. Anschließend erfolgte die Rehydratation mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 50%) und einem Waschgang im Aqua dest. und TBST Puffer. Um die Epitope, an denen der Antikörper später binden soll, besser freizulegen, wurden die Schnitte einer 15-minütigen Mikrowellen Behandlung unterzogen, im Falle von beta 1 Integrin und NCAM einer 25-minütigen Behandlung in Tris EDTA Puffer. Der Puffer enthält 1,21g Tris, 0,37g EDTA, 0,5ml Tween 20, wird auf einen Liter mit Millipore Wasser aufgefüllt und der pH-Wert auf 9,0 eingestellt. Um eine noch bessere Antikörperbindung zu ermöglichen, wurden die Objektträger jeweils mit 0,5% Triton X für 5 Min. behandelt. Die Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität der Zellen erfolgte durch eine Behandlung mit 10%igem Wasserstoffperoxid. Unspezifische Bindungen wurden für 1 Stunde mit

normalen 10% Ziegen Serum abgeblockt. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit dem Erst-Antikörper, dazu wurde der Anti-Integrin beta 1 Antikörper bzw. der Anti-NCAM Antikörper in TBST auf eine Verdünnung von 1:100 gelöst und auf die Schnitte aufgetragen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer gelagert. Am nächsten Tag nach einigen Waschschritten mit TBST, erfolgte die Zweit-Antikörper-Behandlung mit einem Anti-Kaninchen Antikörper bei beta 1 Integrin und einem Anti-Maus Antikörper im Falle von NCAM für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde der gebundene Antikörper mit einer DAB (Diaminobenzidin) Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurden 100µl der DAB Färbelösung pro Schnitt aufgetragen, für 8 Min. belassen und die Reaktion in Aqua dest. gestoppt. Bei der Sichtbarmachung der Färbung mit NCAM wirkte die Färbelösung für 10 Min. auf den Objektträgern ein. Zur quantitativen Analyse mittels computergestützter Auswertung wurde auf eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin bewusst verzichtet. So wurden die Objektträger im Anschluss dehydriert, was mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100%) und Roticlear erfolgte. Anschließend wurden sie eingedeckt.

#### **3.2.4.2 Auswertung**

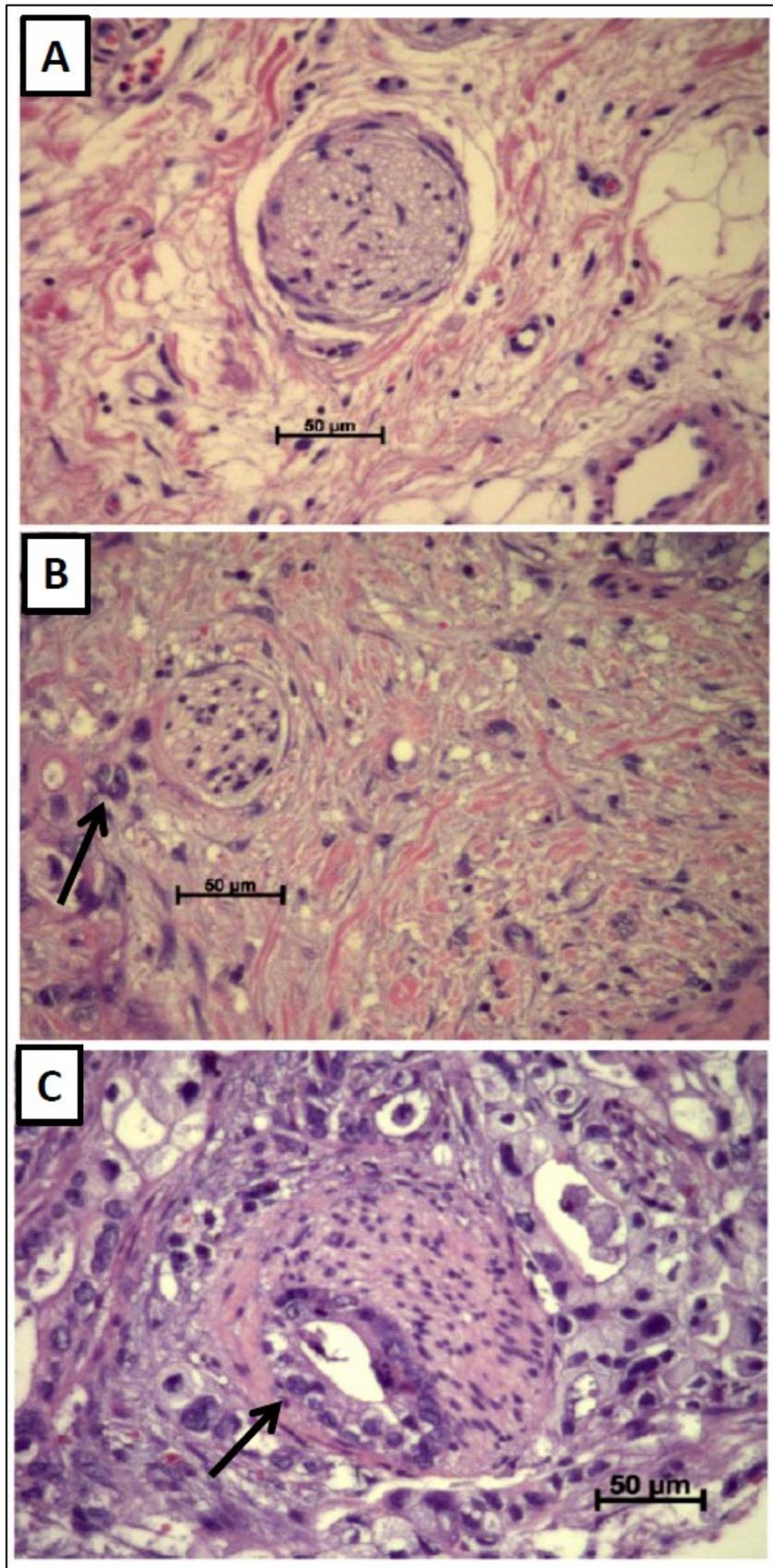
Die Immunhistochemie von beta 1 Integrin und NCAM wurde wie folgt ausgewertet: Zuerst wurden alle Nerven, die sich auf konsekutiven Schnitten einschließlich der HE-Färbung befanden, standardisiert abfotografiert. Anschließend wurde jeder einzelne Nerv mit Hilfe von Image J auf seinen Grad der Färbung, sowie seine Größe hin beurteilt. So war gewährleistet, dass man am Ende eine Aussage darüber treffen konnte, welcher Antikörper dieselben Nerven wie stark anfärbt. Außerdem wurde anhand der HE Färbung der Grad der neuralen Invasion beurteilt und ebenfalls mit der Färbintensität ins Verhältnis gesetzt. In Abbildung 10 ist zu sehen, wie man mit Hilfe der Funktion „Treshold“ die Bereiche des Nervens, die durch die Immunhistochemie braun gefärbt wurden, rot einstellt und das Programm so dann die Stärke der Färbung auf die Gesamtfläche des Nervens bezieht. Dazu wurde bei dem Bild bis auf das „Farbprodukt“ der Hintergrund herausgefiltert, sodass nur noch die immunoreaktiven Bereiche sichtbar waren (Ceyhan, Demir et al. 2009). Als letztes wurde diese immunoreaktive Fläche vermessen und auf % der Gesamtfläche umgerechnet (Abb.10).



**Abb. 10: Auswertung der Immunhistochemie mittels Image J.** A: In dieser Form entsteht das Bild am Mikroskop. B: Der Hintergrund wird herausgefiltert, nur das Farbprodukt ist noch dunkel dargestellt. C: Die „Scale bar“ wird erfasst und die Größe des Nerven kann somit bestimmt werden. D: Mit der Maus wird der Nerv nun so genau wie möglich umfahren. Mit Hilfe von „Threshold“ wird per Hand eingestellt, welche Bereiche des Nerven dunkel gefärbt sind. Die zuerst braun gefärbten Bereiche erscheinen hier nun rot E: Nach der Messung erscheint das Ergebnis, in diesem Fall sind 33,628 % des Nerven immunreaktive Fläche.

Mit dieser Methode sind alle Nerven aus PCa, sowie NP ausgewertet und in einer Excel Tabelle festgehalten worden.

Der Grad der neuralen Invasion wurde anhand der HE Färbung bestimmt. Es wurde zwischen drei Graden unterschieden. Grad 0 konnte keine Invasion vorweisen. Bei Grad 1 lag eine perineurale Invasion vor und bei Grad 2 eine intraneurale Invasion. Perineurale Invasion bedeutet, dass Karzinomzellen zwar das Perineurium berühren, dieses jedoch noch nicht zerstört haben. Intraneurale Invasion heißt, dass die Karzinomzellen schon in das Innere des Nerven vorgedrungen sind (Abb.11).



**Abb. 11:** Darstellung der graduell unterschiedlichen neuralen Invasion (Grad 0, 1 und 2). A: Grad 0, es befinden sich keine Karzinomzellen am bzw. im Nerv. B: Grad 1, Karzinomzellen berühren das Perineurium des Nervens (siehe Pfeil) C: Grad 2, im Nerveninneren befinden sich Karzinomzellen (siehe Pfeil).

Die Schmerzanalysen beruhen auf einem individuellen Schmerzscore, der von jedem Patienten vor der Operation erhoben worden ist. Die Intensität des Schmerzes wurde mit Hilfe von vier Schmerzstufen festgelegt, 0=kein Schmerz, 1=leichter Schmerz, 2=moderater Schmerz, 3=starker Schmerz. Zusätzlich wurde die Häufigkeit des auftretenden Schmerzes erfragt, 3=täglich, 2=wöchentlich, 1=monatlich. Anschließend wurde die Intensität des Schmerzes mit der Häufigkeit multipliziert und ein endgültiger Schmerzscore bestehend aus drei Gruppen ist entstanden. Die Gruppe mit Schmerzgrad I (0) hat keinerlei Schmerzen, Patienten mit Schmerzgrad II (1-3) leiden unter milden Schmerzen und Menschen mit Schmerzgrad III (4-9) müssen moderate bis starke Schmerzen ertragen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die quantitative Stärke der Nervenfärbung wurde mit dem angegebenen Schmerzscore der Patienten verglichen.

### 3.3 Software

Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft, 14.0.4760.1000, Redmond, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, version 1.44
Axio Vision	Zeiss, V 4.8.2.0, Göttingen, GER

## 4 Proteinchemische Untersuchungen

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

- Blottingkammer: PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Blottingkammer: PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Entwicklermaschine: Optimax, Protec (Oberstenfeld, GER)
- Gewebeaufschluss: TissueLyser LT, Quiagen (Hilden GER)
- Gewebeinfiltrationsautomat: Leica ASP 200 S (Solms, GER)
- Magnetrührer: MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)

- Netzgerät: Power Pack 25, Biometra (Göttingen, GER)
- Photometer: Multiskan EX, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- Roll-Mixer: Stuart Roller-SRT9 (Shaffordshire, UK)
- Scanner: Nikon LS-5000 ED (Zürich, CH)
- Shaker: Shaker DRS-12, neolab (Heidelberg, GER)
- Thermomixer: Comfort 1,5ml, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Ultraschallgerät: Bioruptor Diagenode (Denville, USA)
- Waage: Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
- Western Blot Laufkammer: Model: 45-2020-I, Rated: 0-600V, 0-200mA, class II, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Wet Blottingkammer, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Zentrifuge: Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

- 96-Well Platten: 96-well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Schüttlerbox: Original GATC Böxle, GATC Biotech AG (Konstanz, GER)
- Filterpapier: Whatman International Ltd. (Maidstone, UK)
- Pipetten: Eppendorf Pipetten Ratiolab (Dreieich, GER)
- PVDF Transfer-Membran: Millipore (Massachusetts, USA)
- Reagenzröhrchen: Falcon-Röhrchen, Ratiolab (Dreieich, GER)
- Röntgenfilm: Fuji Medical X-Ray Film (Düsseldorf, GER)
- Tubes: Reagiergefäße Safe Seal, Sarstedt (Nümbrecht, GER)
- Whatman Paper: Chromatografie Paper, Whatman (Kent, UK)

- Zellschaber: Cell Lifter, costar (Washington, USA)

#### 4.1.3 Chemikalien

- Ammoniumpersulfat, Sigma Life Scienc (St. Louis, USA)
- BCA Protein Assay: Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
- Ethanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Glycin, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- HCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Inhibitortabletten: Complete Mini EDTA free Proteinase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche (Basel, CH)
- Methanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- SDS: SDS Ultrapure, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Fermentas (St. Leon-Rot, GER)
- TEMED, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tween 20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Lösungen für Western Blot**

<b>Lösungen:</b>	<b>Zusammensetzung:</b>
RIPA für 200 ml	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl, 1mM Na <sub>2</sub> EDTA 1% NP-40 1% sodium deoxycholate pH 7,5
6x LSB für 200 ml	35 ml Tris HCl 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β-2-Mercapto pH 6,8
4x Upper Tris	1,5 M (=60,8g) Tris 0,4 % (=4 g) SDS ad 1 L H <sub>2</sub> O pH 6,8
4x Lower Tris	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4 % (= 4 g) SDS ad 1 L H <sub>2</sub> O pH 8,8
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g Glycin 144g SDS 10g ad 1 L H <sub>2</sub> O

Anodenpuffer I	Tris 36,3 g Methanol 200 ml ad 1 L H <sub>2</sub> O pH 10,4
Anodenpuffer II	Tris 3,03g Methanol 200 ml ad 1 L H <sub>2</sub> O pH 10,4
Kathodenpuffer	Tris 3,03g $\epsilon$ -Amino-capronsäure 5,24g Methanol 200 ml ad 1 L H <sub>2</sub> O pH 9,4
10x PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	Natriumchlorid 137mM Kaliumchlorid 2,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10,14 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,8 mM
5% Milch (in TBS)	Milchpulver 5 % Tween 20 0,1 % ad 1 L H <sub>2</sub> O
7,5% Milch (in PBS)	Milchpulver 7,5 % Tween 20 0,1 % ad 1 L H <sub>2</sub> O
PBST	100ml 10x PBS 1ml Tween 20

	ad 1L H <sub>2</sub> O
4 % Sammelgel (20ml)	Bidest 12,4 ml 4 x UT 5 ml AA/BIS 2,7 ml TEMED 40 µl 10 % APS 60 µl
6 % SDS Polyacrylamidgel (40 ml)	Bidest 21,6 ml 4 x LT 10 ml AA/BIS 8 ml TEMED 40 µl 10 % APS 400 µl
10 % Ammonium persulfate	100 mg Ammonium persulfate 1 ml H <sub>2</sub> O
Wet Blotting Puffer	50 ml Stock Puffer Lsg. (Nupage 20x transfer buffer) 18,5µl 20% SDS, ad 1L H <sub>2</sub> O

#### 4.1.4 Antikörper

##### Erst-Antikörper:

- AK für Western Blot: NCAM: monoklonaler Antikörper aus der Maus, NCAM (123C3), Konzentration 200µg/ml, Santa Cruz (Heidelberg, GER)
- AK für Western Blot: β1 Integrin: monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, clone EP1041Y, Anti- Integrin beta1 (CD29), Konzentration variabel, Millipore (Massachusetts, USA)
- GAPDH (6C5), monoklonaler Antikörper aus der Maus IgG, Santa Cruz Biotechnologie (Heidelberg, GER)

### Zweit-Antikörper:

- ECL Anti- Kaninchen- IgG, Horseradisch Peroxidase-Linked, Wohle antibody (from donkey); GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
- Horseradisch Peroxidase Linked, anti- Maus- IgG, Santa Cruz (Heidelberg, GER)

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Probenextraktion: Zellen**

Für die proteinchemischen Untersuchungen wurden die benötigten Zellen ab einer Zelldichte von ca. 80% in RIPA-Puffer lysiert, mit einem Zellschaber mechanisch gelöst und mit einem Ultraschall-Dissoziator homogenisiert.

### **4.2.2 Probenextraktion: Gewebe**

Die Proteinextraktion aus dem Gewebe erfolgte unter Verwendung von Stahlkugeln in 2 ml Reaktionsgefäßen im Gewebehomogenisator (Qiagen Tissue Lyser LT). Dabei wurde ein 3x3 mm messendes Gewebestück zusammen mit der Stahlkugel im RIPA-Puffer in das 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und entsprechend den Vorgaben des Herstellers homogenisiert. Nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 13 000 rpm wurde der Überstand mit dem Proteinextrakt entnommen und für die Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet.

### **4.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Dazu wurden je 5µl der zu bestimmenden Probe in eine 96-well Platte pipettiert und mit je 200µl Bicinchoninsäure vermischt. Die Lösung setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, die nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:50 gemischt wurden. Die BCA Reaktion beruht darauf, dass zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen reagieren. Diese geben zusammen mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff ab, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann. Die fertig pipettierte Platte sollte vor Licht geschützt werden und musste anschließend für 30 Min. bei 37°C inkubiert werden. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration diente eine Eichkurve, die mit definierten Konzentrationen aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt wurde. Außerdem

wurden für jede Probe zwei Ansätze pipettiert und somit eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei 562 nm an einem UV Spektrometer.

#### 4.2.4 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine auf spezielle Membranen transferiert um sie mit immunohistochemischen Methoden detektieren zu können. Dazu wird das Gesamtprotein der Zellen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine PVDF Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert (Ceyhan, Giese et al. 2006).

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 30µg Protein mit der entsprechenden Menge an Wasser und 6x LSB vorbereitet, sodass man auf ein Gesamtvolumen von 30µl kommt. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben bei 95°C für 5 Min. gekocht, im Anschluss auf Eis gestellt und zentrifugiert.

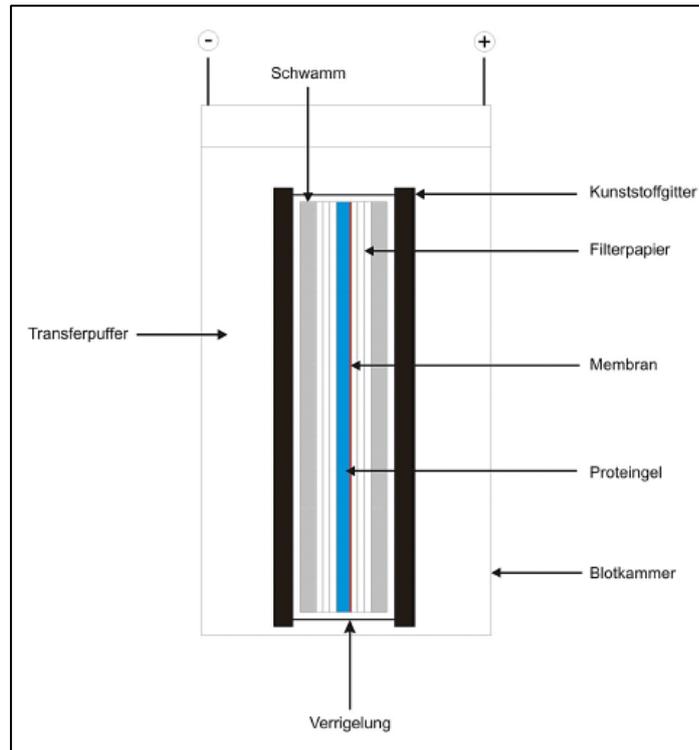
Die Gele bestanden aus zwei horizontal getrennten Schichten, dem Sammel- und dem Trenngel. Das Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel, wodurch die Proteine schneller und ohne Auftrennung in Banden wandern. Beim Übergang in das Trenngel wird die Laufgeschwindigkeit drastisch reduziert und es erfolgt die Auftrennung in einzelne Banden abhängig von der Größe der Proteine. Es wurden für die Western Blots durchweg große Gele verwendet. Dafür benötigt man 40 ml des 7,5% Trenngels und ca. 15 ml 4 % Sammelgel. Die Gele wurden jeweils nach Anweisung gemischt, danach schnell in die vorbereiteten Platten hinein pipettiert und für 15 Min. auspolymerisiert. Trenn- und Sammelgel wurden nacheinander gegossen. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde auf das Trenngel ca. 1 ml Butanol pipettiert. Das musste vor dem Gießen des Sammelgels wieder vorsichtig abgeschüttet bzw. mit einem Saugpapier aufgenommen werden. Nach dem Gießen des Sammelgels wurde der Probenkamm eingesetzt, und auch hier musste man besonders auf Luftblasen achten und diese möglichst vermeiden.

Bevor der Probenkamm aus dem Sammelgel gezogen wurde, wurden die Probenaschen auf der Platte markiert. Die Taschen wurden vorsichtig mit SDS Laufpuffer, der sich nun bereits in der Elektrophoresekammer befand, gespült. In

die erste Tasche wurden 20µl des Markers pipettiert, und die Proben folgten dann je nach Versuchsaufbau in den darauffolgenden Taschen. Das elektrische Feld wurde über Nacht mit einer Stärke von 15mA angelegt und am nächsten Tag auf ca. 75mA erhöht. Sobald die LSB Markierung den unteren Bereich der Platte erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Daraufhin folgte das Blotting. Dabei werden die aufgetrennten Proteinbanden des Gels auf eine PVDF Membran übertragen. Der Transfer erfolgte auf elektrophoretischem Weg auf die Membranoberfläche, mit der die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Durch den sandwichartigen Aufbau von getränkten Chromatografie Papieren mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer entsteht ein elektrisches Spannungsfeld, das den Transfer der Proteinbanden ermöglicht. Dafür wurde abhängig von der Größe der PVDF Membran eine entsprechende Stromstärke (Länge×Breite×0,8) für zwei Stunden angelegt. Die Gele von beta 1 Integrin wurden auf diese Art und Weise geblottet.

Aufgrund seiner Molekülgröße erwies sich das Wet-Blotting für NCAM effektiver als das Semi-Dry-Blotting. Dazu wurde der Blotting-Puffer wie oben beschrieben gemischt und in die Wet-Blotting Kammer gefüllt. Bei diesem System wird kein weiterer Puffer wie Anoden- bzw. Kathodenpuffer verwendet. Zwischen die beiden Schwämme kommen jeweils nur zwei Whatman Paper, die PVDF Membran, die vorher kurz in 70% EtOH äquilibriert und anschließend im Puffer geschwenkt wird und das Gel (Abb.12). Das Ganze wird im Anschluss unter Kühlung durch laufendes Wasser einer Spannung von 30V für 4h ausgesetzt.



**Abb. 12: Funktionsweise des Wet-Blottens.** Das Gel wird zwischen Membran, Filterpapier und Schwämme eingespannt, mit Transferpuffer umgeben und anschließend einer Spannung ausgesetzt. Besonders wichtig ist dabei, Luftblasen zu vermeiden. Quelle der Abb.: <http://www.nawipro.de/images/stories/nawipro/wet%20blot.jpg>

Nach dem Blotten wurden die PVDF Membranen für 1h in 5% Milch bei Raumtemperatur geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Dadurch, dass beta 1 Integrin und NCAM ein relativ hohes Molekulargewicht haben (beta 1 Integrin: 140-150 kDa, NCAM 140-180 kDa), konnte bei diesem Projekt die PVDF Membran nach dem Blotten jeweils auf einer Höhe von ca. 50 kDa abgeschnitten werden und das GAPDH parallel mit den anderen beiden Molekülen detektiert werden. GAPDH hat ein Molekulargewicht von 35 kDa.

#### Antikörper-Behandlung beta 1 Integrin

Der Antikörper wurde in 5% Milchpulver in Aqua dest. mit einer Verdünnung von 1:1000 vermischt und bei 4°C über Nacht auf dem Shaker belassen.

#### Antikörper-Behandlung NCAM

Mit einer Verdünnung von 1:200 wurde der Antikörper in PBST gelöst. Bei 4°C wurde die Membran auf dem Shaker über Nacht bewegt.

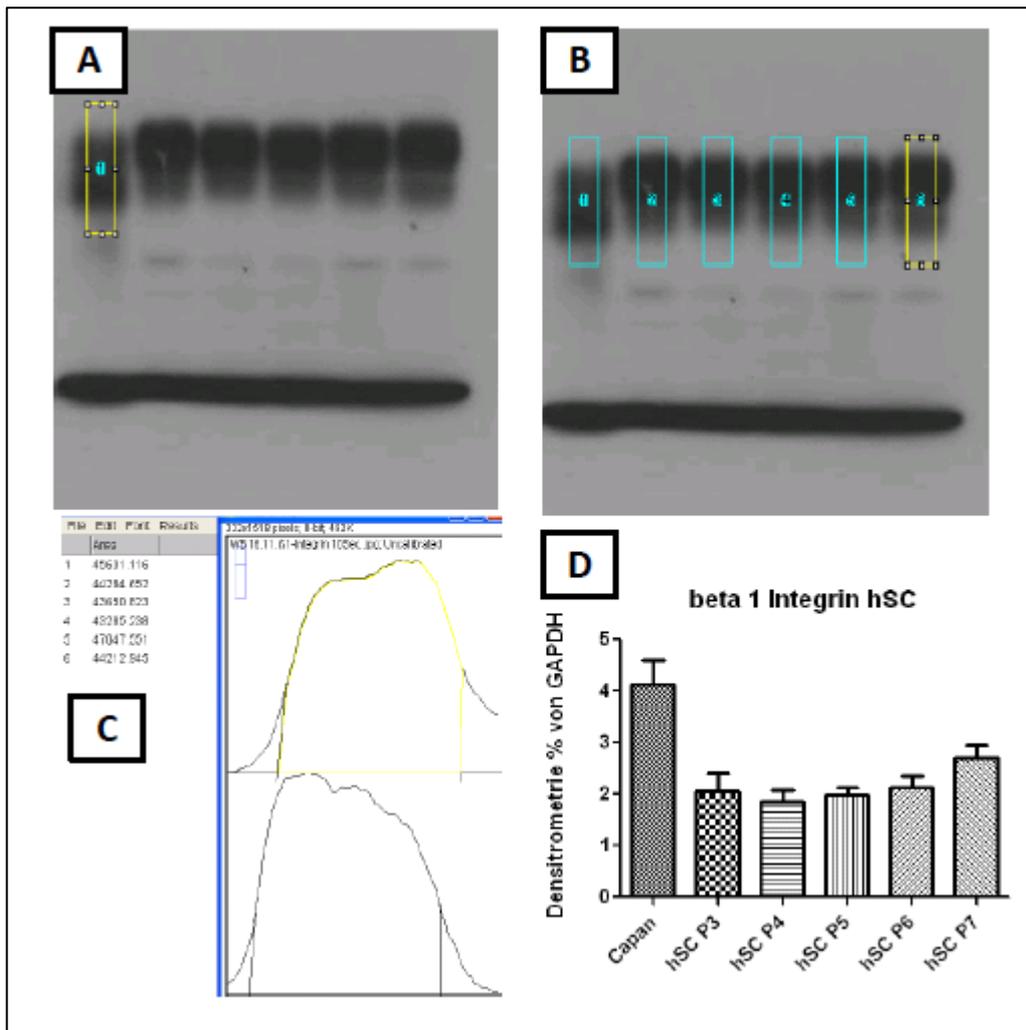
### Antikörper-Behandlung GAPDH

In PBST wird der GAPDH Antikörper 1:5000 gemischt und wie die beiden anderen Antikörper über Nacht bei 4°C gelagert.

Am folgenden Tag nach mehreren Waschschritten konnte der HRP (Meerrettich-Peroxidase) markierte Zweit-Antikörper für 1h bei Raumtemperatur auf die PVDF Membranen gegeben werden. Dies erfolgte jeweils in einer Verdünnung von 1:2000, bei beta 1 Integrin mit einem Anti-Kaninchen, bei NCAM und GAPDH mit einem Anti-Maus Antikörper. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit der Enhanced Chemiluminescence (ECL) Lösung nach Herstellerangaben behandelt, um den Komplex aus Zielprotein und Antikörpern visualisieren zu können. Die durch enzymatische Umsetzung der HRP verursachte Chemilumineszenz führt zu einer Schwärzung des Röntgenfilms. Um relative Mengen von beta 1 Integrin und NCAM in den Proben besser vergleichen zu können, wurde GAPDH als Ladungskontrolle ebenfalls nachgewiesen. Die Expositionszeit lag für beta 1 Integrin zwischen 30 Sec. und einer Minute, für NCAM zwischen drei und fünf Min.. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt und fixiert. Die Exposition und Entwicklung des Filmes fanden in einer Dunkelkammer statt.

#### **4.2.5 Auswertung Western Blot**

Die Western Blots wurden mit Hilfe von Image J ausgewertet. Dabei wurden die Proteinbanden vermessen und ins Verhältnis zu GAPDH gesetzt. Auf Abbildung 13 A kann man gut erkennen, wie im Programm ein rechteckiger Rahmen auf der ersten Bande festgesetzt wird. Es wird darauf geachtet, dass das Hauptsignal erfasst wird, die Randsignale werden mit Hilfe des Rechtecks ausgeschlossen. Das Rechteck wird dann weiter zu den anderen Banden verschoben und das Signal somit erfasst (Abb.13 B). Am Ende der Messung erscheinen Kurven anhand derer man die Fläche unter der Kurve (area under the curve) bestimmt, dazu wird am Wendepunkt der Kurve ein gerader Strich angesetzt (Abb.13 C). Die Werte der einzelnen Banden werden dann durch die entsprechenden Werte des GAPDH Signals geteilt und in eine GraphPad Tabelle eingetragen. Daraus ergibt sich die Densitometrie der Graphen in %.



**Abb. 13:** Vorgehensweise bei der Auswertung der Western Blots. A: Rahmen auf der ersten Bande wird festgesetzt, B: Rechteck wird entsprechend auf die anderen Banden verteilt, C: Die Stärke des Signals wird als Kurve angezeigt und area under curve wird somit bestimmt, D: nach Auswertung mit Graph Pad entsteht ein Densitometrie Graph.

### 4.3 Software

Office 2010 (Word, Excel)

Microsoft, 14.0.4760.1000, Redmond, USA

GraphPad Prism 5

GraphPad Software, CA, USA

ImageJ

National Institutes of Health, version 1.44

## **5 RNA-Untersuchungen**

### **5.1 Materialien**

#### **5.1.1 Geräte**

- LightCycler® 480, Roche (Basel, CH)
- Mikrowelle: Sharp (Ōsaka, Japan)
- Nanodrop: Nanodrop 2000, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- PCR Gel Schiffchen: Compact M, Biometra (Göttingen, GER)
- PCR Maschine: Mastercycler, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- Thermomixer comfort, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)
- UV Kammer: Geno Smart, VWR (Darmstadt, GER)
- Zentrifuge: Centrifuge, 5810 R, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)

#### **5.1.2 Verbrauchsmaterialien**

- Pipetten: Eppendorf Pipetten Ratiolab (Dreieich, GER)
- Pipetten: Tip One, Star lab (Hamburg, GER)
- qRT-PCR Abklebefolie: Adhäs. PCR Folie, stark klebend, Sarstedt (Nürnberg, GER)
- qRT-PCR Platten: LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche (Basel, CH)
- Tubes: Reagiergefäße Safe Seal, Sarstedt (Nürnberg, GER)

#### **5.1.3 Chemikalien und Kits**

- Agarose: Agarose Broad Range, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- cDNA Kit: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (Californien, USA)
- Chloroform, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

- dNTPs, Promega (Madison, USA)
- EDTA: Ethylendiamin Tetraessigsäure, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Ethanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Ethidium Bromide, Merck (Darmstadt, GER)
- GoTaq DNA Polymerase, Promega (Madison, USA)
- GoTaq Flexi Puffer, Promega (Madison, USA)
- Isopropanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Mastermix: LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix, Roche (Basel, CH)
- MgCl<sub>2</sub>, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Nuclease-Free water: Ambion, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- PCR Ladder: Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas (St. Leon-Rot, GER)
- RNase away: Molecular Bio Products (San Diego, USA)
- Rneasy Plus Mini Kit, Qiagen (Hilden, GER)
- Trizol Reagent, Ambion, Invitrogen (Darmstadt, GER)

#### 5.1.4 Primer

Alle Primer wurden von Sigma Life Scienc (St. Louis, USA) bezogen. Die Effizienz der Primer wurde durch dreimalige Wiederholung der Effizienzbestimmung festgelegt. Für beta 1 Integrin lag die Effizienz bei 1,79, für NCAM bei 1,83 und für Cyclophillin B bei 2,27.

beta 1 Integrin:

**RT** Beta1- CAAGAGAGCTGAAGACTATCCCA **forward**  
**255** Integrin

**RT** Beta1- TGAAGTCCGAAGTAATCCTCCT **reverse**  
**256** Integrin

NCAM:

**RT NCAM TGAGGTTCTCACCCCGCCC forward**

**259**

**RT NCAM CCCAGCCTCAGCACACTCGC reverse**

**260**

Cyclophyllin B:

**RT Cyclophilin TGTGGTGTGGCAAAGTTC forward**

**69 B**

**RT Cyclophilin GTTTATCCCGGCTGTCTGTC reverse**

**70 B**

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 RNA Extraktion**

Es wurde RNA sowohl aus Zellen wie auch aus Gewebe benötigt. Alle Arbeiten mit RNA wurden, falls nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Die üblichen Vorkehrungen zur Vermeidung von RNase-Kontamination wurden getroffen. Es wurden nur sterilisierte und RNase-frei gelieferte beziehungsweise autoklavierte Materialien verwendet. DNA wurde bei -20 °C gelagert, RNA bei –80 °C.

#### **5.2.1.1 Aus Zellen**

RNA aus Zellen wurde mit einem kombinierten Verfahren aus Trizol und dem Rneasy Plus Mini Kit gewonnen. Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat und dient zur Isolierung von totaler zellulärer RNA. Beim Rneasy Plus Mini Kit wird über ein System aus Wasch- und Trennsäulen unter Einsatz verschiedener Pufferlösungen und mehreren Zentrifugierschritten die RNA isoliert. Zur Lyse eines voll bewachsenen Zellrasens wurde 1 ml Trizol verwendet. Zuvor sollten die Zellen einmal mit PBS-Puffer Lösung gewaschen werden. Die lysierten Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Entweder wurden die Zellen nun bei -80 °C eingefroren oder gleich weiter verarbeitet. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf 1

ml Trizol und wurden bei abweichender Menge entsprechend angepasst. Nach gutem Resuspendieren der lysierten Zellen wurden 200 µl Chloroform dazu gegeben, kräftig geschüttelt und 15 Min. bei 12.000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde nach Überführung in ein neues Gefäß mit 500 µl Isopropanol versetzt und dann zur Fällung der RNA 10 Min. inkubiert. An dieser Stelle wechselte man zum RNeasy Plus Mini Kit und fuhr mit diesem Protokoll fort. 700 µl der Flüssigkeit mit gefällter RNA wurden in ein mini spin column des Kits überführt und 30 sec. lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit, die sich im unteren Teil des Reaktionsgefäßes gesammelt hatte, wurde verworfen. Die RNeasy mini-Säule adsorbiert selektiv RNA mit einer Länge von > 200 Basen an einer Silikatgel-Membran. Das beigemischte Isopropanol schafft hierfür optimale Bedingungen. Die nun folgenden Waschschriffe dienten dazu, noch haftende Kontaminationen auf der Membran zu entfernen. Deshalb wurden im Anschluss zuerst 700 µl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert, um dann für 30 sec. bei 10.000 rpm zentrifugiert zu werden. Daraufhin folgte ein zweimaliger Waschschriff mit RPE Puffer, worauf sich ebenfalls jeweils ein Zentrifugiervorgang für 30 sec. bei 10.000 rpm anschloss. Zuletzt wurde die Säule, in der die Membran enthalten ist, in ein Sammelröhrchen gegeben. Dieses wurde 2 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, um das RNA Pellet von den vorangegangenen Waschschriffen zu trocknen. Anschließend hat man 40µl RNase freies Wasser in die Mitte der Membran pipettiert und 1 Min. inkubiert, um das RNA Pellet langsam zu lösen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 1 Min. konnte die totale RNA in ein gut schließendes, steriles Tube überführt werden und die RNA am Nanodrop photometrisch vermessen werden. Die RNA Konzentration, gemessen am Nanodrop, sollte über 500 ng/µl liegen, und die Reinheit der RNA, die durch den Wert 260/280 ausgedrückt wird, sollte idealerweise bei 2,0 liegen.

#### **5.2.1.2 Aus Gewebe**

RNA aus Pankreaskarzinomgewebe wurde mit Hilfe von Trizol extrahiert. Dafür wurde sich genau an die Herstellerangaben gehalten. Auf 1 ml Trizol kam ein 50-100mg schweres Gewebestück. Dieses wurde mithilfe eines Homogenisators sehr klein gemacht. Auch die Gewebeprouben können entweder bei -80 °C eingefroren oder sofort verarbeitet werden. Zu Beginn der RNA Extraktion mit Trizol wurde die homogenisierte Probe für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurden 200 µl Chloroform zugefügt, durch ca. 15 sec Schütteln gut gemischt und für 2-3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zur Phasenseparation 15 Min. lang bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase in der sich die RNA befand, wurde vorsichtig in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß abpipettiert, die organische Phase, in der DNA und Proteine enthalten waren, wurde verworfen. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase mit 500 µl 100% Isopropanol versetzt und danach 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Um die ausgefallene RNA sichtbar zu machen, wurde das Reaktionsgefäß im Anschluss für 10 Min. bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das RNA Pellet wurde nun mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und daraufhin wieder für 5 Min. bei 7.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Pellet für ca. 5- 10 Min. an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst. Als letzten Schritt wird das Reaktionsgefäß mit der extrahierten RNA für 10 Min. auf 55-60 °C aufgeheizt. Auch nach dieser Extraktion wurden die Konzentration und die Reinheit der entstandenen RNA am Nanodrop gemessen.

### 5.2.2 Synthese von cDNA

Um die Proben später für eine PCR bzw. für eine qRT-PCR verwenden zu können, mussten diese zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Die Reverse Transkription ist eine Methode, mit der RNA durch ein virales Enzym, die reverse Transkriptase, in cDNA umgeschrieben wird. Um evtl. noch vorhandene DNA, die die Reverse Transkription beeinträchtigen könnte, zu beseitigen, wurde zu allererst ein DNase Verdau durchgeführt. Der Master Mix für eine Probe setzte sich, wie in Tabelle 4 beschrieben, zusammen.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Master Mix für DNase Verdau**

2 µg RNA
2 µl DNase
1 µl Puffer
Ad 10 µl H <sub>2</sub> O

Der DNase Verdau läuft am Lightcycler für 30 Min. bei 37°C, anschließend wurde 1 µl Stop Puffer dazu gegeben. Daraufhin wurde das Gerät für 10 Min. auf 65 °C hochgeheizt. Das dient dazu, dass die DNase denaturiert wurde und somit nicht mehr aktiv war.

Der Master Mix für die Synthese von cDNA setzt sich folgendermaßen zusammen (Tabelle 5):

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Master Mix für die cDNA Synthese**

2 µl 10x RT Puffer
0,8 µl 25x dnTP Mix
2 µl 10x RT Primer
1 µl Multi Scribe Reverse Transkriptase
4,2 µl RNase freies H <sub>2</sub> O

Das Programm für die cDNA Synthese wurde am Mastercycler einprogrammiert und verlief nach folgendem Programm (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription**

10 Min.	25 °C
2h	37 °C
5 Min.	85 °C
unendlich	4 °C

Die nun vorliegende einzelsträngige cDNA wurde sowohl als Probe für die Durchführung einer konventionellen PCR als auch der qRT-PCR eingesetzt. Eine Zwischenlagerung der cDNA in einem Volumen von 20 µl war bei -20°C über einen längeren Zeitraum möglich.

### 5.2.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt eine spezifische *in vitro* Vermehrung beliebiger DNA-Abschnitte durch Nachahmung der DNA-Replikation *in vivo*. Für diese Reaktion werden die folgenden Komponenten benötigt: Einzelsträngige DNA, Primer (Oligonukleotide, die komplementär zu den Enden der DNA-Sequenz sind, die amplifiziert werden soll), Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine DNA Polymerase. Die Polymerasekettenreaktion verläuft in drei Schritten. Zuerst wird der DNA Doppelstrang durch Erhitzen auf 92- 95 °C in Einzelstränge zerlegt, die Denaturierung. Darauf folgt ein Schritt, der Annealing genannt wird. Dabei kommt es zur Hybridisierung der Primer an komplementäre Sequenzen des einzelsträngigen DNA-Stranges bei 45-65°C (Temperatur abhängig von den eingesetzten Primern), im Fall von beta 1 Integrin und NCAM beträgt die Annealing-Temperatur 62 °C. Von den Primern ausgehend werden im dritten Schritt, der Elongation, komplementäre DNA Stränge synthetisiert. Diese drei Schritte werden bei der PCR 30-40 Mal wiederholt, und so steigt die Anzahl der entstandenen komplementären DNA Stränge exponentiell an. Die Verwendung der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, die während der Denaturierungsphase nicht zerstört wird, ermöglicht eine automatisierte Abfolge der drei Temperaturschritte. Die DNA Polymerase ist sehr empfindlich, deshalb wurde immer darauf geachtet, dass diese bei -20 °C gelagert wird und sich nur kurze Zeit außerhalb des Gefrierschranks befand. Das Gesamtvolumen eines PCR Ansatzes beträgt 50,5 µl, die Zusammensetzung ist in Tabelle 7 zu sehen.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Master Mix für die PCR**

Nuclease freies H <sub>2</sub> O	34,25 µl
GoTaq Flexi Puffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl
dNTPs	1 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,25 µl
cDNA	1 µl

Die Polymerasekettenreaktion lief im Mastercycler ab, die genauen Reaktionsbedingungen sind aus Tabelle 8 ersichtlich.

**Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der PCR**

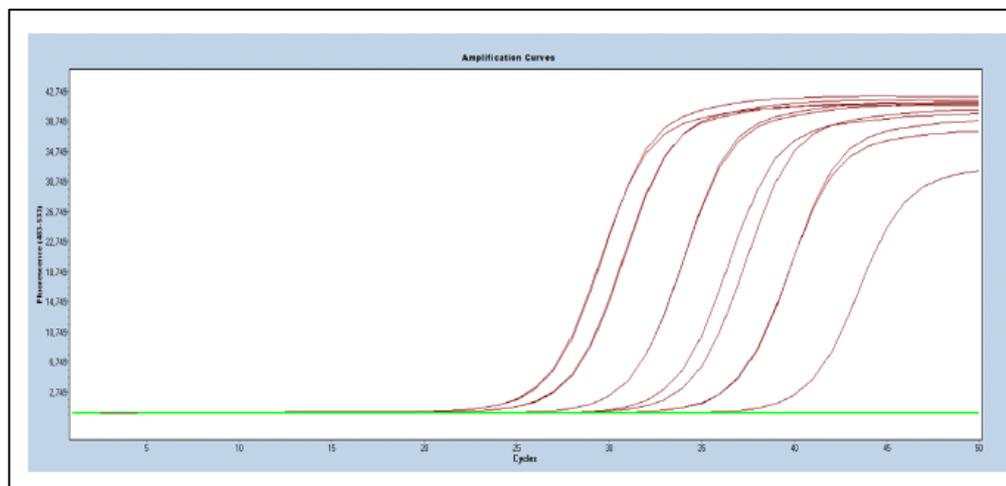
Initiale Denaturierung	1 Min., 95 °C	1 Zyklus
Denaturierung	30 sec, 95 °C	38 Zyklen
Annealing(Primer abhängig)	45 sec, 62 °C	38 Zyklen
Elongation	45 sec, 72 °C	38 Zyklen
Finale Elongation	10 Min., 72 °C	1 Zyklus
Kühlen	Unendlich, 4 °C	1 Zyklus

Bei diesem Projekt wurde die PCR vor allem dazu verwendet, die optimale Annealing-Temperatur zu ermitteln. Dies gelingt mit Hilfe eines Temperaturgradienten, dabei laufen dieselben PCR Reaktionsansätze bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen ab. Der Gradient bewegt sich zwischen 59 und 64 °C und geht in kleinen Schritten von 0,1°C nach oben. Die Temperatur, die nach der Auftrennung der Proben die stärkste Bande zeigt, wird als Annealing-Temperatur genommen.

Um das PCR Ergebnis zu visualisieren, wurden die Proben mit Hilfe von Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV Licht sichtbar gemacht. Dazu wurden 4g Agarose vermischt mit 200ml 1xTBE dreimal in der Mikrowelle aufgekocht und, unter Beachtung der Sicherheitshinweise, 10 µl Ethidium Bromide dazugegeben. Das zugegebene Ethidiumbromid lagert sich an jede doppelsträngige DNA an. Die angefärbten Produkte sind dann unter UV Licht sichtbar und können abgelichtet werden. Das flüssige Gel wurde im Anschluss in eine Kammer gegossen, ein Probenkamm vorsichtig eingesetzt und 30 Min. zum Polymerisieren stehen gelassen. Daraufhin wurden zuerst 8 µl Marker geladen, in die folgenden Kavitäten kamen die Proben, die zuvor mit 4 µl 6xDNA Loading Puffer versetzt worden sind. Das Gel wurde für 30 Min. einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Daraufhin konnte man das Gel aus der Kammer herausnehmen und unter eine UV Lampe legen, wo sich die Banden gut darstellen ließen.

### 5.2.4 Real Time PCR (qRT-PCR)

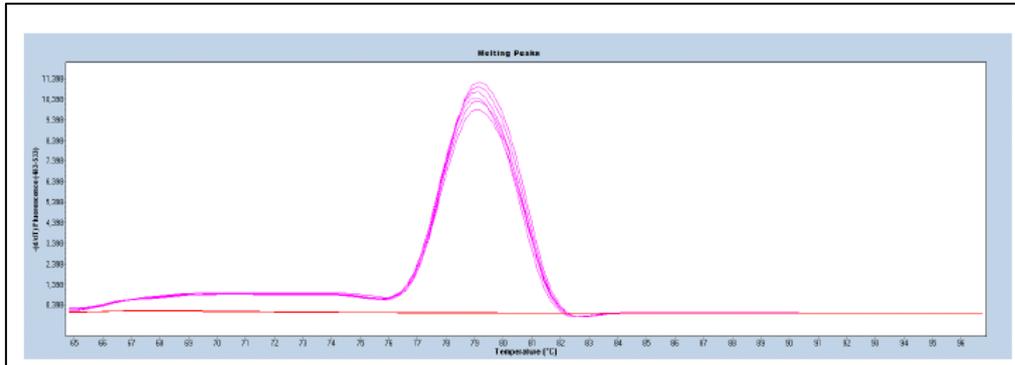
Der Vorteil der qRT-PCR im Gegensatz zur konventionellen PCR besteht darin, dass die Vermehrung des PCR Produkts durch Fluoreszenzmessung direkt während der Amplifikation analysiert wird und somit quantifiziert werden kann. Dadurch, dass Amplifikation und Detektion am selben Ort unter geschlossenen Bedingungen stattfinden, ist auch das Kontaminationsrisiko geringer. Die Probe emittiert während eines Zyklus ein Fluoreszenzsignal nur bei Anwesenheit der Zielsequenz. Die Intensität ist proportional zur Menge des gebildeten amplifizierten Produktes. Die relativen Fluoreszenz Einheiten werden an der y-Achse gegenüber der Zyklenzahl auf der x-Achse, in einem typischen Diagramm aufgetragen (Abb.14).



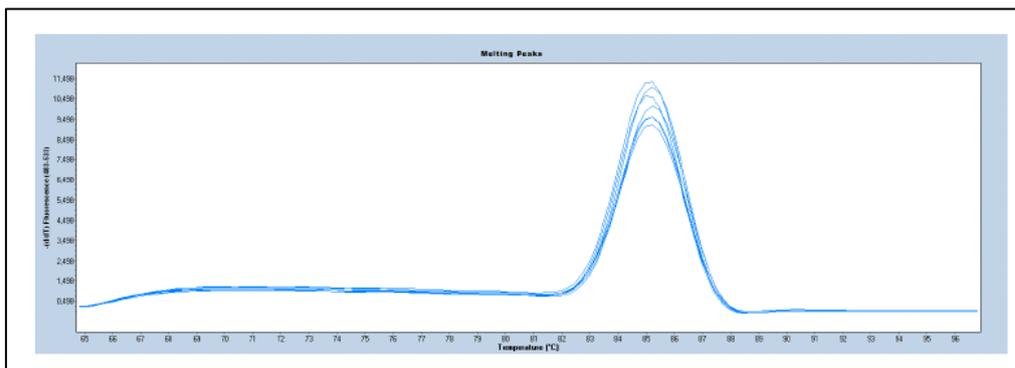
**Abb. 14:** Darstellung der Fluoreszenzzunahme im Laufe einer qRT-PCR. Auf der x- Achse ist die Zyklenzahl angegeben, auf der y-Achse die Fluoreszenzeinheiten.

Als DNA bindender Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green verwendet. Dieser bindet an der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA und fluoresziert nach Anregung etwa 1000mal stärker als der nicht gebundene Farbstoff. Die Fluoreszenz wird am Ende jedes Elongationsschrittes, nach Anlagerung des Farbstoffes an die doppelsträngige DNA gemessen. Der Farbstoff weist allerdings eine geringe Spezifität auf, da er auch an nicht spezifische PCR Produkten oder Primer-Dimere bindet. Jedes PCR Produkt hat jedoch eine spezifische Schmelzkurve und kann daran charakterisiert werden. Dazu wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur langsam schrittweise bis auf ca. 95°C erhöht, sodass die DNA-Stränge wieder denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Diese Denaturierung hat den Abfall des Fluoreszenzsignals beim Schmelzpunkt zur

Folge. Durch die Messung dieses Schmelzpunktes kann auf das vervielfältigte Produkt geschlossen werden, da Amplifikationsartefakte in der Regel bei einer niedrigeren Temperatur denaturieren. Eine charakteristische Schmelzkurve für beta 1 Integrin ist in Abbildung 15 zu sehen. Hier liegt die Schmelztemperatur bei 79 °C und bei Cyclophilin B beträgt die Schmelztemperatur 85 °C (Abb.16).



**Abb. 15:** Schmelzkurve von beta 1 Integrin. Die Schmelztemperatur liegt bei diesem Molekül bei 79 °C.



**Abb. 16:** Schmelzkurve von Cyclophilin B. Hier beträgt die Schmelztemperatur 85 °C.

Beim Pipettieren wurde als Probe die vorher umgeschriebene cDNA verwendet, die auf 5 ng/µl verdünnt wurde. Pro Primer wurden zur Sicherheit Duplicates pipettiert. In jedes Well wurden 5 µl Probe hinein pipettiert, das heißt es wurden insgesamt 25 ng Probe pro Well eingesetzt. Anschließend kam der Master Mix mit 15 µl pro Well dazu, sodass man pro Well auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gekommen ist. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** Reaktionsansatz für die qRT-PCR bezogen auf ein Well

cDNA	5 µl
LightCycler 480 SYBR Green Mastermix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Nuclease freies H <sub>2</sub> O	3 µl

Als Ladekontrolle ist bei jedem qRT-PCR Lauf Cyclophyllin B verwendet worden. Als Negativkontrollen dienten zum einen die „-PCR“, die allein aus Nuklease freiem H<sub>2</sub>O bestand, und zum anderen die „-RT“, bei der während der cDNA Synthese die Reverse Transkriptase weggelassen wurde.

Die qRT-PCR Platte wurde im Anschluss mit einer durchsichtigen Folie abgeklebt und kurz zentrifugiert. Das LightCycler Programm lief 100 Min., die Annealing-Temperatur wurde auf 62 °C eingestellt. Die genauen Reaktionsbedingungen sind Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10:** Reaktionsbedingungen der qRT-PCR

Denaturierung	5 Min., 95 °C	1 Zyklus
PCR	10 sec., 95 °C 15 sec., 62 °C (Annealing) 15 sec., 72 °C	50 Zyklen
Melting curve	5 sec., 95 °C 1 Min., 65 °C durchgehend, 97 °C	1 Zyklus
Kühlung	30 sec., 40 °C	1 Zyklus

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit der von dem Hersteller (Roche) zur Verfügung gestellten Software in Anlehnung an die Pfaffl-Methode unter Effizienz Bestimmung (Pfaffl 2001).

### 5.3 Software

Office 2010 (Word, Excel)	Microsoft, 14.0.4760.1000, Redmond, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, version 1.44
LightCycler® 480 Software	Roche, Version 1.5, Basel, CH

## 6 Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean) berechnet. Zum Vergleich nicht-parametrischer Werte zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U Test, für die Analyse von mehr als 2 Gruppen der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple Comparison Test für Mehrgruppenvergleich verwendet. Für alle verwendeten statistischen Auswertungen gilt  $p < 0,05$  als Signifikanz-Niveau, wobei  $p < 0,05$  als signifikanter und  $p < 0,01$  als hoch signifikanter Unterschied angesehen wird.

## **IV ERGEBNISSE**

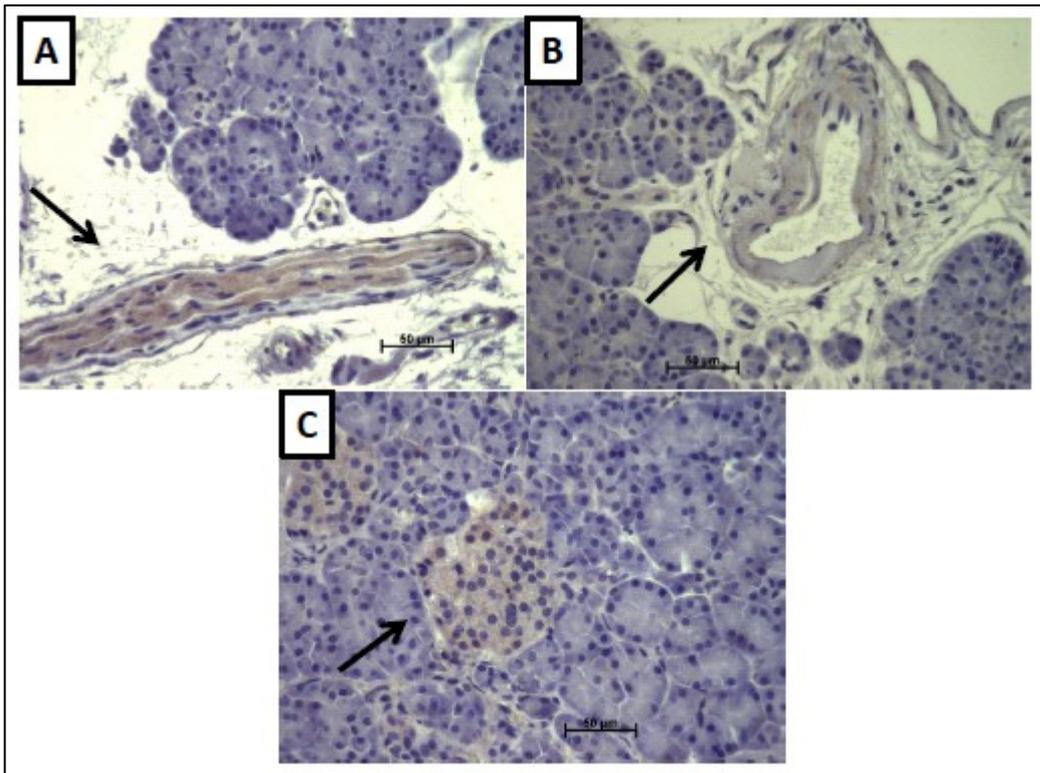
### **1 Expressionsanalyse: beta 1 Integrin und NCAM**

Zu Beginn der Arbeit wurde eine ausführliche Expressionsanalyse hinsichtlich der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle durchgeführt. Dazu wurden immunhistochemische, proteinchemische und molekularbiologische Untersuchungen angestellt. Die Fragestellung ging dahin, in wie weit beta 1 Integrin und NCAM überhaupt auf den Zellen bzw. Geweben vorhanden sind, die untersucht worden sind.

#### **1.1 Immunhistochemie**

##### Beta 1 Integrin: Normales Pankreas

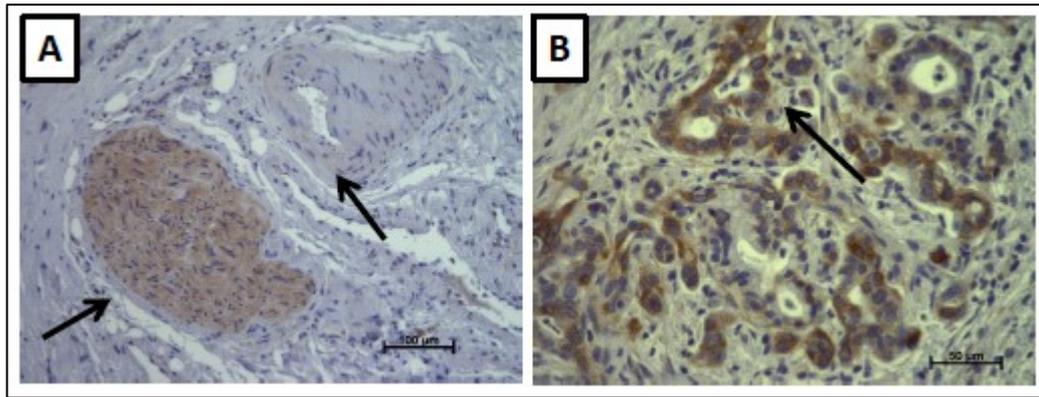
Beta 1 Integrin ist eines der häufigsten Oberflächen-/Adhäsionsmoleküle auf epithelialen Zellen. Die immunhistochemische Analyse des beta 1 Integrin Rezeptors im normalen Pankreas zeigte erstaunlicherweise ein äußerst kompartiment-spezifisches Vorkommen dieses Moleküls, welches spezifisch in intrapankreatischen Nerven, in Inselzellen und in Gefäßwänden festgestellt werden konnte (Abb.17).



**Abb. 17:** Immunoreaktion von beta 1 Integrin im normalen Pankreas (NP). A: intrapankreatische Nerven zeigten die stärkste Immunoreaktivität unter allen Strukturen im NP (siehe Pfeil). Zusätzlich war beta 1 Integrin an Gefäßwänden (B) und innerhalb der Langerhans'schen Inseln (C) zu detektieren.

#### Beta 1 Integrin: Pankreaskarzinom

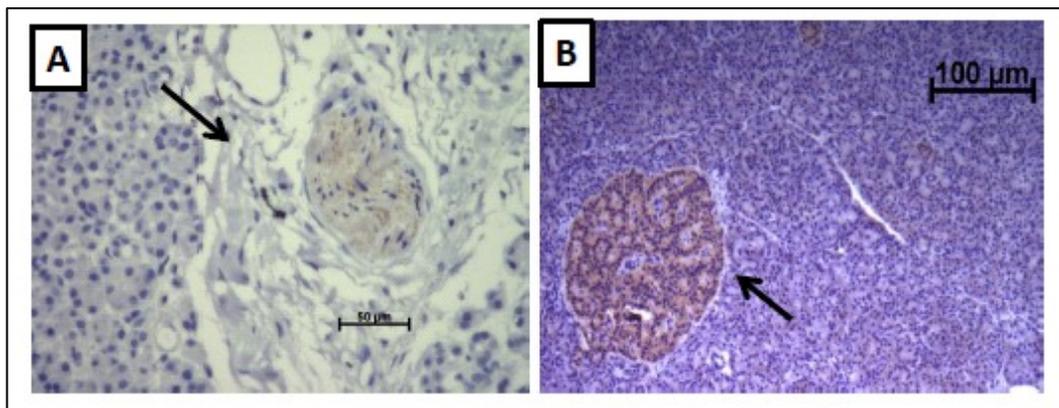
Das immunhistochemisch detektierte Verteilungsmuster des beta 1 Integrin Rezeptors im PCa wies große Ähnlichkeit zum NP auf. Auch im PCa wurde beta 1 Integrin in den Nerven und den Gefäßen (Abb.18) detektiert. Jedoch besaßen im PCa auch die Karzinomzellen eine starke Immunoreaktivität für das beta 1 Integrin (Abb.18).



**Abb. 18: Immunoreaktion von beta 1 Integrin im PCa.** A: intrapankreatische Nerven sowie Gefäßwände sind immunreaktiv für beta 1 Integrin (siehe Pfeil). B: Die Karzinomzellen wiesen die stärkste Immunoreaktivität für beta 1 Integrin im PCa auf.

#### NCAM: normales Pankreas

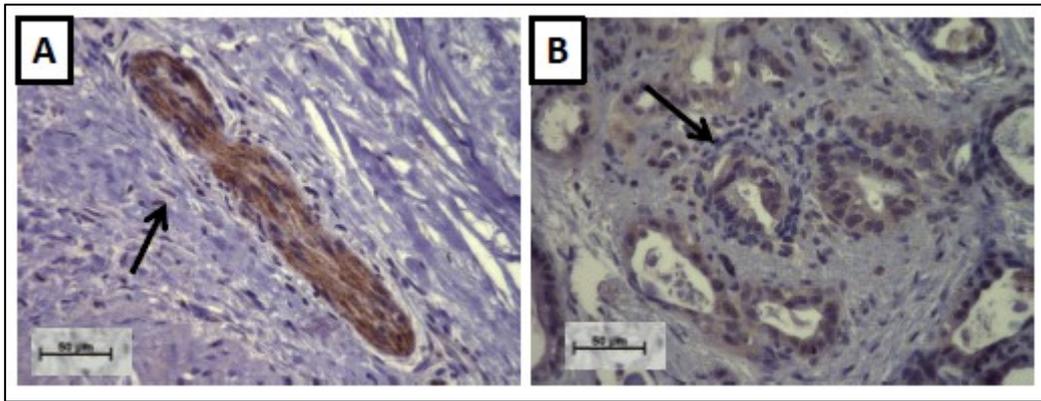
Analog zu beta 1 Integrin war die stärkste Immunoreaktivität für NCAM im NP in den Nerven und den Langerhanschen Inseln festzustellen (Abb.19).



**Abb. 19: Immunoreaktion von NCAM im normalen Pankreas (NP).** Stärkste Immunoreaktivität in den intrapankreatischen Nerven (A) und Langerhans'schen Inseln (B) (siehe Pfeil).

#### NCAM: Pankreaskarzinom

Im PCa war ähnlich zum NP das Adhäsionsmolekül NCAM am stärksten im Bereich der intrapankreatischen Nerven anzutreffen. Jedoch wiesen auch Karzinomzellen eine starke Immunoreaktivität für NCAM auf (Abb.20).



**Abb. 20: Immunoreaktion von NCAM im PCa.** A: intrapankreatisch angefärbter Nerv (siehe Pfeil). B: immunreaktive Karzinomzellen (siehe Pfeil).

## 1.2 Western Blot

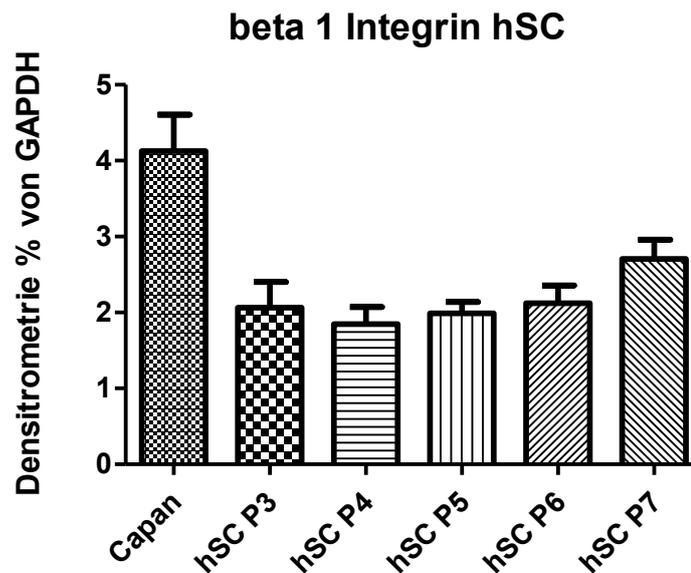
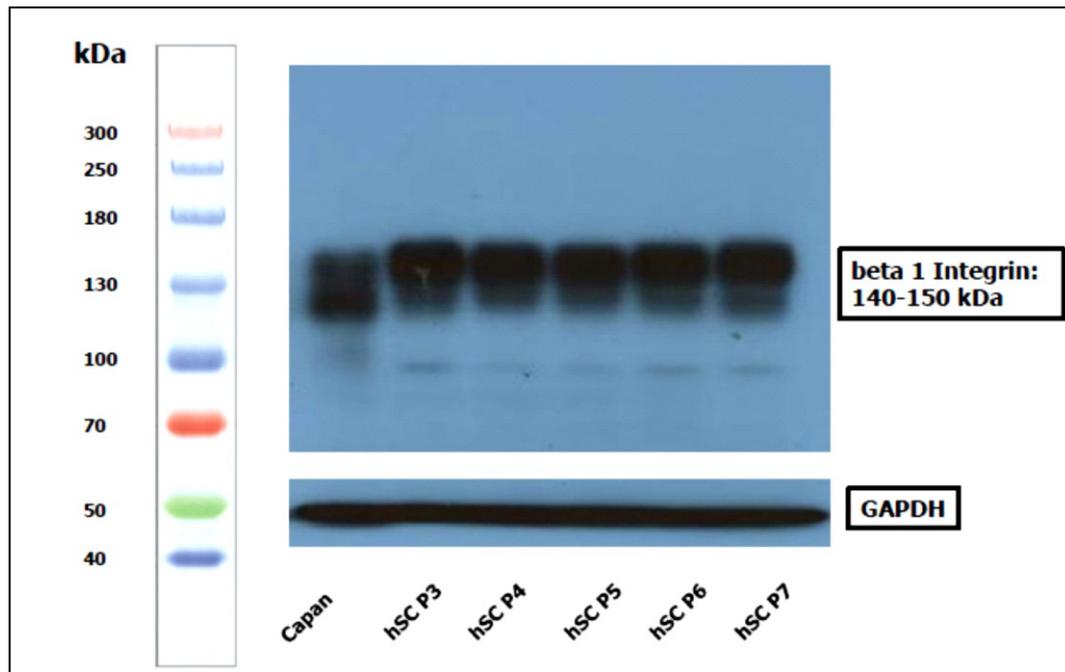
Auf proteinchemischer Ebene wurde die Expression von beta 1 Integrin und NCAM mittels Western Blot untersucht. Das Ziel war zu ermitteln, ob die beiden Adhäsionsmoleküle in hSC, Gewebe von NP bzw. PCa und in humanen Pankreaskarzinomzelllinien enthalten sind.

### 1.2.1 In Schwannschen Zellen

Zur Verifizierung der Expression der Adhäsionsmoleküle auf den hSC wurden diese in verschiedenen Passagen mittels RIPA-Puffer lysiert und mit Hilfe von Western Blot-Analysen verglichen. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Expression dieser Moleküle mit der Passage der Zellen im Zusammenhang steht. Dazu wurden die hSC-Passagen 3-7 verwendet.

#### beta 1 Integrin

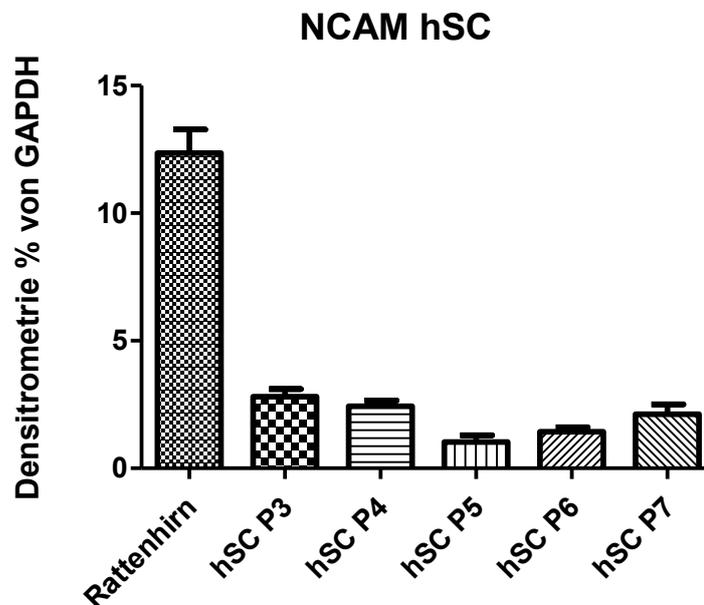
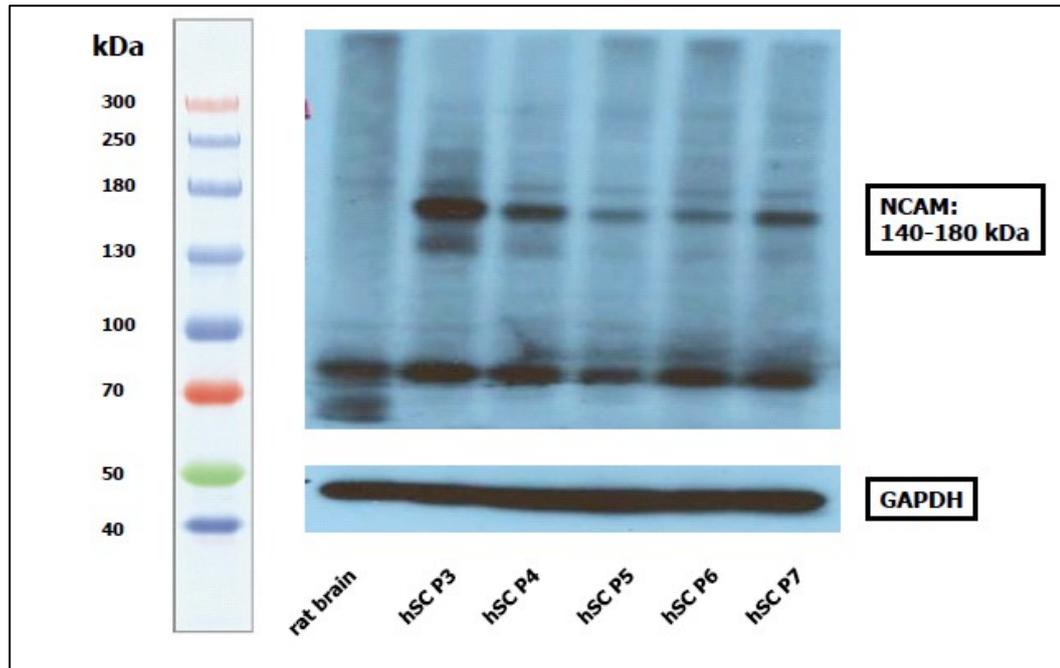
In der Western-Blot-Analyse wurde das beta 1 Integrin gemäß seiner Molekülgröße in der wissenschaftlichen Literatur (<http://www.uniprot.org/uniprot/P05556>) bei 140-150 kDa detektiert (Abb.21). Als Positivkontrolle wurde die Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 verwendet. Die densitometrische Quantifizierung der detektierten Banden zeigte, dass die Immunoreaktivität von beta 1 Integrin in den „Whole cell“-Lysaten keine Abhängigkeit von den hSC-Passagen aufwies (Capan:  $4,129 \pm 0,477\%$ , hSC P3:  $2,063 \pm 0,337\%$ , hSC P4:  $1,846 \pm 0,228\%$ , hSC P5:  $1,989 \pm 0,153\%$ , hSC P6:  $2,125 \pm 0,234\%$ , hSC P7:  $2,705 \pm 0,255\%$  der Ladekontrolle). Die Ladekontrolle wurde mittels Re-Probing gegen das Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt.



**Abb. 21: Western Blot-Analyse des beta 1 Integrin Rezeptors in hSC:** Humane Schwannsche Zellen (hSC) zeigten densitometrisch keine Unterschiede in ihrem beta-1-Integrin-Profil (Capan:  $4,129 \pm 0,477\%$ , hSC P3:  $2,063 \pm 0,337\%$ , hSC P4:  $1,846 \pm 0,228\%$ , hSC P5:  $1,989 \pm 0,153\%$ , hSC P6:  $2,125 \pm 0,234\%$ , hSC P7:  $2,705 \pm 0,255\%$  der Ladekontrolle). hSC P3-P7 stehen für die Lysate der dritten bis siebten Passage humaner Schwannzell Kulturen. Der Protein Marker stammt von der Firma Fermentas, in der Abb. wurde die Grafik des Markers aus folgender Quelle bezogen: [http://www.fermentas.com/templates/files/tiny\\_mce/family\\_images/sm185\\_fam.jpg](http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/family_images/sm185_fam.jpg).

NCAM

Die Immunblot-Analysen des NCAM Rezeptors auf den hSC zeigten, dass auch NCAM unabhängig der hSC Passagen exprimiert wird (Rattenhirn:  $12,35 \pm 0,927\%$ , hSC P3:  $2,802 \pm 0,301\%$ , hSC P4:  $2,432 \pm 0,224\%$ , hSC P5:  $1,032 \pm 0,265\%$ , hSC P6:  $1,436 \pm 0,174\%$ , hSC P7:  $2,124 \pm 0,383\%$  der Ladekontrolle) (Abb.22). Von den drei möglichen Isoformen (120, 140 und 180 kDa) wurde hauptsächlich die Isoform um 140 kDa in den hSC detektiert (<http://www.uniprot.org/uniprot/P13591>). Interessanterweise wies das als Positivkontrolle verwendete Rattenhirn lediglich die in der Literatur zwischen 70-90 kDa zitierte Isoform von NCAM auf, welche auch in den hSC anzutreffen war (Abb.22).



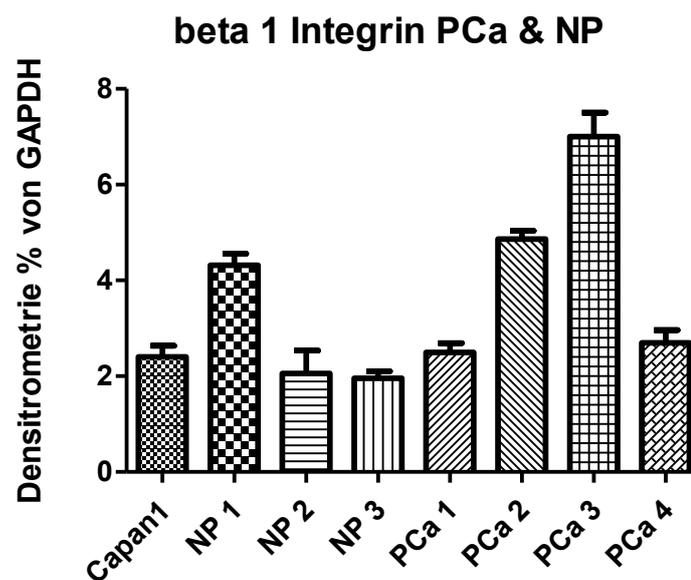
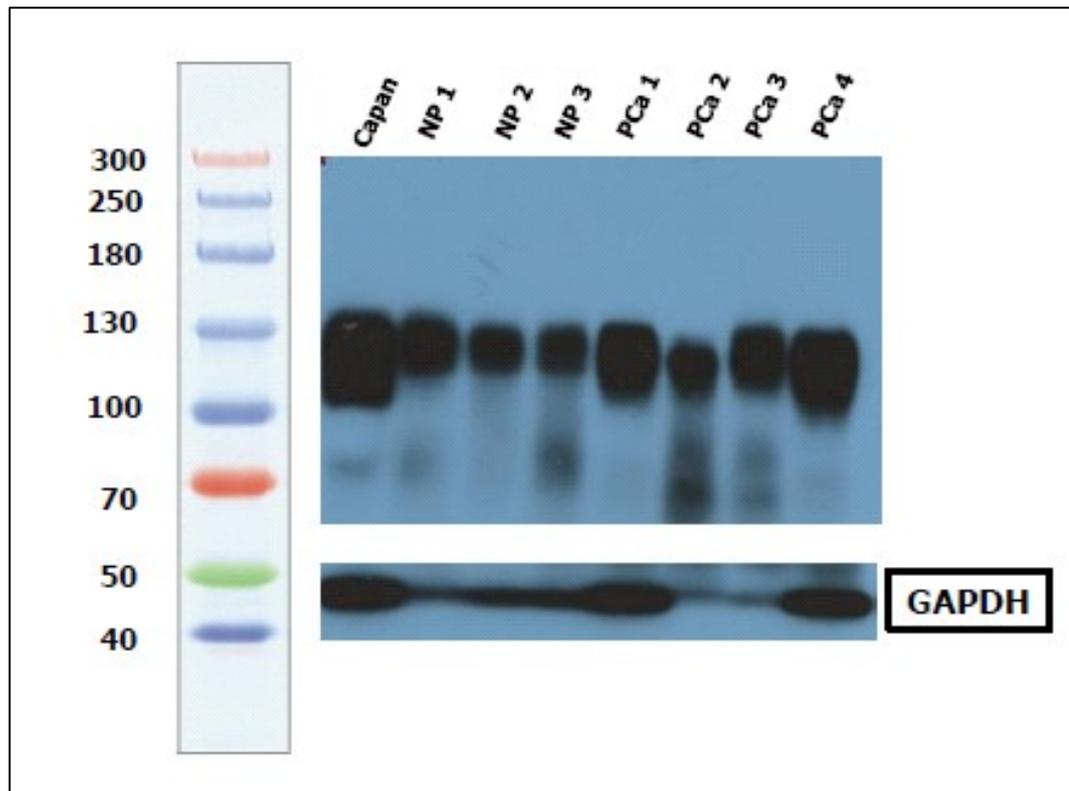
**Abb. 22: Western Blot-Analyse des NCAM Rezeptors in hSC:** Humane Schwannsche Zellen (hSC) der Passagen 3-7 zeigen in der kollektiven Densitometrie aller detektierten NCAM-Isoformen (d.h. 140 kDa und ca. 80 kDa) ähnliche Mengen an NCAM auf (Rattenhirn:  $12,35 \pm 0,927\%$ , hSC P3:  $2,802 \pm 0,301\%$ , hSC P4:  $2,432 \pm 0,224\%$ , hSC P5:  $1,032 \pm 0,265\%$ , hSC P6:  $1,436 \pm 0,174\%$ , hSC P7:  $2,124 \pm 0,383\%$  der Ladekontrolle). Das Gehirn-Lysat neugeborener Ratten (postnataler Tag 5-8) wurde als Positivkontrolle verwendet. Der Protein Marker stammt von der Firma Fermentas, in der Abb. wurde die Grafik des Markers aus folgender Quelle bezogen: [http://www.fermentas.com/templates/files/tiny\\_mce/family\\_images/sm185\\_fam.jpg](http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/family_images/sm185_fam.jpg).

### 1.2.2 Im Pankreaskarzinom- und normalen Pankreas Gewebe

Um den Nachweis der beiden Oberflächenmoleküle auf Gewebeebene zu erbringen, wurden auch im NP und im PCa Western Blot-Analysen durchgeführt.

#### beta 1 Integrin

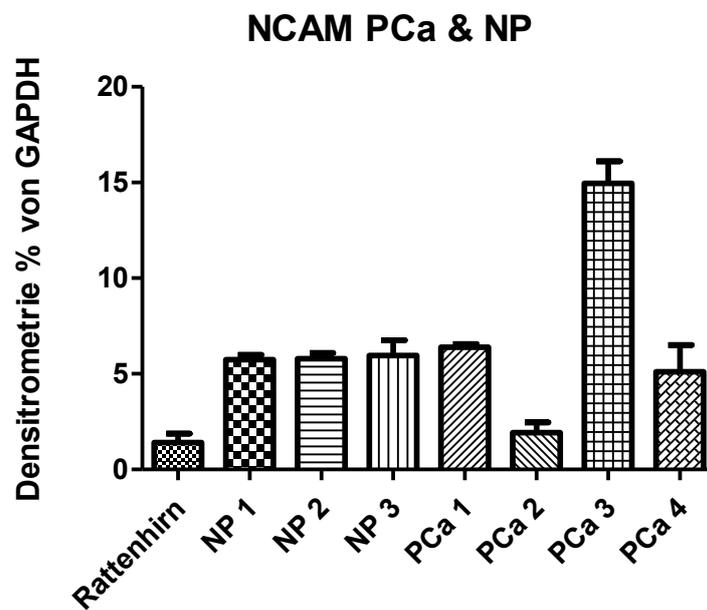
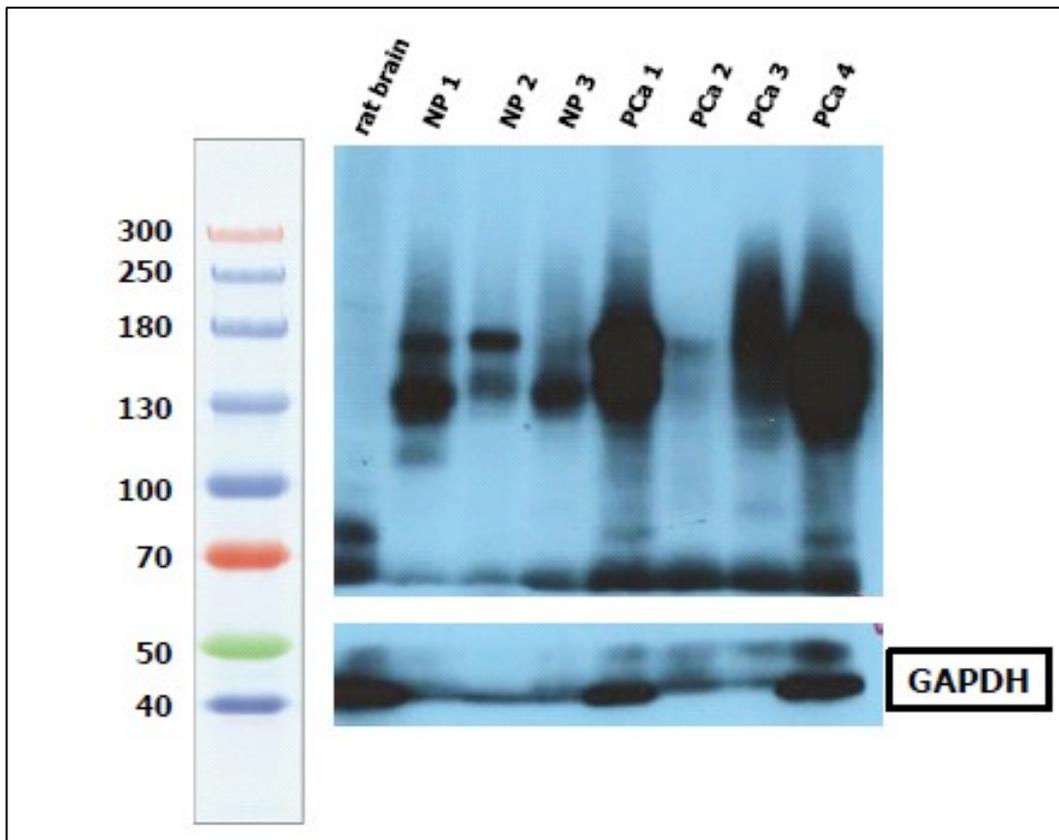
Sowohl im NP als auch im PCa ist das beta 1 Integrin Molekül in großen Mengen anzutreffen (Abb.23). Die densitometrische Analyse ergab keinen Unterschied in der Menge an beta 1 Integrin zwischen NP und PCa (Capan1: 2,403±0,232%, NP 1: 4,316±0,242%, NP 2: 2,054±0,486%, NP 3: 1,956±0,147%, PCa 1: 2,495±0,195%, PCa 2: 4,862±0,173%, PCa 3: 7,001±0,501%, PCa 4: 2,698±0,268% der Ladekontrolle).



**Abb. 23:** Western Blot-Analyse von beta 1 Integrin im PCa und NP. NP und PCa, hatten vergleichbare Mengen an beta 1 Integrin (Capan1: 2,403±0,232%, NP 1: 4,316±0,242%, NP 2: 2,054±0,486%, NP 3: 1,956±0,147%, PCa 1: 2,495±0,195%, PCa 2: 4,862±0,173%, PCa 3: 7,001±0,501%, PCa 4: 2,698±0,268% der Ladekontrolle). Capan1 wurde als Positivkontrolle verwendet.

### NCAM

NCAM kommt sowohl im Gewebe vom NP wie auch gleichermaßen im PCa vor (Rattenhirn: 1,409±0,471%, NP 1: 5,736±0,260%, NP 2: 5,787±0,308%, NP 3: 5,966±0,794%, PCa 1: 6,392±0,172%, PCa 2: 1,923±0,533%, PCa 3: 14,97±1,140%, PCa 4: 5,101±1,414% der Ladekontrolle) (Abb.24).



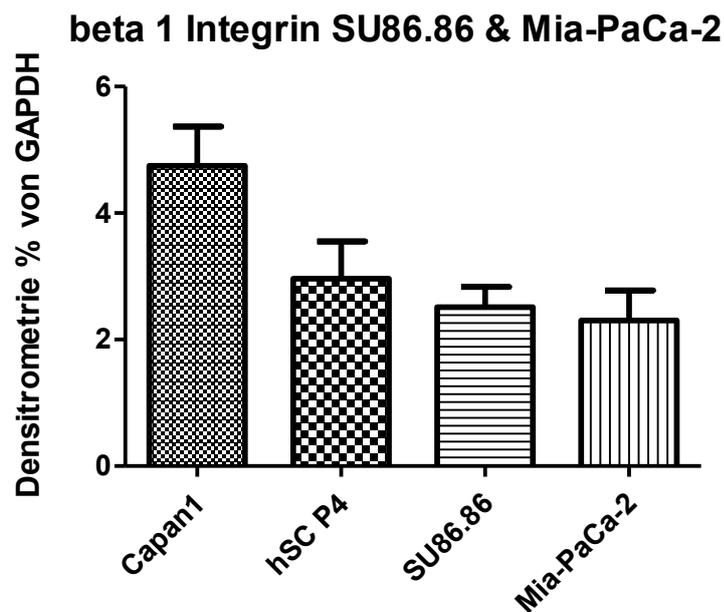
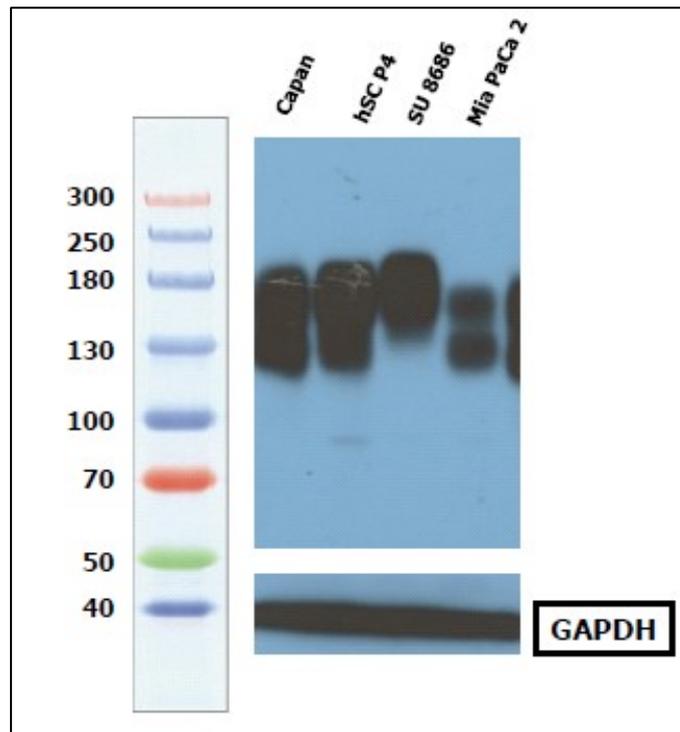
**Abb. 24:** Western Blot-Analyse von NCAM im PCa und NP. Die densitometrische Quantifizierung zeigt, dass NP und PCa sich in ihrer Menge an NCAM nicht statistisch signifikant unterscheiden (Rattenhirn: 1,409±0,471%, NP 1: 5,736±0,260%, NP 2: 5,787±0,308%, NP 3: 5,966±0,794%, PCa 1: 6,392±0,172%, PCa 2: 1,923±0,533%, PCa 3: 14,97±1,140%, PCa 4: 5,101±1,414% der Ladekontrolle).

### 1.2.3 In Karzinomzellen

Für die funktionellen Analysen wurden die Pankreaskarzinomzelllinien SU86.86 und Mia-PaCa-2 eingesetzt.

#### beta 1 Integrin

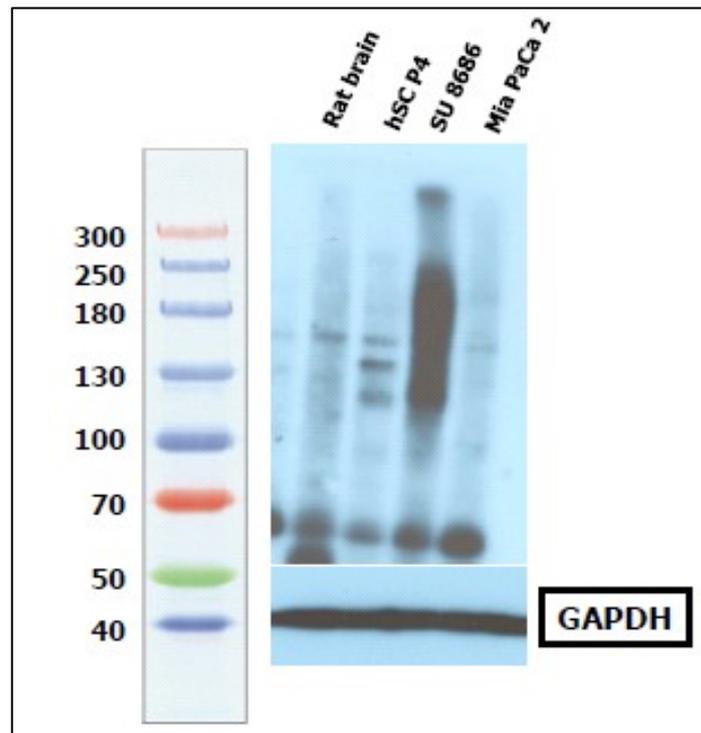
Sowohl auf SU86.86 ( $2,512 \pm 0,319\%$  der Ladekontrolle), wie auch auf Mia-PaCa-2 Zellen ( $2,305 \pm 0,472\%$  der Ladekontrolle) konnte ein starkes Signal für beta 1 Integrin identifiziert werden (Abb.25). Dieses unterschied sich densitrometrisch nicht wesentlich vom hSC Signal ( $2,963 \pm 0,589\%$  der Ladekontrolle). Die Capan-1 Zelllinie wurde dabei als Positivkontrolle verwendet ( $4,750 \pm 0,617\%$  der Ladekontrolle).



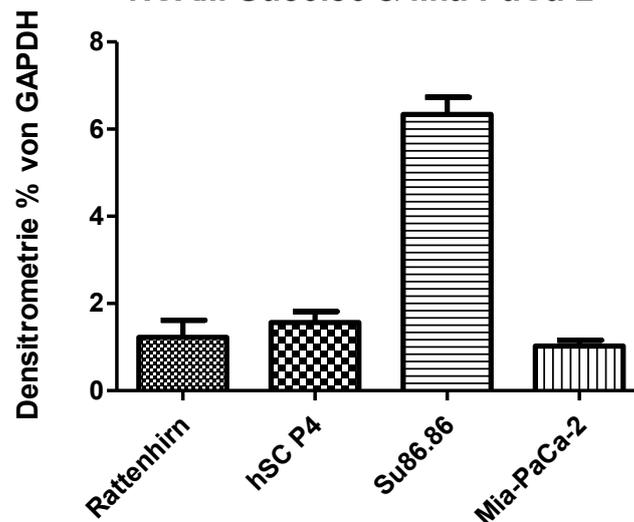
**Abb. 25:** Western Blot-Analyse von beta 1 Integrin in Karzinomzelllinien. Pankreaskarzinomzellen weisen vergleichbare Mengen an beta 1 Integrin auf (Capan1:  $4,750 \pm 0,617\%$ , hSC P4:  $2,963 \pm 0,589\%$ , SU86.86:  $2,512 \pm 0,319\%$ , Mia-PaCa-2:  $2,305 \pm 0,472\%$  der Ladekontrolle). hSC P4: humane hSC der Passagennummer 4.

NCAM

Beim Western Blot mit NCAM ist zu erkennen, dass SU86.86 ein sehr starkes Signal liefert, Mia-PaCa-2 jedoch nur die Isoform bei 70 kDa (Abb.26). Die Unterschiede der Signale werden durch die Densitometrie deutlich (Rattenhirn:  $1,225 \pm 0,393\%$ , hSC P4:  $1,563 \pm 0,251\%$ , SU86.86:  $6,338 \pm 0,395\%$ , Mia-PaCa-2:  $1,025 \pm 0,133\%$  der Ladekontrolle).



**NCAM Su86.86 & Mia-PaCa-2**



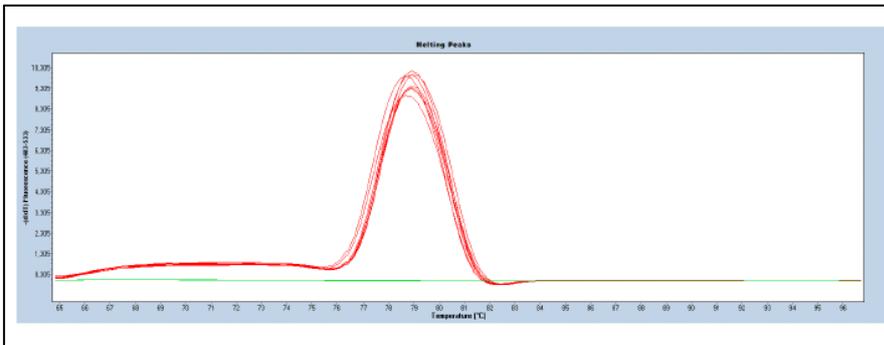
**Abb. 26: Western Blot-Analyse von NCAM in Karzinomzelllinien.** Hier zeigen sich große Mengen an NCAM in hSC P4 und deutlich stärker in SU86.86. In Mia-PaCa-2 ist nur die Isoform bei 70 kDa zu identifizieren. Rattenhirn:  $1,225 \pm 0,393\%$ , hSC P4:  $1,563 \pm 0,251\%$ , SU86.86:  $6,338 \pm 0,395\%$ , Mia-PaCa-2:  $1,025 \pm 0,133\%$  der Ladekontrolle. Die Densitometrie zeigt hier die Summe aller Signale in den verschiedenen Isoformen von NCAM an.

### 1.3 qRT-PCR

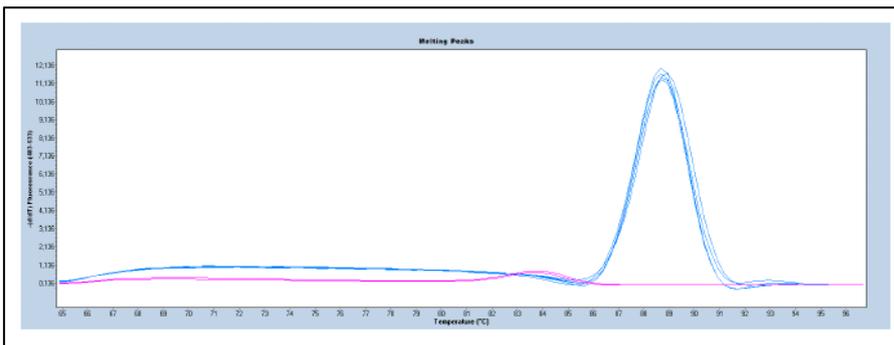
Auf mRNA Ebene ist es nicht nur möglich, die Expression eines Oberflächenmoleküls nachzuweisen, sondern man kann diese auch zusätzlich quantifizieren. Dies konnte mit der Durchführung einer qRT-PCR in hSC, im Gewebe von NP und PCa und in Karzinomzellen realisiert werden.

#### 1.3.1 In Schwannschen Zellen

Molekularbiologisch wurde versucht, die Expression von beta 1 Integrin und NCAM auf verschiedenen Passagen von hSC nachzuweisen. Dieser Versuch diente als Grundlage für die später folgenden funktionellen Analysen. Es kommt dabei bei den verschiedenen Passagen zu einer spezifischen, regelmäßigen und reproduzierbaren Schmelzkurve (Abb.27, 28). Die beiden Oberflächenmoleküle werden also jeweils auf mRNA Ebene exprimiert.



**Abb. 27:** Schmelzkurve von beta 1 Integrin in den hSC-Passagen P3, P6 und P9. Die einheitliche Form aller Schmelzkurven deutet auf ein spezifisches Amplifikationsprodukt in der qRT-PCR hin.

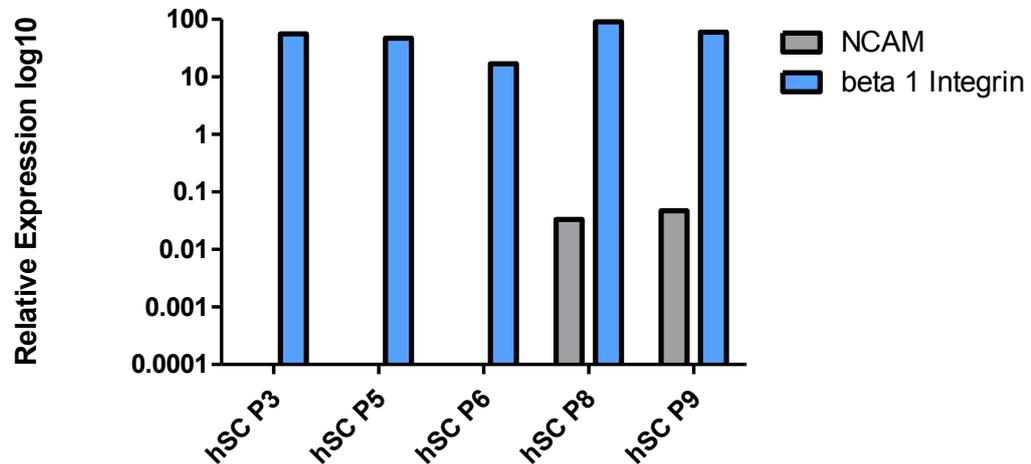


**Abb. 28:** Schmelzkurve von NCAM in den hSC Passagen P3, P6 und P9. Auch hier ist eine regelmäßige und reproduzierbare Schmelzkurve zu erkennen. Man kann dementsprechend von einem spezifischen Amplifikationsprodukt ausgehen.

Des Weiteren wurde die Menge der exprimierten Adhäsionsmoleküle in den Passagen 3, 5, 6, 8 und 9 bestimmt und zueinander ins Verhältnis gesetzt (beta 1 Integrin:  $54,19 \pm 11,89$ -fach, NCAM:  $0,016 \pm 0,010$ -fach der Ladekontrolle)

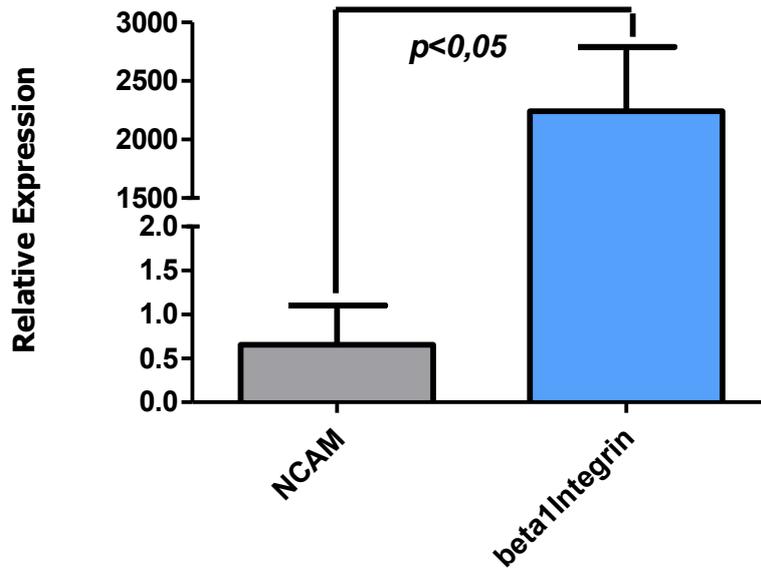
(Abb.29). So kann man in der Zusammenfassung der fünf Passagen erkennen, dass beta 1 Integrin ( $2242 \pm 547,5$ -fach) in wesentlich größeren Mengen als NCAM ( $0,653 \pm 0,447$ -fach der Ladekontrolle) vorkommt (Abb.30).

### qRT-PCR: hSC verschiedener Passagen



**Abb. 29: Relative Expression von beta 1 Integrin und NCAM in den einzelnen hSC Passagen.** In den Passagen P3, P5 und P6 kommt es zu einer alleinigen Expression von beta 1 Integrin. In den Passagen P8 und P9 konnte zusätzlich die Expression des Moleküls NCAM detektiert werden. Die beta 1 Integrin Expression ( $54,19 \pm 11,89$ -fach) ist somit deutlich stärker als die NCAM Expression ( $0,016 \pm 0,010$ -fach der Ladekontrolle).

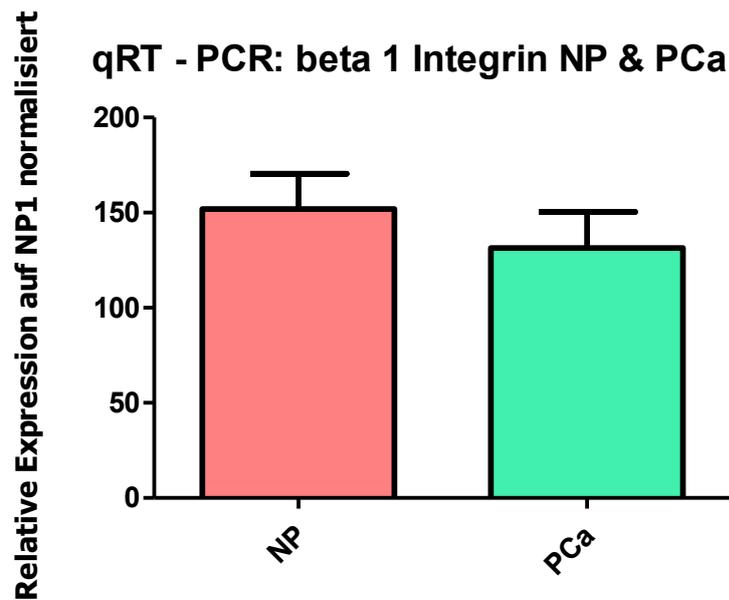
### qRT - PCR: hSC Passage 3, 5, 6, 8, 9 zusammengefasst



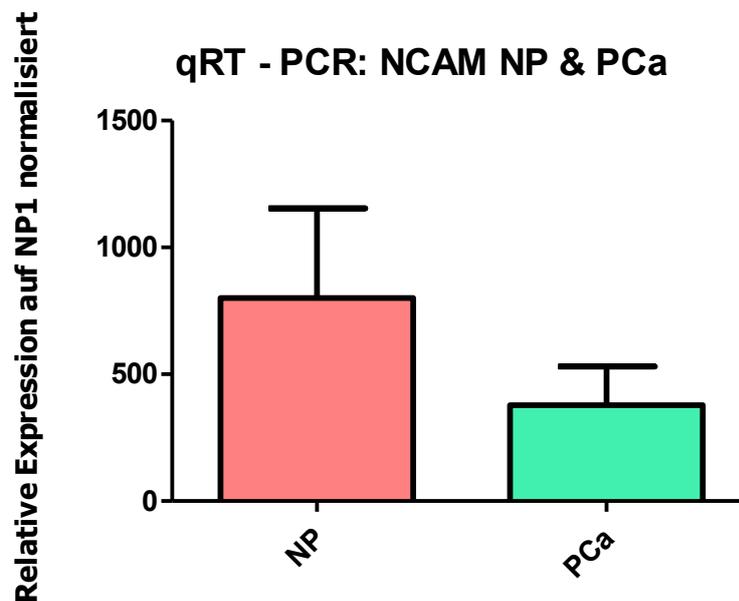
**Abb. 30:** Relative Expression der Adhäsionsmoleküle beta 1 Integrin und NCAM auf hSC. Mittels qRT-PCR wurden die Expressionsniveaus der Adhäsionsmoleküle NCAM und beta 1 Integrin in den einzelnen hSC Passagen 3, 5, 6, 8, und 9 miteinander verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den beiden Molekülen (beta 1 Integrin:  $2242 \pm 547,5$ -fach, NCAM:  $0,653 \pm 0,447$ -fach der Ladekontrolle).

#### 1.3.2 Im Pankreaskarzinom- und normalen Pankreas Gewebe

Mittels Western Blot wurde das Vorkommen von beta 1 Integrin und NCAM auf Proteinebene im NP und PCa bereits nachgewiesen. Nun wurde die Untersuchung auf mRNA Ebene komplettiert. Es kommt sowohl im NP, wie auch im PCa zu einer Expression der beiden Oberflächenmoleküle. Der Unterschied ist bei beiden nicht signifikant, dennoch besteht zumindest eine Tendenz zu einer etwas geringeren Expression der beiden Adhäsionsmoleküle im PCa (Abb.31, 32).



**Abb. 31:** Relative Expression von beta 1 Integrin im PCa und NP. Es lässt sich erkennen, dass beta 1 Integrin in geringerem Maße im PCa (PCa:131,5±18,89-fach, NP:151,9±18,42-fach der Expression im NP1) vorkommt. Der Unterschied zum NP ist allerdings nicht signifikant. Die relative Expression in der qRT-PCR wurde durch Normalisierung auf den Patienten mit dem niedrigsten Expressionsniveau (normales Pankreas 1/NP1 genannt) ausgedrückt.

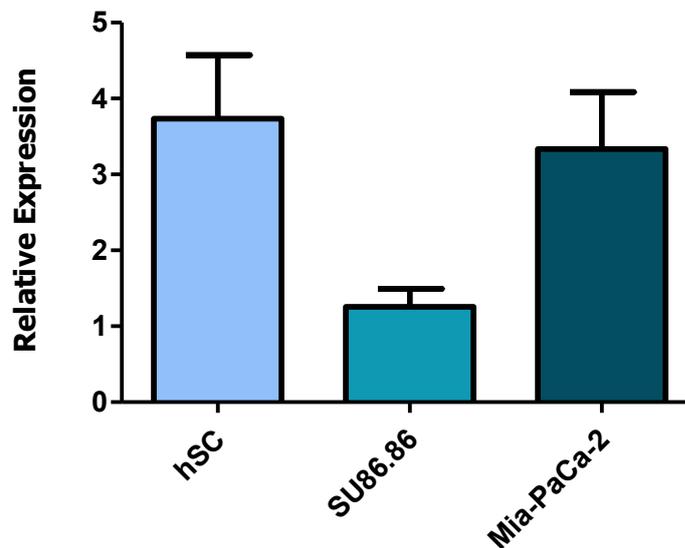


**Abb. 32:** Relative Expression von NCAM im PCa und NP. Im NP (800,4± 353,6-fach) wird NCAM in höherem Maße exprimiert als im PCa (378,3± 152,7-fach der Expression im NP1). Die relative Expression in der qRT-PCR wurde durch Normalisierung auf das Expressionsniveaus des normalen Pankreas 1 (NP1) ausgedrückt.

### 1.3.3 In Karzinomzellen

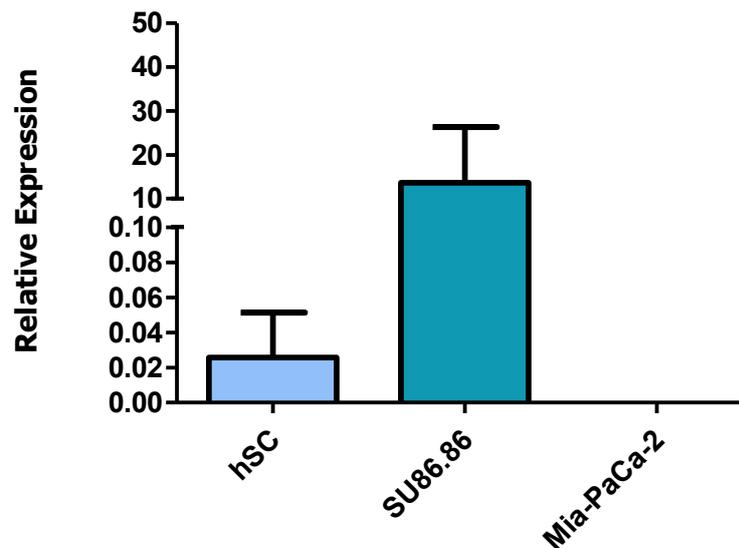
Um die funktionellen Analysen besser zu untermauern, war es notwendig, auch mittels qRT-PCR die Expression von von beta 1 Integrin und NCAM in SU86.86 und Mia-PaCa-2-Zellen nachzuweisen. Analog zu den größeren Mengen an NCAM in den SU86.86 Zellen im Vergleich zu Mia PaCa-2-Zellen in den Western Blot Analysen konnte NCAM auf RNA-Ebene nur in den SU86.86 Zellen nachgewiesen werden (hSC:  $0,026 \pm 0,026$ -fach, SU86.86:  $13,63 \pm 12,73$ -fach der Expression in LN229-Zellen) (Abb.34). Dahingegen war beta 1 Integrin in beiden Zelllinien entsprechend der Protein-Ebene auch auf mRNA Ebene vorhanden (hSC:  $3,734 \pm 0,841$ -fach, SU86.86:  $1,258 \pm 0,236$ -fach, Mia PaCa-2:  $3,333 \pm 0,751$ -fach der Expression in LN229-Zellen) (Abb 33).

#### qRT - PCR: beta 1 Integrin SU86.86 & Mia-PaCa-2



**Abb. 33:** Relative Expression von beta 1 Integrin in Karzinomzelllinien. Signal sowohl bei SU86.86, Mia-PaCa-2, als auch bei hSC (hSC:  $3,734 \pm 0,841$ -fach, SU86.86:  $1,258 \pm 0,236$ -fach, Mia PaCa-2:  $3,333 \pm 0,751$ -fach der Expression in LN229-Zellen).

### qRT - PCR: NCAM SU86.86 & Mia-PaCa-2



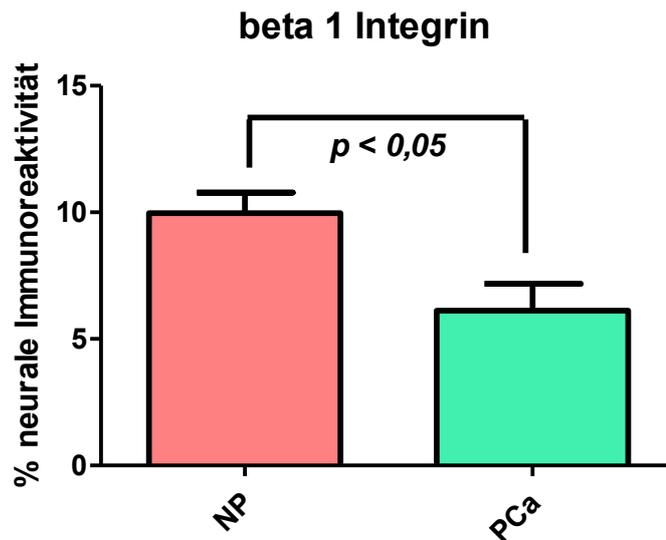
**Abb. 34: Relative Expression von NCAM in Karzinomzelllinien.** Bei NCAM wurde ein Signal auf mRNA Ebene nur bei der humanen Karzinomzelllinie SU86.86, sowie bei den hSC detektiert (hSC: 0,026± 0,026-fach, SU86.86: 13,63± 12,73-fach der Expression in LN229-Zellen). Mia-PaCa-2 hingegen zeigte keine Expression.

## 2 Korrelation der neuralen Expression der Schwannzell-Adhäsionsmoleküle mit der neuralen Invasion im PCa

In diesem Teil des Projektes ging es darum, die spezifische neurale Expression der zwei Moleküle, beta 1 Integrin und NCAM, quantitativ (Image J-basiert) in PCa Gewebe und im normalen Pankreas zu bestimmen. Bei den PCa Patienten wurden hierbei Nerven mit und ohne neurale Invasion von Karzinomzellen verglichen.

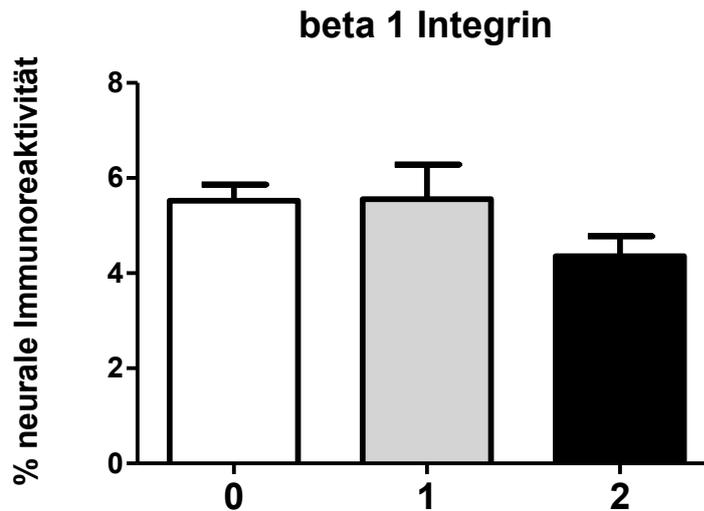
### 2.1 Beta 1 Integrin

Zuerst wurde die Stärke der Färbung an allen Nerven quantitativ-kolorimetrisch bestimmt, sowohl im PCa, als auch im NP. Bei beta 1 Integrin kam man dabei zu dem Ergebnis, dass die Stärke der Färbung im PCa ( $6,118 \pm 1,059\%$ ) statistisch signifikant zum normalen Pankreas ( $9,973 \pm 0,806\%$ ) abnahm (Abb.35).



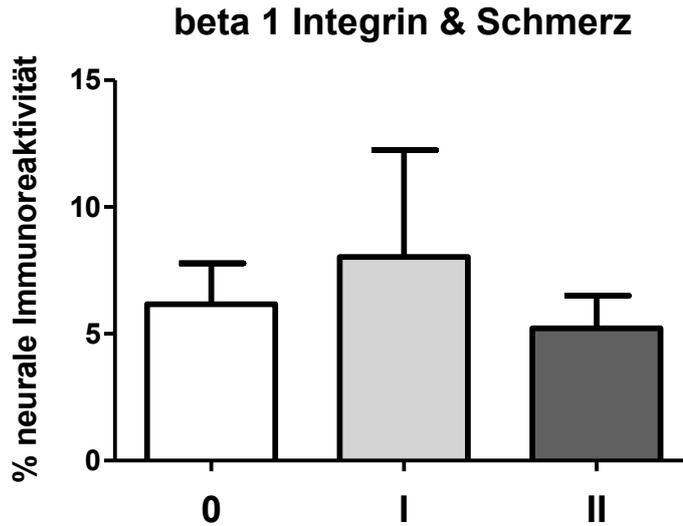
**Abb. 35:** Neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin im NP und PCa. Die quantitative Erfassung der neuralen Immunoreaktivität für beta 1 Integrin zeigt, dass es im PCa (6,118±1,059%) zu einer signifikanten Abnahme ( $p < 0.05$ ) der neuralen Immunoreaktivität für dieses Molekül im Vergleich zum NP (9,973±0,806%) kommt.

Anhand der HE-Färbung wurde bei jedem Nerven des PCa der Grad der neuralen Invasion bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Intensität der Färbung und Grad der Invasion herzustellen. Innerhalb der drei Grade der neuralen Invasion (Grad 0/ keine Invasion, 1/ perineurale Invasion, 2/ endoneurale Invasion) konnte bei beta 1 Integrin allerdings kein signifikanter Unterschied in der Immunoreaktivität festgestellt werden (Grad 0: 5,522±0,339%, Grad 1: 5,555±0,728%, Grad 2: 4,356±0,418%) (Abb.36).



**Abb. 36:** Neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin im PCa bei **graduell unterschiedlicher neuraler Karzinomzell-Invasion**. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Graden der neuralen Invasion und der neuralen Immunoreaktivität von beta 1 Integrin (Grad 0: 5,522±0,339%, Grad 1: 5,555±0,728%, Grad 2: 4,356±0,418%).

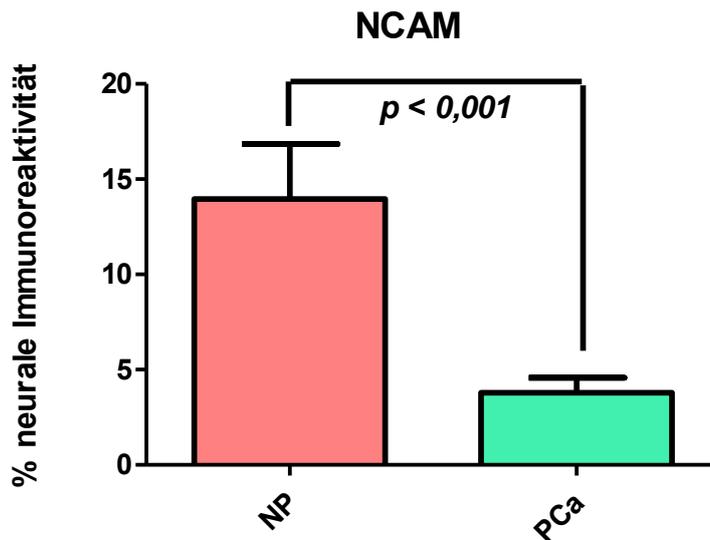
Es wurde des Weiteren die Frage gestellt, ob die neurale Immunoreaktivität dieser Adhäsionsmoleküle mit dem Ausmaß der Schmerzen der PCa-Patienten im Zusammenhang steht. Hierfür wurde die durchschnittliche neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin und NCAM mit dem Schweregrad (0, I oder II) der Schmerzen der Patienten in Zusammenhang gebracht. Jedoch zeigten sich hierbei keine Unterschiede in der durchschnittlichen neuralen Immunoreaktivität von beta 1 Integrin und NCAM in den drei unterschiedlichen Schmerzgruppen (Schmerzscore 0: 6,171±1,611%, Schmerzscore I: 8,025±4,223%, Schmerzscore II: 5,225±1,284%) (Abb.37).



**Abb. 37:** Neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin im PCa in Abhängigkeit vom Schweregrad der Schmerzempfindung (0, I, II). Die neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin steht in keinem Zusammenhang mit dem Schmerzempfinden der Patienten (Schmerzscore 0: 6,171±1,611%, Schmerzscore I: 8,025±4,223%, Schmerzscore II: 5,225±1,284%).

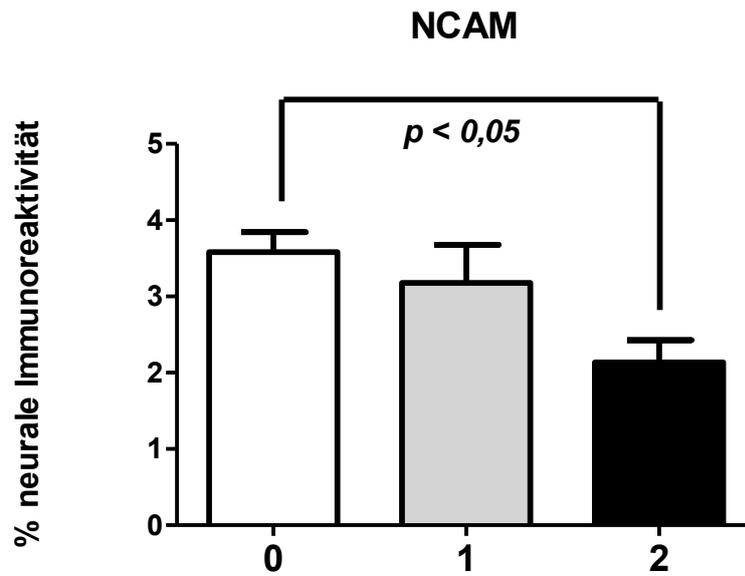
## 2.2 NCAM

Auch bei NCAM wurde die Stärke der Färbung im NP mit der Stärke der Färbung im PCa verglichen. Hierbei kam man zu dem Ergebnis, dass im PCa (3,786±0,791%) die Immunoreaktivität statistisch hochsignifikant im Vergleich zum NP (13,95±2,881%) abnimmt (Abb.38).



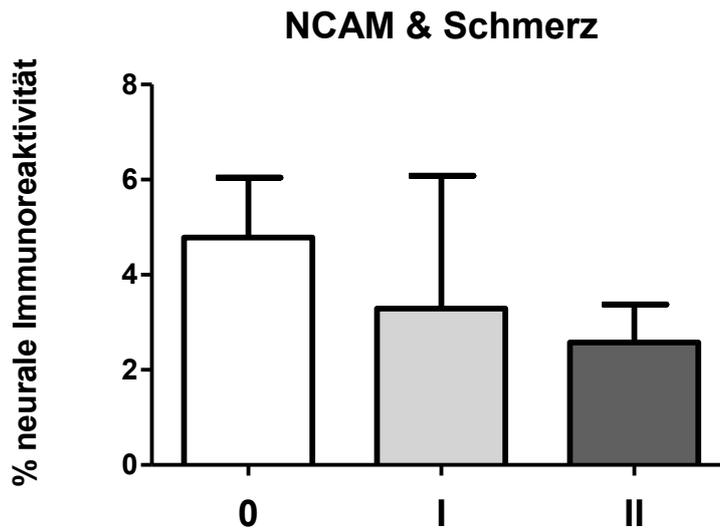
**Abb. 38:** Neurale Immunoreaktivität von NCAM im NP und PCa. Die Immunoreaktivität nimmt im PCa verglichen mit der im NP statistisch signifikant ab (NP: 13,95±2,881%, PCa: 3,786±0,791%).

Des Weiteren wurde hinterfragt, ob die Abnahme der Immunoreaktivität bei NCAM nur im PCa stattfindet oder evtl. auch in innerhalb der drei Grade der neuralen Invasion. Hierbei war zu erkennen, dass Nerven, die nicht von neuraler Invasion betroffen waren (Grad 0) signifikant stärker gefärbt waren, als Nerven, die einen Invasionsgrad von 2 aufwiesen (Grad 0:  $3,581 \pm 0,262\%$ , Grad 1:  $3,178 \pm 0,498\%$ , Grad 2:  $2,134 \pm 0,291\%$ ) (Abb.39).



**Abb. 39:** Neurale Immunoreaktivität von NCAM im PCa bei graduell unterschiedlicher neuraler Karzinomzell-Invasion. Nerven, die eine neurale Invasion von Grad 2 aufwiesen, waren signifikant weniger gefärbt als Nerven von Grad 0 (Grad 0:  $3,581 \pm 0,262\%$ , Grad 1:  $3,178 \pm 0,498\%$ , Grad 2:  $2,134 \pm 0,291\%$ ).

Ein Zusammenhang zwischen der Schmerzwahrnehmung und NCAM-Veränderungen sind im PCa ebenfalls nicht vorhanden. Die Stärke der Immunoreaktivität zeigte zwischen den drei Schmerzscores keine signifikanten Unterschiede, obwohl bei Grad I und II eine Abnahme der Färbung zu beobachten war (Schmerzscores 0:  $4,782 \pm 1,260\%$ , Schmerzscores I:  $3,289 \pm 2,792\%$ , Schmerzscores II:  $2,576 \pm 0,802\%$ ) (Abb.40).



**Abb. 40:** Neurale Immunoreaktivität von NCAM im PCa in Abhängigkeit vom Schweregrad der Schmerzempfindung (0, I, II). Neuroimmunoreaktivität nimmt bei Grad I und II ab; die Abnahme ist allerdings statistisch nicht signifikant (Schmerzscore 0: 4,782±1,260%, Schmerzscore I: 3,289±2,792%, Schmerzscore II: 2,576±0,802%).

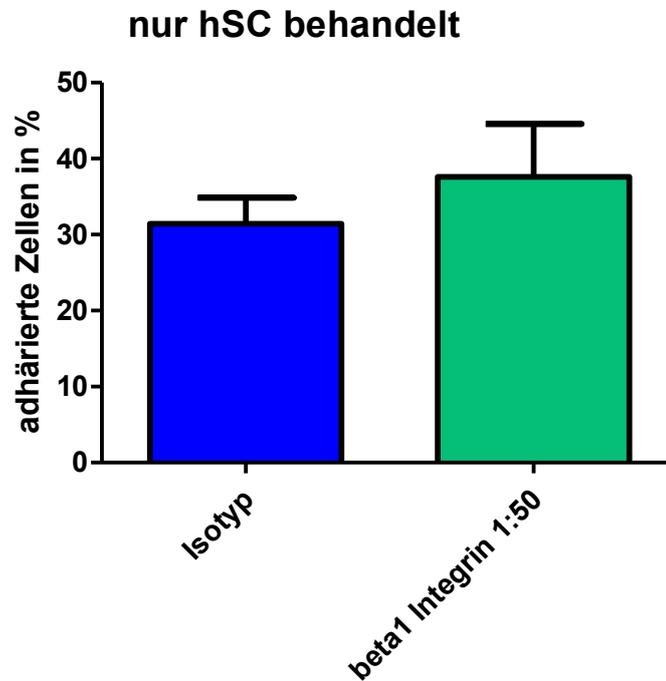
### 3 Rolle von beta 1 Integrin und NCAM bei der Zell-Zell-Adhäsion zwischen Schwannschen Zellen und Karzinomzellen

Um die potentielle Zell-Zell-Adhäsion zwischen hSC und Karzinomzellen näher zu untersuchen bzw. zu charakterisieren, wurden standardisierte Zell-Adhäsionsassays durchgeführt (Issa, Nummer et al. 2009). Ziel war es herauszufinden, in wieweit die Behandlung der hSC bzw. der Karzinomzellen mit einem blockierenden Antikörper für beta 1 Integrin und NCAM die Adhäsion der beiden Zellarten beeinflusst.

#### 3.1 Beta 1 Integrin: Schwannsche Zellen- SU86.86

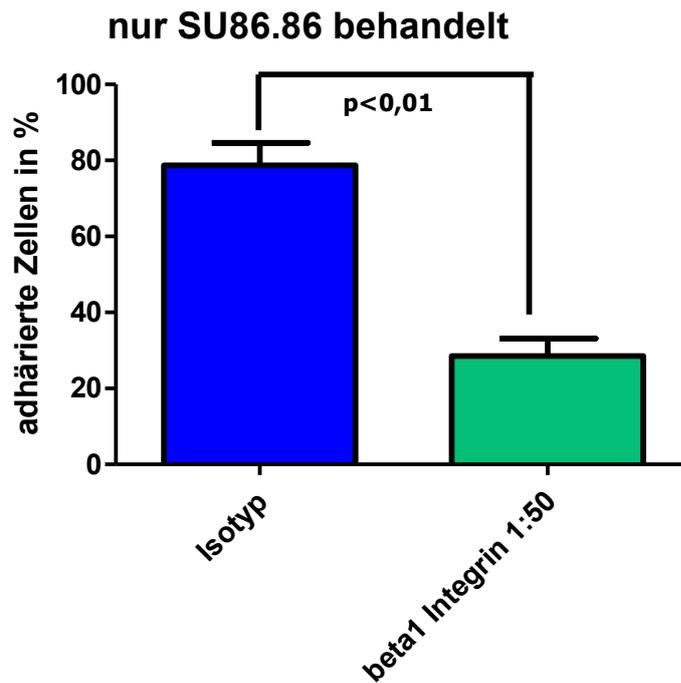
Zur Untersuchung der Rolle von beta 1 Integrin in der Zell-Zell-Adhäsion zwischen Pankreaskarzinomzellen und hSC wurden drei Ansätze verwendet. Mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers wurde beta 1 Integrin 1) in hSC, 2) Pankreaskarzinomzellen, 3) und in beiden, sowohl hSC als auch Pankreaskarzinomzellen blockiert. Anschließend wurde mittels dem etablierten Adhäsionsassay die prozentuelle Adhäsion von Pankreaskarzinomzellen an hSC quantifiziert. Die Blockade von beta 1 Integrin auf den hSC führte zu keinem

Unterschied in der prozentuellen Adhäsion von Pankreaskarzinomzellen an die hSC (Isotyp:  $31,43 \pm 3,424\%$ , hSC beta 1 Integrin- Blockade:  $37,62 \pm 6,951\%$ ) (Abb.41).



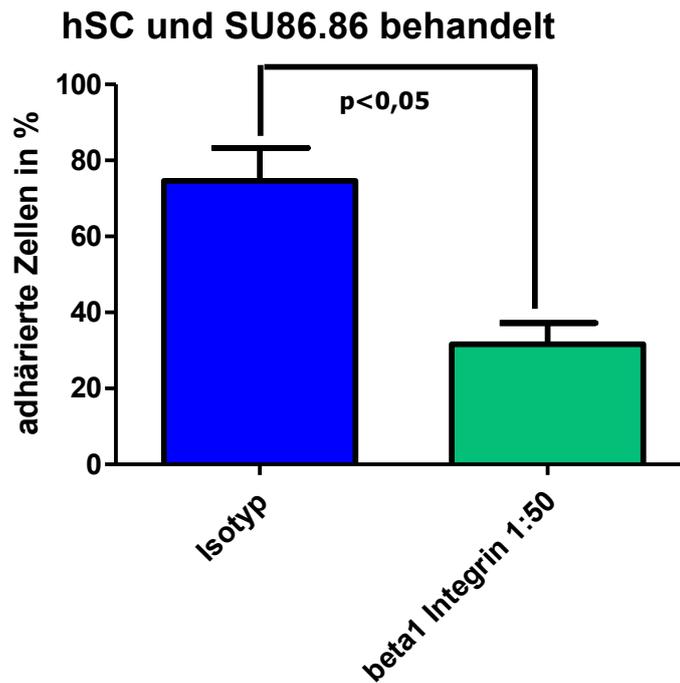
**Abb. 41: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** nur hSC werden mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt. Kein Unterschied in der Adhäsion zwischen beta 1 Integrin und Isotyp behandelten hSC (Isotyp:  $31,43 \pm 3,424\%$ , hSC beta 1 Integrin- Blockade:  $37,62 \pm 6,951\%$ ). 1:50 bedeutet 50-fache Verdünnung des beta 1 Integrin Antikörpers.

Dagegen zeigte sich im zweiten Ansatz, in dem beta 1 Integrin in Pankreaskarzinomzellen blockiert wurde, eine deutlich signifikante Abnahme der prozentuellen Adhäsion der Pankreaskarzinomzellen an die hSC (Isotyp:  $78,71 \pm 5,936\%$ , SU86.86 beta 1 Integrin Blockade:  $28,51 \pm 4,579\%$ ) (Abb.42).



**Abb. 42: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** nur SU86.86 Zellen werden mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt. Es adhärten statistisch hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) weniger SU86.86 Zellen, die vorher mit dem beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt worden sind (Isotyp:  $78,71 \pm 5,936\%$ , SU86.86 beta 1 Integrin Blockade:  $28,51 \pm 4,579\%$ ).

Im dritten Schritt wurden beide Zellarten, hSC und SU86.86 mit dem Antikörper vorbehandelt. Dabei kam es ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Reduktion der adhärten Zellen (Isotyp:  $74,60 \pm 8,723\%$ , hSC und SU86.86 beta 1 Integrin Blockade:  $31,60 \pm 5,579\%$ ) (Abb.43).

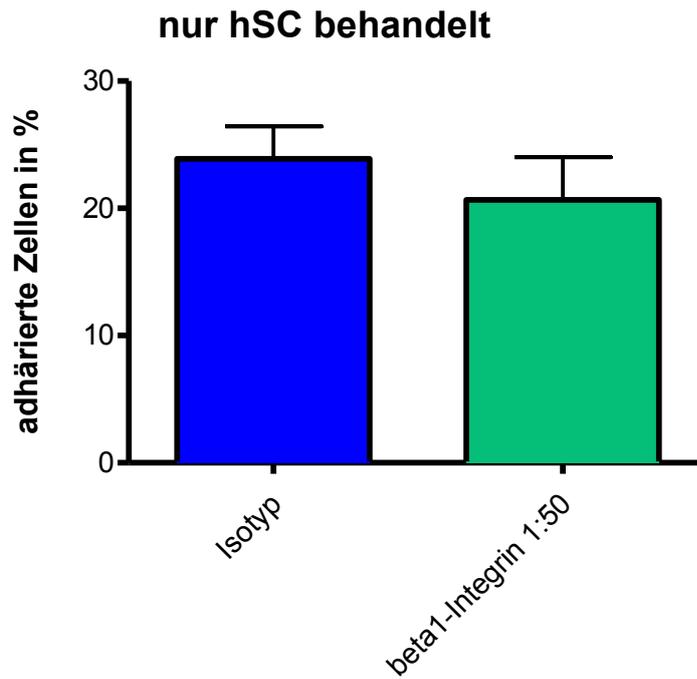


**Abb. 43:** Adhäsion von PCa-Zellen an hSC: sowohl hSC, als auch SU86.86 Zellen werden mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt. In diesem Versuchsansatz kommt es ebenfalls zu einer Reduktion der adhärenen Karzinomzellen an die hSC (Isotyp: 74,60±8,723%, hSC und SU86.86 beta 1 Integrin Blockade: 31,60±5,579%).

### 3.2 Beta 1 Integrin: Schwannsche Zellen-Mia-PaCa-2

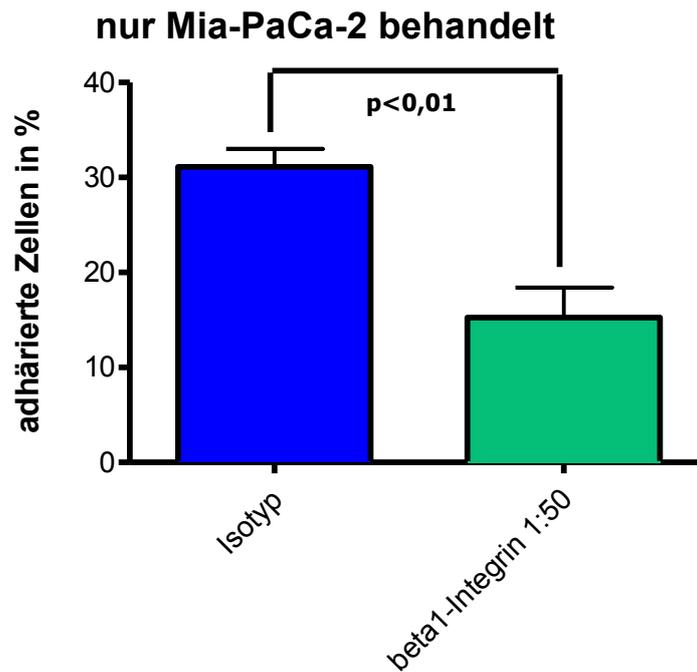
Derselbe Adhäsionsassay wurde dann zusätzlich mit der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-PaCa-2 durchgeführt, um den beobachteten Effekt an einer weiteren Pankreaskarzinomzelllinie zu untersuchen.

Auch hier wurden zuerst nur die hSC mit dem beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt. Die Beobachtung von Su86.86 wurde bestätigt und die Anzahl der adhärenen Mia-PaCa-2 Zellen veränderten sich im direkten Vergleich mit den Mia-PaCa-2 Zellen, die mit dem Isotyp behandelt wurden, nicht (Isotyp: 23,88±2,560%, hSC beta 1 Integrin Blockade: 20,67±3,335%) (Abb.44).



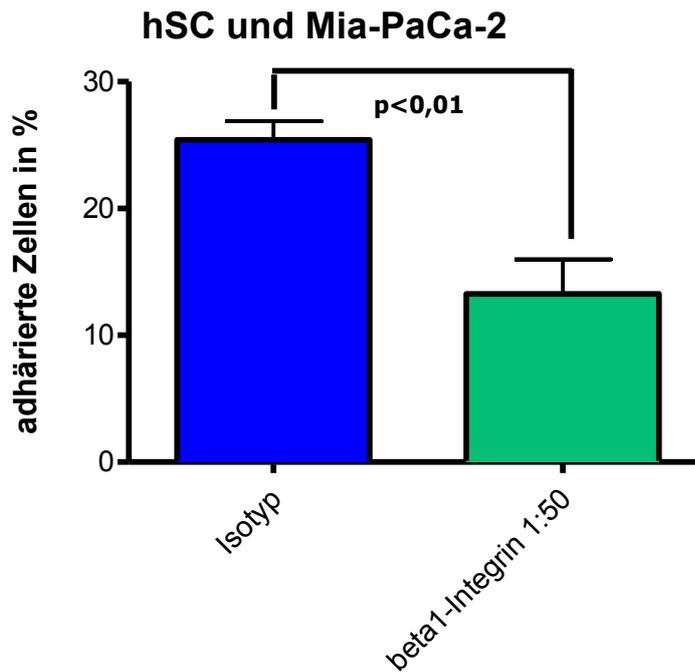
**Abb. 44: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** nur hSC wurden mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt. Die Behandlung der hSC hat keinen Effekt auf die Adhäsion der Mia-PaCa-2 Karzinomzellen an die hSC (Isotyp: 23,88±2,560%, hSC beta 1 Integrin Blockade: 20,67±3,335%).

Im zweiten Schritt sind nur die Mia-PaCa-2 Zellen mit dem beta 1 Integrin blockierenden Antikörper inkubiert worden. Hierbei kam es zu einer statistisch hoch signifikanten Reduktion der Mia-PaCa-2 Karzinomzellen, die eine Zell-Zell-Adhäsion mit den hSC eingingen (Isotyp: 31,10±1,912%, Mia-PaCa-2 beta 1 Integrin Blockade: 15,25±3,151%) (Abb.45).



**Abb. 45: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** nur Mia-PaCa-2 Zellen wurden mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt. Es kommt zu demselben Effekt wie bei den SU86.86 Zellen. Es tritt eine Verminderung der adhärenenden Karzinomzellen ein (Isotyp: 31,10±1,912%, Mia-PaCa-2 beta 1 Integrin Blockade: 15,25±3,151%).

Zuletzt wurden sowohl die hSC, als auch die Mia-PaCa-2 Zellen mit der beta 1 Integrin Antikörper-Blockade behandelt. Hierbei zeigte sich, dass es ebenfalls zu einer statistisch hoch signifikanten Verminderung der Karzinomzell-Adhäsion an den hSC kommt (Isotyp: 25,40±1,473%, hSC und Mia-PaCa-2 beta 1 Integrin Blockade: 13,25±2,737%) (Abb.46).

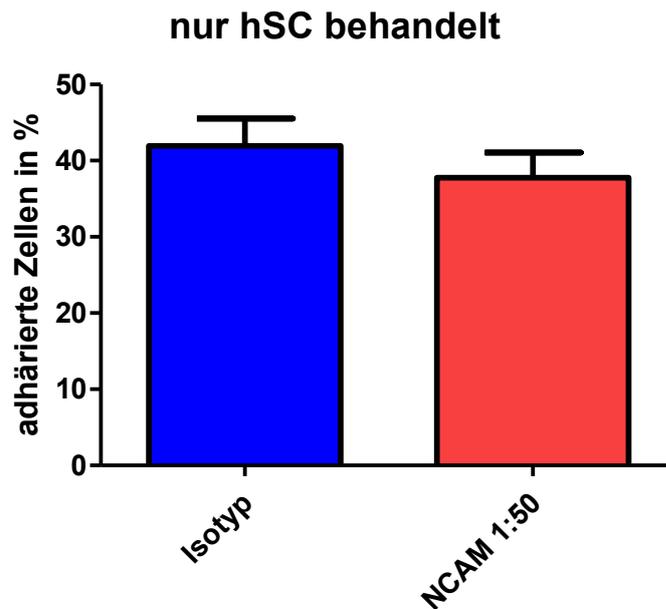


**Abb. 46: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** sowohl hSC, als auch Mia-PaCa-2 Zellen werden mit blockierendem beta 1 Integrin Antikörper behandelt. Durch die Behandlung beider Zelllinien gehen sehr viel weniger Karzinomzellen eine Zell-Zell-Adhäsion mit den hSC ein (Isotyp: 25,40±1,473%, hSC und Mia-PaCa-2 beta 1 Integrin Blockade: 13,25±2,737%).

### 3.3 NCAM: Schwannsche Zellen-SU86.86

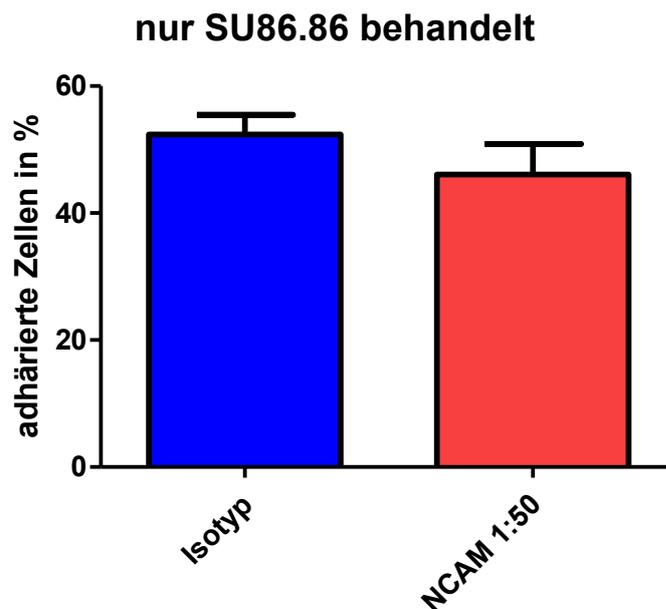
Derselbe Adhäsionsassay wurde anschließend mit NCAM blockierenden Antikörpern durchgeführt.

Als nur hSC mit dem NCAM Antikörper vorbehandelt wurden, ergab sich kein Unterschied zwischen Isotyp und NCAM behandelten SU86.86 in Bezug auf ihre Adhäsionsfähigkeit (Isotyp: 41,96±3,583%, hSC NCAM Blockade: 37,77±3,287%) (Abb.47).



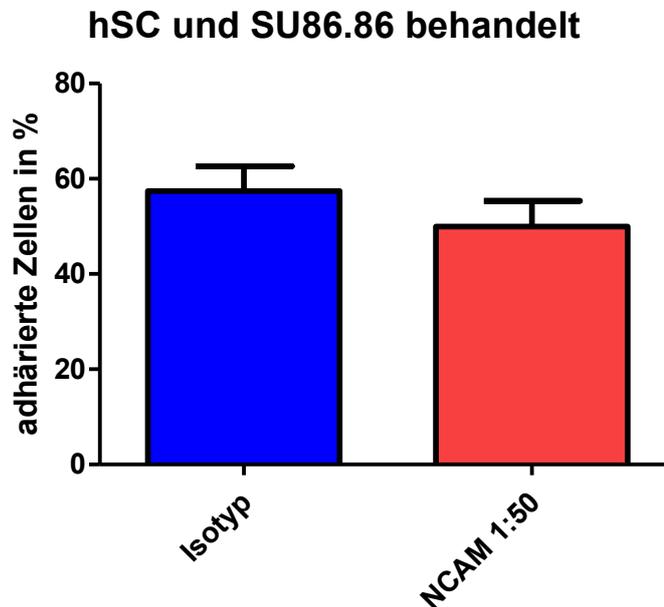
**Abb. 47: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** nur hSC wurden mit NCAM blockierenden Antikörper behandelt. Es zeigt sich kein Effekt innerhalb der Zell-Zell-Adhäsion zwischen Isotyp behandelten hSC und mit Antikörper inkubierten hSC (Isotyp:  $41,96 \pm 3,583\%$ , hSC NCAM Blockade:  $37,77 \pm 3,287\%$ ). 1:50 bedeutet 50-fache Verdünnung des NCAM Antikörpers.

Interessanterweise zeigt sich bei anti-NCAM behandelten SU86.86 ebenfalls kein Effekt. Die adhärierenden Karzinomzellen wurden, im Vergleich zur beta 1 Integrin Blockade, nicht weniger adhärent (Isotyp:  $52,38 \pm 3,106\%$ , SU86.86 NCAM Blockade:  $46,10 \pm 4,792\%$ ) (Abb.48).



**Abb. 48: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** nur SU86.86 Zellen wurden mit NCAM blockierenden Antikörpern behandelt. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Isotyp- und Antikörper behandelten Zellen (Isotyp:  $52,38 \pm 3,106\%$ , SU86.86 NCAM Blockade:  $46,10 \pm 4,792\%$ ).

Auch bei der Blockade beider Zelllinien mit NCAM Antikörper, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungen festgestellt werden (Isotyp:  $57,40 \pm 5,231\%$ , hSC und SU86.86 NCAM Blockade:  $50,00 \pm 5,348\%$ ) (Abb.49).

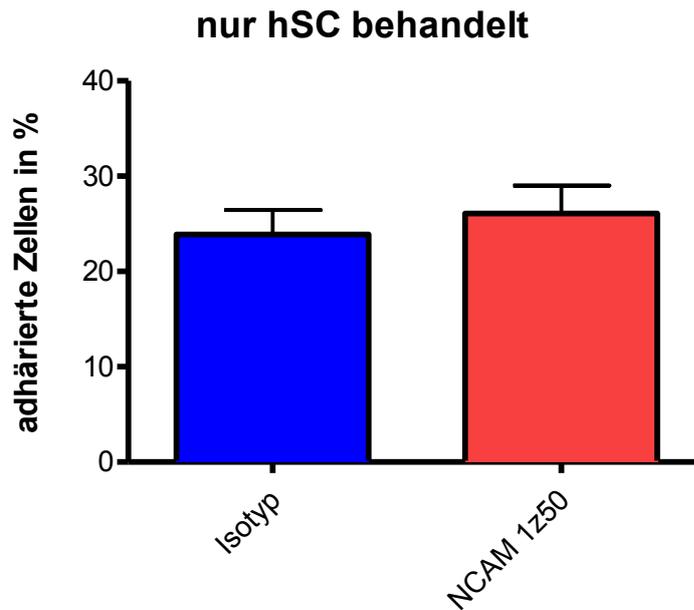


**Abb. 49:** Adhäsion von PCa-Zellen an hSC: sowohl hSC, als auch SU86.86 wurden einer blockierenden Antikörper-Behandlung durch NCAM unterzogen. Allerdings zeigte sich kein statistisch signifikanter Effekt bezüglich der adhärierenden Zellen (Isotyp:  $57,40 \pm 5,231\%$ , hSC und SU86.86 NCAM Blockade:  $50,00 \pm 5,348\%$ ).

### 3.4 NCAM: Schwannsche Zellen-Mia-PaCa-2

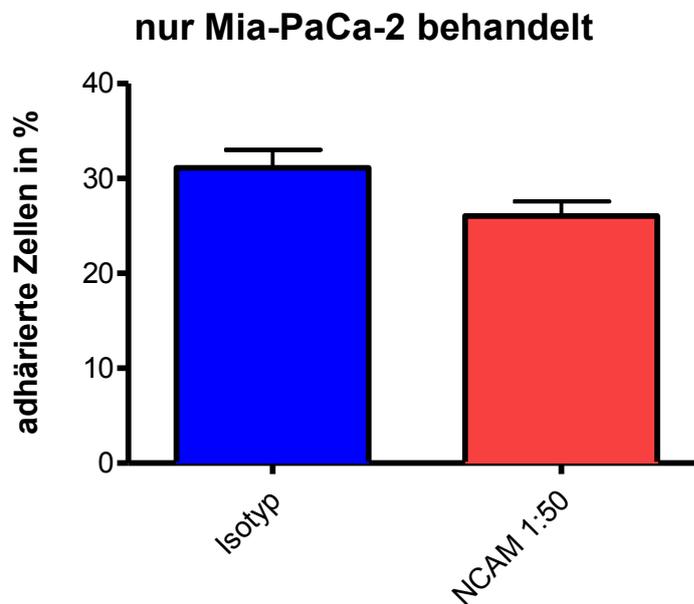
Zur Bestätigung der Ergebnisse, die mit der SU86.86 Zelllinie erzielt wurden, wurde der Adhäsionsassay mit NCAM blockierenden Antikörpern auch mit der Pankreaskarzinomzelllinie Mia-PaCa-2 durchgeführt.

Hierbei bestätigte sich das Ergebnis, was sich schon bei SU86.86 gezeigt hatte. Bei der Antikörper-Behandlung der hSC kam es zu keinem Effekt in der Zell-Zell-Adhäsion (Isotyp:  $23,88 \pm 2,560\%$ , hSC NCAM Blockade:  $26,07 \pm 2,956\%$ ) (Abb.50).



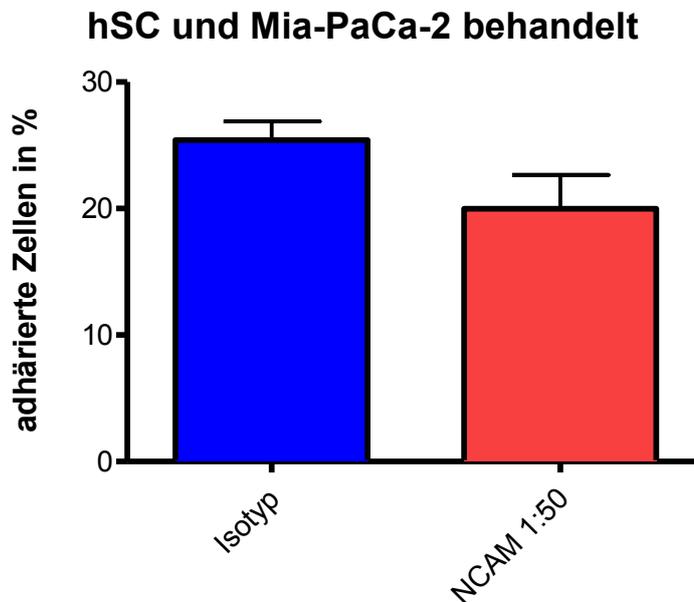
**Abb. 50:** Adhäsion von PCa-Zellen an hSC: nur hSC wurden mit NCAM blockierenden Antikörper inkubiert. Bei den mit NCAM behandelten hSC ergab sich kein Unterschied in Bezug auf die adhärierenden Zellen verglichen mit dem Isotyp (Isotyp: 23,88 ± 2,560%, hSC NCAM Blockade: 26,07 ± 2,956%).

Bei der Vorbehandlung der Mia-PaCa-2 Zellen mit dem NCAM Antikörper kommt es zu keiner Reduktion der adhärierenden Zellen (Isotyp: 31,10 ± 1,912%, Mia-PaCa-2 NCAM Blockade: 26,04 ± 1,554%) (Abb.51).



**Abb. 51:** Adhäsion von PCa-Zellen an hSC: nur Mia-PaCa-2 Zellen wurden mit NCAM blockierenden Antikörper vorbehandelt. Es zeigt sich kein Effekt und die Anzahl adhärrender Karzinomzellen nimmt im Vergleich zum Isotyp nicht wesentlich ab (Isotyp: 31,10 ± 1,912%, Mia-PaCa-2 NCAM Blockade: 26,04 ± 1,554%).

Zuletzt wurden sowohl die hSC, als auch die Mia-PaCa-2 Zellen mit dem NCAM blockierenden Antikörper inkubiert. Auch hierbei kam es zu keinem statistisch signifikanten Effekt zwischen Isotyp und Antikörper behandelten Karzinomzellen (Isotyp:  $25,40 \pm 1,473\%$ , hSC und Mia-PaCa-2 NCAM Blockade:  $19,99 \pm 2,666\%$ ) (Abb.52).



**Abb. 52: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC:** Antikörper-Behandlung beider Zelllinien hSC und Mia-PaCa-2 mit NCAM blockierenden Antikörpern. Es entsteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit Isotyp und NCAM behandelten Zellen. Die Anzahl adhärerender Zellen in % ist annähernd gleich (Isotyp:  $25,40 \pm 1,473\%$ , hSC und Mia-PaCa-2 NCAM Blockade:  $19,99 \pm 2,666\%$ ).

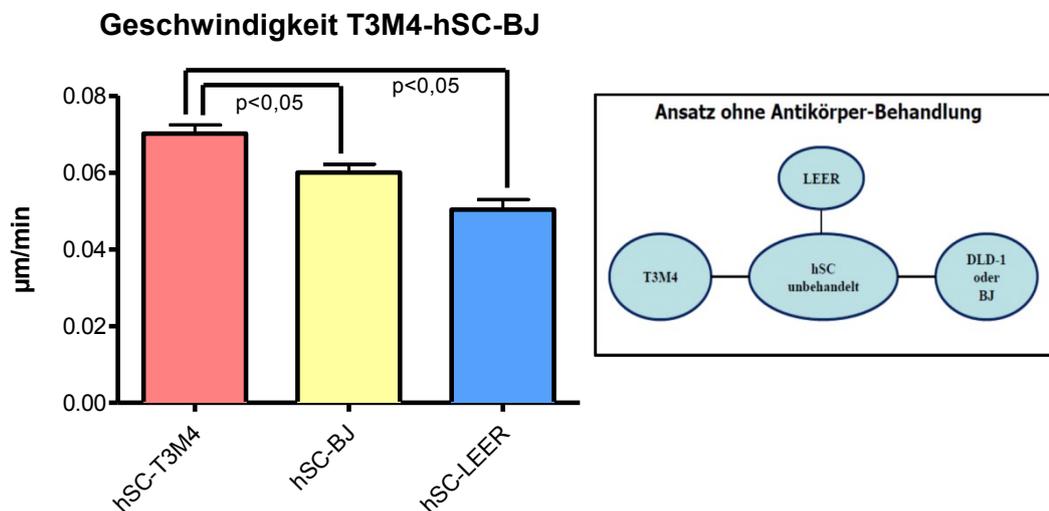
#### 4 Spezifität der Schwanzzell Migration

Aus früheren Forschungsarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass eine Affinität zwischen hSC und Pankreaskarzinomzellen besteht (Boldis et al, UEGW 2010, unpubliziert). Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden innerhalb eines Migrationsassays hSC in die Mitte zwischen Pankreaskarzinomzellen auf der einen und Fibroblasten bzw. Kolonkarzinomzellen auf der anderen Seite suspendiert. Das Ziel war es herauszufinden, wie sich in diesem Setting die hSC verhalten und ob es zu einer gerichteten Migration in Richtung der Pankreaskarzinomzellen kommt.

#### 4.1 Vergleich der Migration zwischen Fibroblasten und Pankreaskarzinomzellen

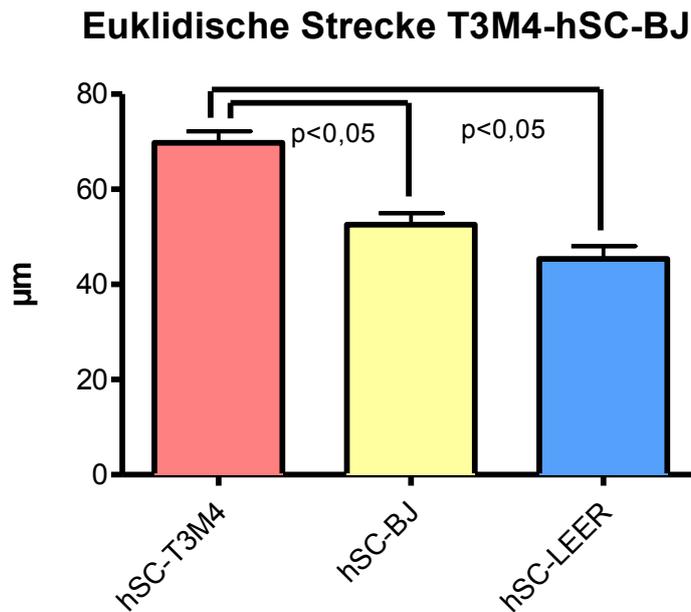
In diesem Ansatz wurden die hSC in der Mitte zwischen den Pankreaskarzinomzellen (T3M4) links und den Fibroblasten (BJ) rechts platziert (Abb.53).

Nach Auswertung aller Daten zeigte sich folgende Beobachtung: Die Wanderungsgeschwindigkeit der hSC zu den T3M4 ( $0,070 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ ) hin war statistisch signifikant höher als die Wanderungsgeschwindigkeit der hSC zu den BJ ( $0,060 \pm 0,002002 \mu\text{m}/\text{min}$ ) und zum leeren ECM-Gel ( $0,050 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$ ) (Abb.53).



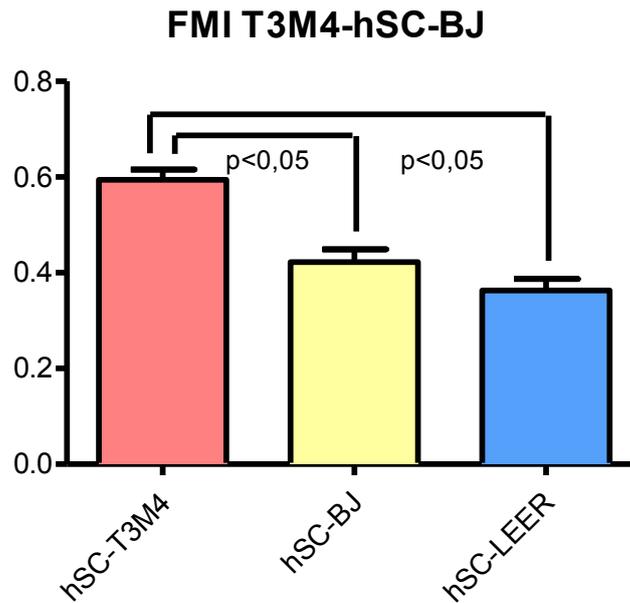
**Abb. 53: Migrationsgeschwindigkeit der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit BJ-Zellen.** Die Migrationsgeschwindigkeit zu den T3M4 ist signifikant am höchsten im direkten Vergleich zu den BJ bzw. zum leeren ECM-Gel (hSC-T3M4:  $0,070 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-BJ:  $0,060 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-LEER:  $0,050 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Im Schema rechts ist die Anordnung der Zellen zueinander dargestellt. In der Mitte befinden sich die hSC, links daneben wurden die malignen T3M4 Zellen suspendiert, rechts kommen die BJ Zellen und senkrecht über den hSC befindet sich das leere ECM-Gel.

Auch die euklidische Strecke der hSC, also die Netto-Strecke in  $\mu\text{m}$  zwischen Start- und Zielpunkt der Zelle, hin zu den T3M4 ( $69,80 \pm 2,347 \mu\text{m}$ ) war am größten und statistisch signifikant höher im Vergleich zu der Distanz zu den BJs ( $52,57 \pm 2,423 \mu\text{m}$ ) bzw. zum leeren ECM-Gel ( $45,35 \pm 2,705 \mu\text{m}$ ) (Abb.54). Die euklidische Strecke berechnet sich lediglich aus den Endpunkten der y-Achse und berücksichtigt dabei keine Richtungswechsel der Zelle.



**Abb. 54:** Euklidische Migrationsstrecke der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit BJ-Zellen. Die zurückgelegte Distanz ist am höchsten hin zu den T3M4 Zellen und statistisch signifikant größer, als hin zu den BJs bzw. zum leeren ECM-Gel (hSC-T3M4:  $69,80 \pm 2,347 \mu\text{m}$ , hSC-BJ:  $52,57 \pm 2,423 \mu\text{m}$ , hSC-LEER:  $45,35 \pm 2,705 \mu\text{m}$ ).

Der Forward Migration Index beschreibt die gezielte Direktionalität der Migrationsbewegungen der Zellen zueinander und ist das wichtigste Kriterium bei der Auswertung des 3D-Migrationsassays. Er wird aus der Summe aller Quotienten aus euklidischer und akkumulierter Distanz berechnet. Dieser war ebenfalls am höchsten bei der Migration der hSC zu den T3M4 ( $0,595 \pm 0,021$ ). Der FMI der hSC-Wanderung zu den BJs ( $0,422 \pm 0,027$ ) bzw. zum leeren ECM-Gel ( $0,363 \pm 0,0241$ ) war statistisch signifikant niedriger, verglichen mit der Migration zu den T3M4 Zellen. (Abb.55).



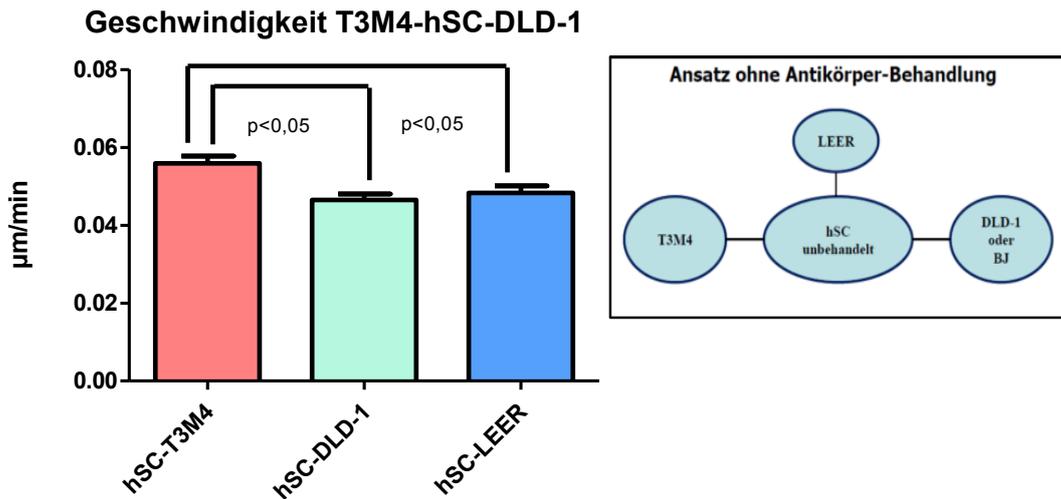
**Abb. 55:** Forward Migration Index der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit BJ-Zellen. Der FMI der hSC ist am höchsten hin zu den T3M4 (0,595±0,021). FMI der hSC zu den BJs (0,422±0,027) bzw. zum leeren Gel (0,363±0,0241) hin ist statistisch signifikant niedriger.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die hSC im direkten Vergleich bevorzugt und schneller zu den Pankreaskarzinomzellen (T3M4) migrieren als zu den Fibroblasten (BJ). Dies ließ sich mittels Wanderungsgeschwindigkeit, euklidischer Strecke und dem Forward Migration Index demonstrieren.

#### 4.2 Vergleich der Migration zwischen Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinomzellen

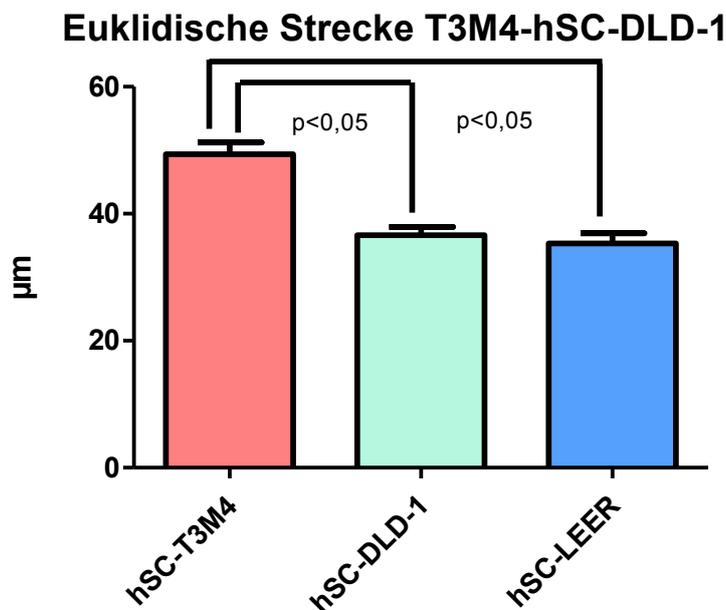
Nachdem wir nun zeigen konnten, dass die hSC eine hohe Affinität zu der Pankreaskarzinomzelllinie T3M4 aufweisen, im Gegensatz zu den nicht malignen Fibroblasten BJ, stellte sich die Frage, wie sich das Migrationsverhalten gegenüber einer malignen Kolonkarzinomzelllinie (DLD-1) verhält.

Bei der Wanderungsgeschwindigkeit der hSC zu den einzelnen Zelllinien zeigte sich, dass die hSC erneut eine signifikant höhere Migrationsgeschwindigkeit zu den T3M4 zeigten als gegenüber den DLD-1-Zellen und dem leeren ECM-Gel (Geschwindigkeit hSC-T3M4: 0,056±0,002µm/min, hSC-DLD-1: 0,0465±0,001 µm/min, hSC-LEER: 0,048±0,002 µm/min) (Abb.56).



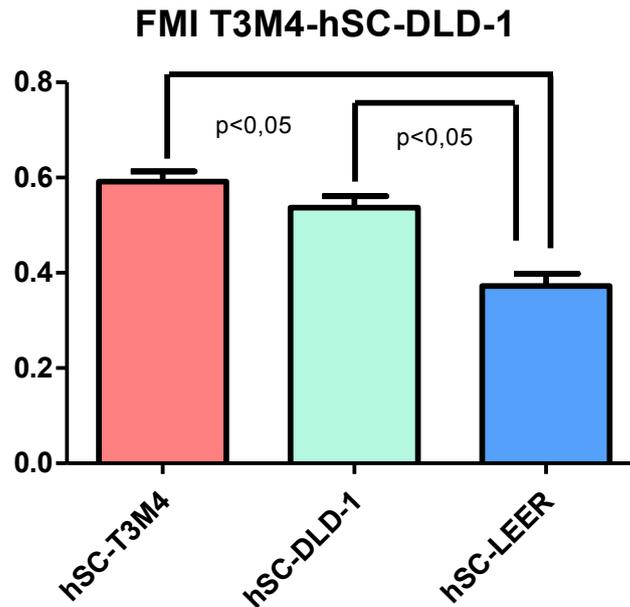
**Abb. 56:** Migrationsgeschwindigkeit der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit DLD-1-Zellen. Eine leere ECM-Gelsuspension wurde analog dem Schema rechts als Negativkontrolle verwendet. Die hSC-Migration hin zu T3M4 ( $0,056 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ ) ist wesentlich schneller als zu DLD-1 ( $0,0465 \pm 0,001 \mu\text{m}/\text{min}$ ) oder leerem ECM-Gel ( $0,048 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ ).

Auch die euklidische Strecke, die zu T3M4 zurückgelegt wurde, war am größten (Abb.57). Die Distanz zu DLD-1 ( $36,61 \pm 1,309 \mu\text{m}$ ) bzw. zum leeren ECM-Gel ( $35,33 \pm 1,605 \mu\text{m}$ ) war statistisch signifikant geringer als die euklidische Strecke zu den T3M4 Zellen ( $49,37 \pm 1,860 \mu\text{m}$ ).



**Abb. 57:** Euklidische Migrationsstrecke der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit DLD-1-Zellen. Die euklidische Strecke hin zu den T3M4 war statistisch signifikant höher als zu DLD-1 bzw. zum leeren ECM-Gel hin (hSC-T3M4:  $49,37 \pm 1,860 \mu\text{m}$ , hSC-DLD-1:  $36,61 \pm 1,309 \mu\text{m}$ , hSC-LEER:  $35,33 \pm 1,605 \mu\text{m}$ ).

Die gerichtete Wanderung bzw. der Forward Migration Index der hSC zu den T3M4 war in diesem Ansatz am größten. Allerdings zeigten hSC auch gegenüber DLD-1-Zellen eine Migration, sodass der direkte Vergleich zwischen diesen beiden Zelltypen nicht mehr signifikant war. Eine Signifikanz zeigte sich nur gegen das leere ECM-Gel (FMI hSC-T3M4:  $0,592 \pm 0,021$ , hSC-DLD-1:  $0,537 \pm 0,024$ , hSC-LEER:  $0,372 \pm 0,026$ ) (Abb.58).



**Abb. 58:** Forward Migration Index der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit DLD-1-Zellen. Hier zeigt sich eine Signifikanz der gerichteten Wanderung zwischen hSC-T3M4 und hSC-LEER (FMI hSC-T3M4:  $0,592 \pm 0,021$ , hSC-DLD-1:  $0,537 \pm 0,024$ , hSC-LEER:  $0,372 \pm 0,026$ ).

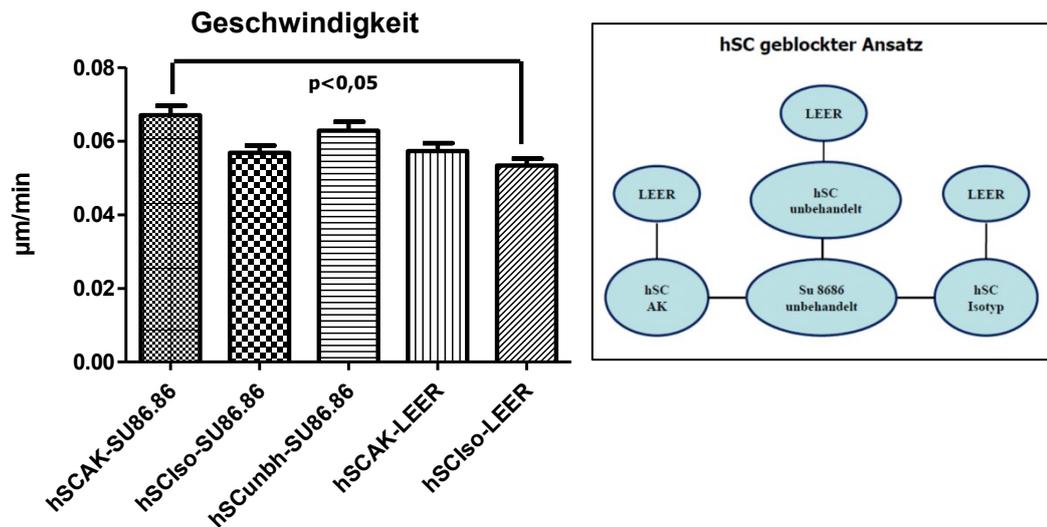
An Hand der ermittelten Daten lässt sich zusammenfassen, dass sich die Affinität der hSC gegenüber den Pankreaskarzinomzellen bestätigte, selbst im direkten Vergleich mit einer weiteren malignen Zelllinie, der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1.

## **5 Die Rolle von beta 1 Integrin in der tumorgerichteten Migration**

Der Beitrag von beta 1 Integrin auf die Zell-Zell-Adhäsion zwischen den Pankreaskarzinomzellen und den hSC veranlasste dazu, den Einfluss von beta 1 Integrin auf die Migration von hSC zu den Pankreaskarzinomzellen näher zu untersuchen. Hierbei wurde nur beta 1 Integrin für diesen Versuchsaufbau verwendet, da NCAM bereits bei den Adhäsionsassays keinen signifikanten Effekt gezeigt hatte. In diesem Versuchsansatz wurden jeweils separat die hSC und die SU 86.86-Zellen mit den beta 1 Integrin blockierenden Antikörpern behandelt und der Migrationsassay durchgeführt. Die Anordnung der Assays erfolgte nach dem Schema in 2.3.2. (Abb. 59).

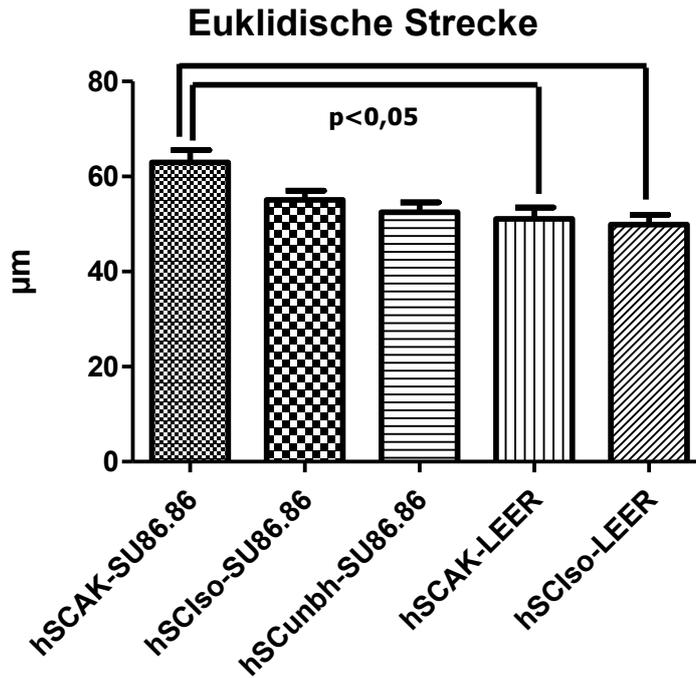
### **5.1 Beta 1 Integrin: Schwann-Zell geblockter Ansatz**

Im ersten Versuch wurden die hSC mit dem beta 1 Integrin blockierenden Antikörper behandelt und die Migration mittels digitaler Time-Lapse-Mikroskopie ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die hSC Behandlung keinen Einfluss auf die hSC Migrationsgeschwindigkeit hatte (Abb.59). Die geblockten hSC migrierten nahezu identisch schnell zu den SU86.86 wie die unbehandelten hSC (hSC AK-SU86.86:  $0,067 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC Isotyp-SU86.86:  $0,057 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC unbehandelt-SU86.86:  $0,063 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC AK-LEER:  $0,057 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC Isotyp-LEER:  $0,053 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ ).



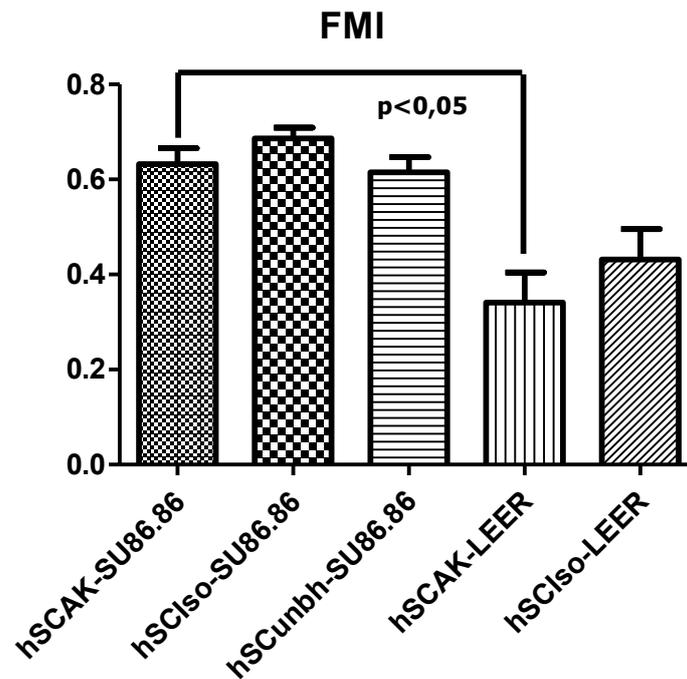
**Abb. 59:** Migrationsgeschwindigkeit der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der hSC. Das Pipettierschema befindet sich auf der rechten Seite. Migration der beta 1 Integrin Antikörper behandelten hSC unterscheidet sich nicht stark von der Migration der anderen hSC (hSC AK-SU86.86:  $0,067 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC Isotyp-SU86.86:  $0,057 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC unbehandelt-SU86.86:  $0,063 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC AK-LEER:  $0,057 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC Isotyp-LEER:  $0,053 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ ).

Die euklidische Strecke der mit beta 1 Integrin Antikörper behandelten hSC war sogar am größten verglichen mit den Isotyp behandelten bzw. unbehandelten hSC (Abb.60) (hSC AK-SU86.86:  $62,98 \pm 2,586 \mu\text{m}$ , hSC Isotyp-SU86.86:  $55,09 \pm 1,941 \mu\text{m}$ , hSC unbehandelt-SU86.86:  $52,52 \pm 2,060 \mu\text{m}$ , hSC AK-LEER:  $51,09 \pm 2,407 \mu\text{m}$ , hSC Isotyp-LEER:  $49,91 \pm 2,057 \mu\text{m}$ ). Die eingetragenen Signifikanzen zu den leeren ECM-Gels bestätigen, dass der Assay in sich schlüssig ist.



**Abb. 60:** Euklidische Migrationsstrecke der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der hSC. Es sind keine großen Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Behandlungen der hSC auf die euklidische Strecke erkennbar (hSC AK-SU86.86:  $62,98 \pm 2,586 \mu\text{m}$ , hSC Isotyp-SU86.86:  $55,09 \pm 1,941 \mu\text{m}$ , hSC unbehandelt-SU86.86:  $52,52 \pm 2,060 \mu\text{m}$ , hSC AK-LEER:  $51,09 \pm 2,407 \mu\text{m}$ , hSC Isotyp-LEER:  $49,91 \pm 2,057 \mu\text{m}$ ).

Der Forward Migration Index zeigt keine Unterschiede zwischen beta 1 Integrin Antikörper -, Isotyp behandelten und unbehandelten hSC (Abb.61) (hSC AK-SU86.86:  $0,633 \pm 0,033$ , hSC Isotyp-SU86.86:  $0,686 \pm 0,023$ , hSC unbehandelt-SU86.86:  $0,615 \pm 0,032$ , hSC AK-LEER:  $0,341 \pm 0,063$ , hSC Isotyp-LEER:  $0,432 \pm 0,064$ ).



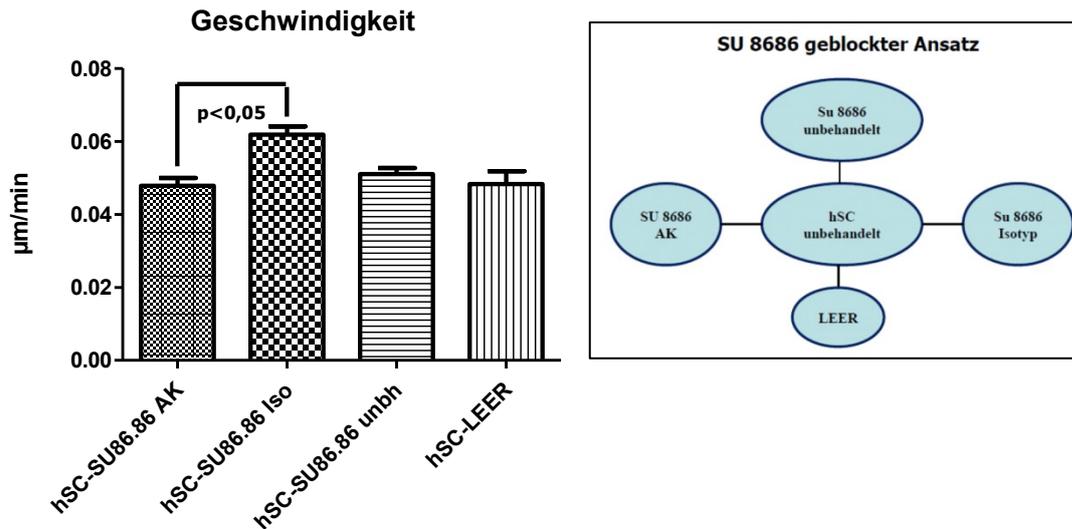
**Abb. 61:** Forward Migration Index der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der hSC. Der Forward Migration Index ist bei allen Behandlungen annähernd gleich, es besteht lediglich eine Signifikanz zwischen den mit beta 1 Integrin Antikörpern behandelten hSC hin zu den SU86.86 Zellen und dem leeren ECM-Gel (hSC AK-SU86.86:  $0,633 \pm 0,033$ , hSC Isotyp-SU86.86:  $0,686 \pm 0,023$ , hSC unbeh-SU86.86:  $0,615 \pm 0,032$ , hSC AK-LEER:  $0,341 \pm 0,063$ , hSC Isotyp-LEER:  $0,432 \pm 0,064$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die alleinige Behandlung der hSC mit dem blockierenden beta 1 Integrin Antikörper keinen Effekt zeigte. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen des Adhäsionsassays überein.

## 5.2 Beta 1 Integrin: SU86.86 geblockter Ansatz

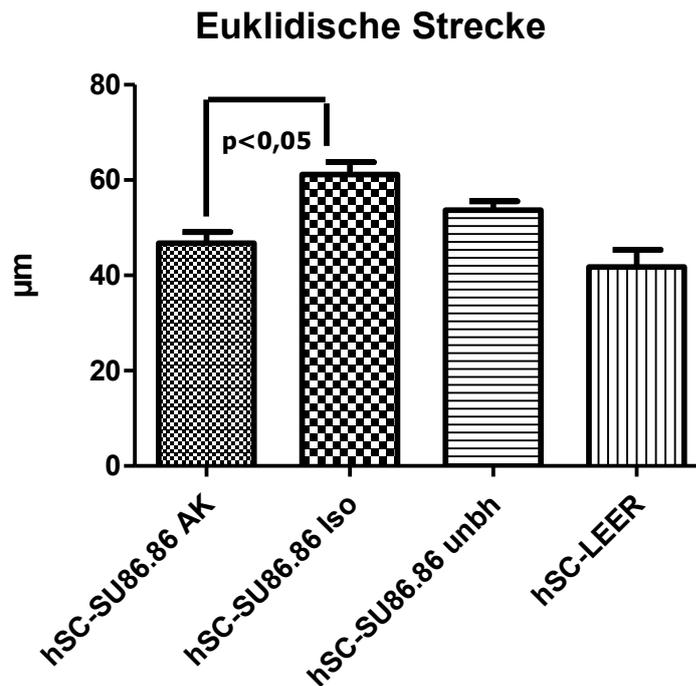
Im einem weiteren Schritt untersuchten wir den Effekt der beta 1 Integrin Antikörper-Behandlung der Pankreaskarzinomzellen auf die hSC-PCa-Zellattraktion.

Betrachtet man die Geschwindigkeit der hSC mit der diese zu den SU86.86 migrierten, konnte festgestellt werden, dass sich die hSC am langsamsten zu den mit Antikörper vorbehandelten SU86.86 bewegten (Abb.62) (hSC-SU86.86 AK:  $0,048 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-SU86.86 Isotyp:  $0,062 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-SU86.86 unbehandelt:  $0,051 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-LEER:  $0,048 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$ ).



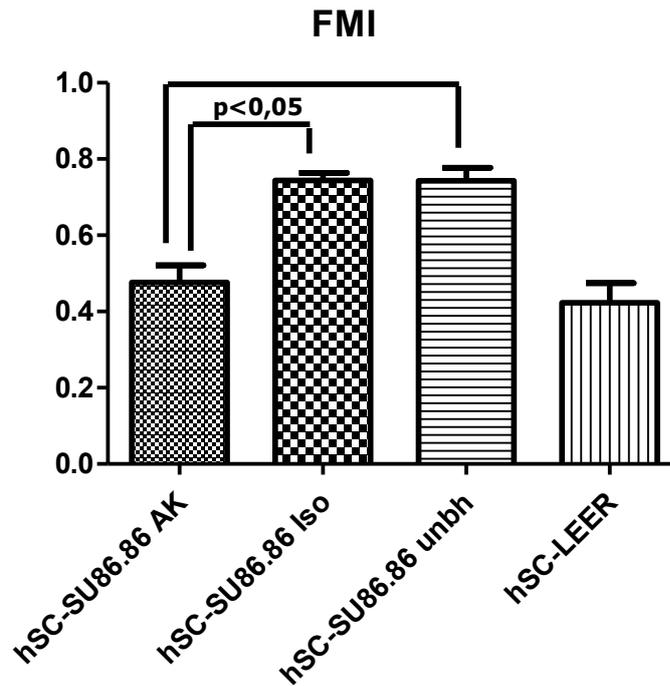
**Abb. 62:** Migrationsgeschwindigkeit der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der SU86.86. Das Pipettierschema befindet sich rechts, die unbehandelten hSC wurden in die Mitte pipettiert, die auf verschiedene Art und Weise behandelten SU86.86 außen herum. Die hSC migrieren am schnellsten zu den Isotyp bzw. unbehandelten SU86.86 (hSC-SU86.86 AK:  $0,048 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-SU86.86 Isotyp:  $0,062 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-SU86.86 unbehandelt:  $0,051 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$ , hSC-LEER:  $0,048 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$ ).

Die euklidische Strecke der hSC zu den verschiedenartig vorbehandelten SU86.86 demonstrierte ebenfalls eine statistisch signifikant geringere Strecke der hSC zu den mit Antikörpern behandelten Karzinomzellen ( $46,80 \pm 2,307 \mu\text{m}$ ) (Abb.63) (hSC-SU86.86 AK:  $46,80 \pm 2,307 \mu\text{m}$ , hSC-SU86.86 Isotyp:  $61,14 \pm 2,624 \mu\text{m}$ , hSC-SU86.86 unbehandelt:  $53,70 \pm 1,877 \mu\text{m}$ , hSC-LEER:  $41,75 \pm 3,604 \mu\text{m}$ ).



**Abb. 63:** Euklidische Migrationsstrecke der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der SU86.86. Die Migration ist am geringsten in Richtung der mit beta 1 Integrin Antikörper behandelten Karzinomzellen (hSC-SU86.86 AK:  $46,80 \pm 2,307 \mu\text{m}$ , hSC-SU86.86 Isotyp:  $61,14 \pm 2,624 \mu\text{m}$ , hSC-SU86.86 unbehandelt:  $53,70 \pm 1,877 \mu\text{m}$ , hSC-LEER:  $41,75 \pm 3,604 \mu\text{m}$ ).

Der Forward Migration Index wurde durch die Behandlung der SU86.86 mit dem beta 1 Integrin blockierenden Antikörper stark beeinflusst. Der FMI war hierbei bei den Isotyp- bzw. unbehandelten SU86.86 statistisch signifikant höher als bei den mit beta 1 Integrin Antikörper geblockten Karzinomzellen (Abb.64) (hSC-SU86.86 AK:  $0,476 \pm 0,046$ , hSC-SU86.86 Isotyp:  $0,743 \pm 0,021$ , hSC-SU86.86 unbehandelt:  $0,743 \pm 0,034$ , hSC-LEER:  $0,423 \pm 0,052$ ).



**Abb. 64:** Forward Migration Index der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der SU86.86. hSC migrieren weniger zu den SU86.86 Zellen, die vorher mit beta 1 Integrin Antikörper behandelt worden sind (hSC-SU86.86 AK:  $0,476 \pm 0,046$ , hSC-SU86.86 Isotyp:  $0,743 \pm 0,021$ , hSC-SU86.86 unbehandelt:  $0,743 \pm 0,034$ , hSC-LEER:  $0,423 \pm 0,052$ ).

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Antikörper-Behandlung mit beta 1 Integrin bei den SU86.86 einen direkten Effekt auf die Migration der hSC zu den Karzinomzellen hat. Hierbei kommt es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Geschwindigkeit, der euklidischen Strecke und des FMI der hSC, die in Richtung der Antikörper behandelten SU86.86 migrieren.

## V DISKUSSION

### 1 Allgemeine Bedeutung von Adhäsionsmolekülen für die neurale Invasion im Pankreaskarzinom

In der vorgelegten Dissertationsarbeit wurde zunächst eine detaillierte Expressionsanalyse von beta 1 Integrin und NCAM auf hSC und Pankreaskarzinomzellen durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass das beta 1 Integrin in wesentlich größeren Mengen in hSC vorkommt als das NCAM und dass beide Moleküle unabhängig von der jeweiligen Zellkulturpassage in den untersuchten Zellen exprimiert werden. In der qRT-PCR konnte eine 3400-fach höhere Expression von beta 1 Integrin in hSC verglichen mit NCAM nachgewiesen werden. Im PCa Gewebe konnte jedoch durch immunhistochemische Analysen eine Reduktion der Immunoreaktivität beider Oberflächenmoleküle in intrapankreatischen Nerven im Vergleich zum NP detektiert werden. Darüber hinaus konnte in durch Karzinomzellen stark infiltrierte Nerven eine deutlich reduzierte NCAM Aktivität festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Zell-Zell-Adhäsionen zwischen Karzinomzellen und den hSC spielte interessanterweise nur beta 1 Integrin eine Rolle: Durch Blockierung der beta 1 Integrin Kette in den Pankreaskarzinomzellen nahmen die Anzahl der Karzinomzelladhäsionen an den hSC signifikant ab, zum Teil bis zu 50%. Im Gegensatz dazu zeigte eine Antikörper-Behandlung der hSC keinen Effekt. In der vorgelegten Dissertationsarbeit konnten wir weiterhin zeigen, dass das Migrationsverhalten der hSC zu den Pankreaskarzinomzellen spezifisch ist. Auch hierbei scheint das beta 1 Integrin eine entscheidende Rolle zu spielen, denn die Behandlung der Pankreaskarzinomzellen mit dem blockierenden beta 1 Integrin Antikörper führten zu einer verminderten Migration der hSC zu den Karzinomzellen.

Die Annahme, dass Adhäsionsmoleküle eine Rolle bei der Pathogenese der neuralen Invasion von Karzinomzellen im PCa spielen, ist relativ neu. Man kann aus aktuellen Forschungsarbeiten davon ausgehen, dass der Bindungspartner der hSC auf Karzinomzellen myelinassoziiert sein muss (Swanson, McDermott et al. 2007). Hier scheint der Bindungspartner der einwandernden Karzinomzellen auf den Gliazellen lokalisiert zu sein, denn nach Zerstörung des Peri- und

Endoneuriums kommen die Karzinomzellen vor allem zunächst mit den hSC in Kontakt. Hierbei werden die hSC von den Karzinomzellen nicht nur verdrängt, sondern auch zum größten Teil von diesen zerstört (Bockman, Buchler et al. 1994). Die Gliazellen sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, da sie eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, Nervenverletzungen und der Entwicklung von neuropathischen Schmerz spielen (Scholz und Woolf 2007). Dennoch ist es bis heute nicht gelungen, die Adhäsion der Glia- und Karzinomzellen durch eine spezifische Antikörper Therapie komplett zu unterbinden (Swanson, McDermott et al. 2007). Aus diesem Grund muss es noch andere Bindungspartner auf den Gliazellen geben, die einen Einfluss auf diese Zell-Zell-Interaktionen bzw. -Adhäsionen haben. In diesem Zusammenhang scheinen Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Moleküle eine Rolle zu spielen, wie beispielsweise das L1 CAM. Im PCa konnte bisher demonstriert werden, dass die L1 CAM Expression direkt mit der perineuralen Invasion von Karzinomzellen, abdominellen Schmerzen und einer schlechteren Überlebensprognose korreliert (Ben, Wang et al. 2010). Daneben ist L1 CAM auch ein wichtiger Co-Rezeptor von beta 1 Integrin, und durch die Interaktion beider Oberflächenmolekülen kommt es bekannterweise zur neuronalen Zellmigration und zum Neuritenwachstum (Schmid und Maness 2008). Auch das Oberflächenmolekül NrCAM, ebenso wie NCAM ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, könnte in diesem Zusammenhang bei der neuralen Invasion im PCa eine Rolle spielen, da dieses Molekül im PCa ebenfalls hochreguliert wird (Dhodapkar, Friedlander et al. 2001). Integrine spielen im Zusammenhang mit dem PCa allgemein eine wichtige Rolle, da sie eine Vielzahl von Tumorzellfunktionen regulieren, wie beispielsweise Migration, Invasion, Proliferation und Überleben der Zelle (Desgrosellier und Cheresch 2010). Daneben wurden Integrine auch auf tumorassoziierten Wirtszellen nachgewiesen, wie zum Beispiel auf Gefäßendothelzellen, Fibroblasten oder Thrombozyten. Im Falle einer Blockade dieser Adhäsionsmoleküle werden sowohl entscheidende Signalwege innerhalb der Karzinomzelle beeinflusst, als auch in der Mikroumgebung des Tumors.

Integrine sind somit interessante Ansatzpunkte für zukünftige Tumorthapien (Desgrosellier und Cheresch 2010). Prinzipiell sind Integrine nicht onkogen, dennoch gibt es zahlreiche Onkogene, die Signale von Integrinen benötigen, um das Tumorstwachstum und die Invasion zu initiieren. Beispielsweise trägt beta 1

Integrin zur Entwicklung von Mammakarzinomen bei, indem es mit dem Onkoprotein Polyoma middle T kommuniziert (White, Kurpios et al. 2004).

## **2 Vorkommen von beta 1 Integrin und NCAM auf Schwannschen Zellen und Karzinomzellen**

Um das Expressionsmuster der beiden Oberflächenmoleküle beta 1 Integrin und NCAM auf hSC bzw. Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, wurden unterschiedliche Expressionsanalysen durchgeführt. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass das beta 1 Integrin in wesentlich größeren Mengen auf den hSC exprimiert wird (3400-fach) als das NCAM. Die Menge eines exprimierten Moleküls sagt allerdings nichts über dessen Funktionalität aus. Bei der durchgeführten Expressionsanalyse erfolgte die Quantifizierung der Moleküle mittels qRT-PCR, dabei kann allerdings nur die Menge eines Moleküls auf mRNA Ebene bestimmt werden, nicht aber das tatsächliche Vorkommen auf der Oberfläche. Auch gut geeignet für die Quantifizierung von aktiven Adhäsionsmolekülen auf lebenden Zellen ist die Durchflusszytometrie. Durch den Einsatz einer Durchflusszytometrie konnte ebenfalls das Vorkommen von Integrinen auf PCa Zelloberflächen (BxPC-3, PANC-1, SW1990) nachgewiesen werden (Sawai, Okada et al. 2008). In der Studie von Sawai et al. konnte gezeigt werden, dass durch Basalmembranproteine das invasive Verhalten von Pankreaskarzinomzellen gesteigert wird und durch eine Vorbehandlung der Karzinomzellen mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörpern die Invasionskapazität gehemmt werden kann. Durch Peptide, die die RGD Sequenz (Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure) enthalten, konnte die Invasion von Pankreaskarzinomzellen vollständig verhindert werden (Iwamoto, Sakai et al. 1999; Zitzmann, Ehemann et al. 2002; Sawai, Okada et al. 2008). Basalmembranproteine enthalten häufig die RGD Sequenz, vor allem Fibronectin, Laminin und verschiedenen Kollagen Typen (Cachau, Serpersu et al. 1989). RGD enthaltende Peptide können vor allem  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_5\beta_1$  binden und verhindern dadurch die Kommunikation zwischen Basalmembranproteinen und Karzinomzellen, was wiederum zu einer verminderten Adhäsion, Migration und Metastasierung führt (Zitzmann, Ehemann et al. 2002; Sawai, Okada et al. 2008). Nach Behandlung der Basalmembranproteine, bestehend aus Fibronektin,

Laminin und Kollagen Typ IV mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörpern und RGD Sequenz enthaltenden Peptid wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert. Dies führt zu einer Unterbrechung der intrazellulären Signaltransduktion und schlussendlich zu einer Verhinderung der Invasion der Pankreaskarzinomzellen (Sawai, Okada et al. 2008). Diese Studie zeigt in überzeugender Art und Weise, wie groß der Einfluss von beta 1 Integrin sein kann und wie entscheidend dieses Molekül zur Kommunikation zwischen der Basalmembran und den Karzinomzellen beiträgt.

Der ausschlaggebende Punkt, warum auf die Analyse mittels Durchflusszytometrie bei dieser Arbeit verzichtet werden konnte, ist die quantitative Prüfung der Expression von beta 1 Integrin und NCAM in jedem einzelnen Nerv in den entsprechenden Gewebeschnitten. Diese Methode fand auch bereits bei anderen umfangreichen wissenschaftlichen Untersuchungen Anwendung (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Demir et al. 2009). Interessanterweise zeigte sich bei der quantitativen Analyse der beiden Adhäsionsmoleküle in den Nerven eine Herunterregulierung von beta 1 Integrin und NCAM im PCa. In Nerven des NP war somit, quantitativ gesehen, die Expression der Oberflächenmoleküle deutlich höher. Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass durch die neurale Invasion die Anzahl der reifen, intakten hSC sinkt und sich diese entweder in Apoptose oder Transdifferenzierung befinden (Ceyhan, Demir et al. 2009). Durch die Nervenverletzung bedingt, beginnen sich die hSC zu proliferieren, zu differenzieren und chemische Signalbotenstoffe, wie beispielsweise den Nerve growth factor (NGF), auszuschütten (Scholz und Woolf 2007). Durch diese Veränderungen kann durchaus auch die Herunterregulierung von beta 1 Integrin und NCAM in diesem Zusammenhang erklärt werden. Weiter besitzen Integrine die besondere Fähigkeit zwischen dem Überleben oder Apoptose der Zelle zu entscheiden, abhängig von den jeweiligen Bindungsverhältnissen der Oberflächenintegrine (Desgrosellier und Cheresch 2010). Gebundene Integrine geben hauptsächlich Signale ab, die für das Überleben der Zelle wichtig sind, wie beispielsweise die Proteinkinase B für den PI3K/AKT Signalweg oder das anti-apoptotisch wirkende Protein BCL-2 (Matter und Ruoslahti 2001). Falls sich Integrine jedoch in überwiegend ungebundenen Positionen befinden, kann das zu einer Spaltung von Caspase 8 führen, was letztendlich in Apoptose endet und auch Integrin-vermittelter Zelltod

genannt wird (Stupack, Puente et al. 2001). Bei völligem Fehlen von Bindungen zwischen Zellen, wird der Zelltod durch einen Prozess, der Anoikis genannt wird, hervorgerufen. Hierbei haben die betroffenen Zellen ihren Zell-Matrix Kontakt gänzlich verloren (Desgrosellier und Cheresch 2010).

Interessanterweise zeigte sich zusätzlich eine weitere Abnahme der immunhistochemischen NCAM-Aktivität um bis zu 20% bei intrapankreatischen Nerven, die durch eine besonders starke Karzinomzellinvasion gekennzeichnet waren. Je stärker das Endoneurium durch Karzinomzellen geschädigt war, desto weniger wurde das Adhäsionsmolekül exprimiert. Dieses Phänomen ist am ehesten durch die gesteigerte hSC Apoptose in den schweren Formen der neuralen Invasion bedingt. In ähnlicher Weise konnte bereits gezeigt werden, dass bei peripheren Axotomien die hSC am distalen Stumpf durch die Hochregulierung des Neurotrophin Rezeptors p75 Apoptose begehen (Petratos, Butzkueven et al. 2003; Song, Zhou et al. 2006). Die Herunterregulierung der Oberflächenmoleküle ist allerdings ein negatives Kriterium für die These, dass beta 1 Integrin und NCAM eine Rolle bei der neuralen Invasion im PCa spielen. Denn je weniger von einem Molekül auf der Oberfläche vorhanden ist, desto weniger können dort Karzinomzellen angreifen. Allerdings ist es auch denkbar, dass in Bezug auf beta 1 Integrin die Apoptose durch die Integrine selbst herbeigeführt wird (Desgrosellier und Cheresch 2010).

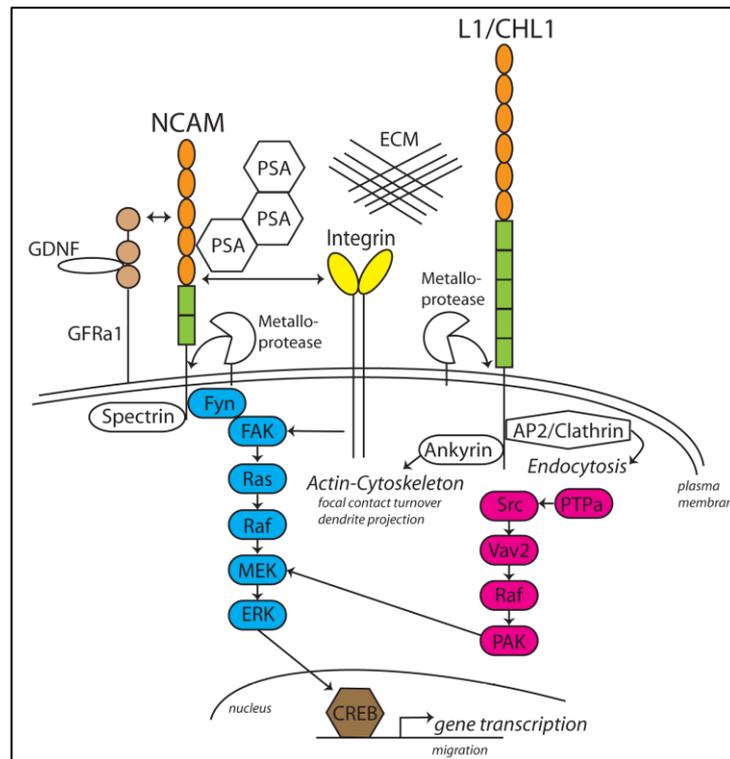
### **3 Relevanz von beta 1 Integrin und NCAM in Bezug auf die Zelladhäsion**

Um die wichtige Frage zu klären, inwieweit die untersuchten Oberflächenmoleküle tatsächlich Einfluss auf die Zell-Zell-Adhäsion der hSC und Karzinomzellen nehmen, wurden standardisierte Adhäsionsassays durchgeführt. Dazu wurden beta 1 Integrin und NCAM einmal auf den hSC und einmal auf den Karzinomzellen durch spezifischen Antikörper ausgeschaltet und der Effekt beobachtet.

#### **3.1 In Bezug auf Schwannsche Zellen**

Die Vorbehandlung der hSC mit Antikörper gegen das beta 1 Integrin und NCAM zeigte weder bei beta 1 Integrin, noch bei NCAM einen Effekt auf die

Zelladhäsion. Obwohl beta 1 Integrin in großen Mengen auf den hSC exprimiert wird, scheint es im PCa keine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion zwischen den hSC und den Pankreaskarzinomzellen zu spielen. In den Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass beta 1 Integrin ein wichtiges Target im Rahmen der Zelladhäsion ist, wurde es auf Karzinomzellen inhibiert und nicht auf hSC (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009; Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG), ein weiteres Oberflächenmolekül der hSC, wurde bereits in Hinsicht auf die neurale Invasion im PCa untersucht. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von MAG und der Adhäsion an Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden (Swanson, McDermott et al. 2007). Die Adhäsion zwischen MAG auf den hSC einerseits und den Karzinomzellen andererseits geschieht über das Typ I membrangebundene transmembranöse Mucin (MUC-1) auf den Karzinomzellen, das im PCa hochreguliert wird (Burdick, Harris et al. 1997; Acres und Limacher 2005). Es konnte weiter gezeigt werden, dass die Adhäsion zwischen hSC und den Pankreaskarzinomzellen durch erhöhte Expression von MAG und MUC-1 noch gesteigert werden konnte (Swanson, McDermott et al. 2007). Beruhend darauf wollte man ebenfalls einen Zusammenhang zwischen beta 1 Integrin und NCAM auf hSC und der Adhäsion an Karzinomzellen herstellen. Dies ist nicht gelungen, da die beiden Oberflächenmoleküle auf den hSC zwar exprimiert werden, aber in keinem Zusammenhang mit der Zell-Zell-Adhäsion zwischen den hSC und den Pankreaskarzinomzellen stehen. Andererseits ist es auch möglich, dass beta 1 Integrin auf hSC aufgrund des hohen Vorkommens durchaus eine wichtige Rolle spielt, aber einen bisher noch unbekanntem Bindungspartner auf Karzinomzellen hat, den es in der Zukunft zu identifizieren gilt. Die beiden Adhäsionsmoleküle beeinflussen sich jedoch auch gegenseitig stark: NCAM ist ein wichtiger Co-Rezeptor von Integrinen und trägt zur Zell-Zell-Adhäsion, Migration und axonalen Wachstum bei (Schmid und Maness 2008). NCAM interagiert dabei mit beta 1 Integrin, um das Signal zu verstärken und somit eine stabilere Bindung zur extrazellulären Matrix aufzubauen (Abb.65). Die dadurch eingeleitete Signalkaskade endet mit der Extracellular receptor kinase (ERK), was wiederum zu einer Phosphorylierung von CREB (cAMP response element binding protein) führt. Dieses phosphorylierte CREB ruft eine Gen-Transkription hervor und stimuliert damit das neuronale Wachstum (Schmid und Maness 2008).



**Abb. 65: NCAM als Co-Rezeptor von beta 1 Integrin.** Die induzierte Signalkaskade endet in der Phosphorylierung von CREB durch ERK, dadurch wird die Gen-Transkription aktiviert und es kommt zu einer vermehrten Migration bzw. zu axonalem Wachstum. Quelle der Abb: Schmid und Maness 2008

### 3.2 In Bezug auf Karzinomzellen

Nach Behandlung der Pankreaskarzinomzellen mit blockierenden beta 1 Integrin Antikörpern konnte eine signifikante Reduktion der adhärenenden Karzinomzellen festgestellt werden. Die Blockade von NCAM hingegen hatte keinen Effekt auf die Karzinomzelladhäsion an die hSC. NCAM Expression in Karzinomzellen konnte zuvor zwar schon dokumentiert werden, dennoch spielt dieses Molekül offenbar keine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion zwischen den hSC und den Pankreaskarzinomzellen (Kameda, Shimada et al. 1999). Beta 1 Integrin hingegen wurde bereits in vielen verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen und konnte die Zelladhäsion durch blockierende Antikörper verringern bzw. blockieren (Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Aufgrund dieser Erkenntnisse lässt sich schlussfolgern, dass beta 1 Integrin auf den Karzinomzellen, nicht aber auf den hSC, zur Zell-Zell-Adhäsion einen entscheidenden Beitrag leistet. Geht man allerdings von der Theorie aus, dass bei der neuralen Invasion Karzinomzellen an die Gliazellen adhären, ist nicht klar,

mit welchem Bindungspartner beta 1 Integrin auf den hSC interagiert. Weitere mögliche Adhäsionsmoleküle auf den hSC, die als Interaktionspartner in Frage kämen, sind z.B. N-Cadherin (Roy, Sahraei et al. 2011) und die myelin-assoziierten Glykoproteine (DiMagno, Reber et al. ; Swanson, McDermott et al. 2007). MAG konnte im Rahmen der neuralen Invasion im PCa bereits als ein potientes Molekül identifiziert werden, das an MUC-1 spezifisch bindet und somit zur Adhäsion zwischen hSC und Pankreaskarzinomzellen beiträgt (Swanson, McDermott et al. 2007). Die MUC-1 Expression hingegen ist im PCa mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert und führt zur verstärkten Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen (Roy, Sahraei et al. 2011). Die EMT ist ein biologischer Prozess, der aus einer polarisierten epithelialen Zellen, die Verbindungen mit der Basalmembran eingeht, eine mesenchymale Zelle mit verbesserten Migrations- und Invasionseigenschaften macht. Dieses Phänomen kann man im Laufe der embryonalen Entwicklung, bei verschiedenen Arten von Entzündungen oder bei epithelialen Tumoren beobachten (Kalluri und Weinberg 2009). Ein weiterer Effekt bei der EMT ist die Herunterregulierung der E-Cadherin Expression, um die Zell-Zell Kontakte aufzulösen und die Zell-Migration zu ermöglichen. E-Cadherin ist das wesentlich epitheliale Cadherin. Die Vimentin und N-Cadherin Expression nimmt im Zuge der EMT allerdings zu, da diese vor allem zum mesenchymalen Phänotyp zählen (Roy, Sahraei et al. 2011). Somit stellen sich MAG und N-Cadherin als potentiell geeignete Moleküle dar, die in Bezug auf die Interaktion mit beta 1 Integrin in Zukunft näher studiert werden sollten. Zukünftige Studien sollten mit Hilfe von ähnlichen Ansätzen wie in der vorliegenden Arbeit den Beitrag dieser Moleküle zur Adhäsion zwischen hSC und Pankreaskarzinomzellen untersuchen. Basierend auf zurückliegenden Studienergebnissen könnte beta 1 Integrin durchaus der Partner auf den Karzinomzellen sein, denn es ist in der Lage, an das Myelin der Gliazellen zu binden (Brakebusch und Fassler 2005; Swanson, McDermott et al. 2007).

## **4 Relevanz von beta 1 Integrin und NCAM in Bezug auf die Zellmigration**

Zur Untersuchung der Spezifität der tumorgerichteten Schwann-Zell-Migration wurde ein dreidimensionales, neuronales Migrationsassay durchgeführt. hSC hatten die Auswahl zwischen Pankreaskarzinomzellen auf der einen und Kolonkarzinomzellen bzw. Fibroblasten auf der anderen Seite. Boldis et al. (UEGW 2010, unpubliziert) konnten erstmals einen klaren Tropismus der hSC gegenüber den Pankreaskarzinomzellen nachweisen, indem die Gliazellen eine signifikante Affinität gegenüber den Pankreaskarzinomzellen zeigen und zielgerichtet zu ihnen migrieren. Auch in dieser vorgelegten Arbeit konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. In dem vorgestellten Ansatz war es offensichtlich, dass die Migration der hSC zu den Pankreaskarzinomzellen weitaus zielgerichteter und spezifischer war, als die Migration zu den Kolonkarzinomzellen bzw. Fibroblasten. Damit besteht nicht nur eine starke Affinität der Karzinomzellen zu den Nerven, sondern auch in umgekehrter Richtung. Der Neurotropismus der Pankreaskarzinomzellen zu den pankreatischen Nerven ist schon länger bekannt und im 3D-Migrationsmodell unter in vitro Bedingungen nachgewiesen (Ceyhan, Demir et al. 2008).

### **4.1 In Bezug auf Schwannsche Zellen**

Durch die Behandlung der hSC mit dem blockierenden Antikörper für das beta 1 Integrin konnte keine tumorgerichtete Migration der hSC zu den Pankreas- und Kolon-Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Studien, die zu diesem Thema bekannt sind, befassen sich jeweils mit der Blockade der Adhäsionsmoleküle auf Karzinomzellen und nicht auf Gliazellen (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009). Zusammen mit den bekannten und den neu eruierten Daten lässt sich schlussfolgern, dass die Blockade des beta 1 Integrin Moleküls auf den hSC keinen wesentlichen Einfluss auf die Migration der Gliazellen hat, aber jedoch evtl. einen Bindungspartner auf den Karzinomzellen besitzt, der einen möglichen Einfluss auf die Migration und Adhäsion hat. Dies gilt es in der Zukunft zu klären.

### **4.2 In Bezug auf Karzinomzellen**

Bei der beta 1 Integrin Antikörperblockade der Karzinomzellen zeigte sich eine verminderte Migration der hSC zu den antikörperbehandelten Pankreaskarzinomzellen. Zusammengefasst haben die hSC die unbehandelten

Karzinomzellen den behandelten Zellen vorgezogen und sind schneller, gerichteter und weiter in deren Richtung migriert. Beta 1 Integrin geht nicht allein Zell-Zell Kontakte ein, sondern interagiert durchaus auch mit der extrazellulären Matrix (Brakebusch und Fassler 2005). Wenn beta 1 Integrin nun durch den blockierenden Antikörper auf den Karzinomzellen ausgeschaltet worden ist, können beta 1 Integrin-assoziierte intrazelluläre Signalwege (extracellular receptor kinase/ERK, Phosphoinositide-3-Kinase/PI3K-AKT) ebenfalls nicht mehr funktionieren. Gerade die von ERK vermittelte Phosphorylierung von CREB führt zur Gen-Transkription und damit verbunden zur vermehrten Zellmigration (Schmid und Maness 2008). Integrine beeinflussen allgemein die Wachstumsfaktoren und Zytokinrezeptoren, sowohl auf Seiten der Tumor-, wie auch auf Seiten der Wirtszellen (Desgrosellier und Cheresch 2010). Ein Beispiel dafür liefern die Mitglieder der EGF (epidermal growth factor) Familie, wie EGFR und ERBB2. Eine erhöhte Expression von EGF Rezeptoren ist typisch für viele Tumoren, wie beispielsweise das PCa oder das Mammakarzinom (Guo, Pylayeva et al. 2006). In den Tumorzellen kommt es zu einem Zusammenschluss von Integrinen und Mitgliedern der EGF Rezeptor Familie, was zur Tumorprogression führt, incl. Proliferation, Migration und Invasion (Desgrosellier und Cheresch 2010). In diesem Zusammenhang ist es wichtig anzumerken, dass auch die beta 1 Integrin Moleküle im extrazellulären Matrixgel des Migrationsassays durch Antikörper blockiert sind. Dadurch bedingt können die hSC keine Interaktion mehr mit dem extrazellulären Matrixgel aufnehmen und die Migration wird inhibiert. Die Hemmung der Migration von Pankreaskarzinomzelllinien nach Behandlung mit Anti-beta 1 Integrin Antikörpern konnte in anderen Studien ebenfalls nachgewiesen werden (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009). Dabei wurde zuerst die Basismigration verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien beobachtet, nach Zugabe von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ I und IV, Laminin und Fibronectin stieg die Migration nochmals deutlich an (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009). Anschließend wurde der Effekt nach Zugabe von beta 1 Integrin blockierenden Antikörpern zu den Pankreaskarzinomzellen untersucht, und es konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die Migration dadurch drastisch reduziert wurde (Ryschich, Khamidjanov et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nicht die Auswirkungen der Antikörper-Behandlung auf die Migration der Karzinomzellen, sondern auf die Migration der hSC untersucht. So

ist hier dasselbe Phänomen wie beim Adhäsionsassay zu beobachten: Sobald die Karzinomzellen mit dem blockierendem beta 1 Integrin Antikörper behandelt werden, kommt es zu einer verminderten Adhäsion von Karzinomzellen und einer reduzierten Migration von hSC in Richtung der Karzinomzellen. So drängt sich der Verdacht auf, dass das Oberflächenmolekül beta 1 Integrin eine wichtigere Rolle auf den Karzinomzellen spielt als auf den hSC.

## **5 In vivo Übertragbarkeit der vorliegenden Ergebnisse**

Die Erkenntnisse, die durch diese Arbeit gewonnen wurden, wurden alle unter in vitro Bedingungen erhoben und lassen sich deshalb nicht problemlos auf Gegebenheiten in vivo übertragen. Über beta 1 Integrin gibt es bereits eine in vivo Studie, bei der die beta 1 Integrin Untereinheit bei humanen Pankreaskarzinomzellen ausgeschaltet worden ist und diese Zellen in das Pankreas von Mäusen implantiert wurden. Es konnte beobachtet werden, dass das primäre Tumorwachstum bei den beta 1 Integrin Knockdown-Mäusen signifikant geringer war als bei den Kontrollgruppen (Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Auch das Tumorgewicht und Volumen am Ende des Experiments war wesentlich kleiner. Interessanterweise wiesen die beta 1 Integrin Knockdown-Mäuse keinerlei Metastasen auf, wohingegen die anderen Mäuse Metastasen, vor allem im Mesenterium, in der Milz, Leber und am Peritoneum aufwiesen (Grzesiak, Tran Cao et al. 2011). Das beta 1 Integrin wird mittlerweile auch schon als potentiell therapeutisches Tool in klinischen Studien (Phase I und II) eingesetzt. Volociximab ist ein monoklonal blockierender Antikörper gegen die  $\alpha_5\beta_1$  Untereinheit und verhindert zum einen die Angiogenese und zum anderen das Tumorwachstum bei Melanomen oder Nierentumoren (Desgrosellier und Cheresch 2010). Die ersten Studien zeigen, dass das Präparat, bei soliden Tumoren eingesetzt, gut vertragen wird und dadurch eine Reduktion der Metastasierung erreicht wird (Ricart, Tolcher et al. 2008).

Durch die quantitative immunhistochemische Analyse der beiden Adhäsionsmoleküle an humanem Gewebe mit der Untersuchung an jedem angeschnittenen Nerv im PCa Gewebe, ist man den in vivo Bedingungen in diesem Projekt allerdings recht nah gekommen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass in vivo sowohl NCAM, als auch beta 1 Integrin im PCa in den Nerven

herunterreguliert wird. Dieses Phänomen ist wohl am ehesten durch die Nerven- und hSC Schädigung, die im Rahmen der neuralen Invasion immer vorhanden sind, zu erklären (Bockman, Buchler et al. 1994). Bedingt durch die Herunterregulierung ist die Rolle der beiden Adhäsionsmoleküle als Interaktionsstelle für die Karzinomzellen jedoch fraglich. Es ist also nicht genau klar, inwieweit beta 1 Integrin und NCAM direkt auf den hSC einen Einfluss auf das Invasionsgeschehen der Karzinomzellen haben.

Bisher existiert nur für die Beobachtung der Zellmigration ein funktionierendes *in vitro* Modell. Mithilfe des präsentierten Migrationsassays können die unterschiedlichen Zellwanderungen untersucht werden, bevor es zu der eigentlichen neuralen Invasion kommt (Ceyhan, Demir et al. 2008). Bevor dieses Modell etabliert war, existierten einige ähnliche *in vitro* Ansätze. Dabei wurden Spinalganglien und Pankreaskarzinomzellen in einem Matrixgel gemeinsam kokultiviert und man beobachtete das Neuriten- und Zellkoloniewachstum im Vergleich zu Monokulturen von Spinalganglien und Pankreaskarzinomzellen. Die Kokulturen hatten ein deutlich erhöhtes Neuritenwachstum und um 58% mehr Zellkolonien als die Kontrollkulturen (Dai, Li et al. 2007). Der Vorteil des mittlerweile etablierten 3D *in vitro* Migrationsassays besteht allerdings in der Trennung der verschiedenen Zellarten mit Hilfe der ECM-Brücken. Somit ist es möglich die Veränderungen an den einzelnen Zellen zu beobachten, bevor sie sich aufeinander zubewegen. Dadurch können die wertvollen frühen Phasen im Rahmen des Pathomechanismus der neuralen Invasion untersucht und entdeckt werden (Ceyhan, Demir et al. 2008).

Für die Zell-Zell-Adhäsion gab es bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeit kein etabliertes *in vitro* Modell beim PCa. In anderen Studien wurden Adhäsionsassays ebenfalls angewandt, jedoch jeweils in einer sehr spezifischen, auf bestimmte Zellen abgestimmten und nicht generell übertragbaren Art und Weise (Rosewicz, Wollbergs et al. 1997; Swanson, McDermott et al. 2007). Manche Autoren zentrifugieren die Platten, sobald die zweite Zelllinie aufgetragen wurde, um am Ende nur spezifische Zell-Zell-Verbindungen nachzuweisen (Issa, Nummer et al. 2009). Allerdings hat sich dieses System bei dieser Arbeit nicht als reproduzierbar und daher für diese spezifische Fragestellung als ungeeignet erwiesen.

## VI ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnose eines Pankreaskarzinoms geht trotz Anwendung aller bekannten Therapien mit einer infausten Prognose einher. Bei 90% der diagnostizierten PCa handelt es sich um ein Adenokarzinom. Diese bösartige Neoplasie ist besonders aggressiv, und die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten, die einer operativen Therapie nicht zugänglich sind, liegt unter 5%. Aufgrund der unklaren Symptomatik wird die Diagnose oft zu spät gestellt und bei nur ca. 10-20% der Betroffenen kann noch eine chirurgische Resektion des Tumors erfolgen. Der Grund dafür liegt in der schnellen Metastasierung des Karzinoms in die Leber, Milz, Mesenterium oder Peritoneum. Ein weiteres großes Problem stellt die neurale Invasion dar, die bei fast 100% der Patienten festgestellt werden kann. Dabei werden die intrapankreatischen Nerven von Karzinomzellen befallen, die sich entlang der neuralen Strukturen weiter bis in die extrapankreatisch, retroperitoneal gelegenen Plexus ausbreiten. Dadurch kommt es bei den Patienten zu starken neuropathischen Schmerzen und schnell auftretenden Lokalrezidiven.

Der Pathomechanismus der neuralen Invasion ist nicht vollständig geklärt. Neuere Forschungsarbeiten zeigen Zell-Zell-Interaktionen zwischen Glia- und Karzinomzellen als eine mögliche Ursache an. Dabei konnte beobachtet werden, wie das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) auf den hSC spezifisch an ein transmembranöses Mucin (MUC1) auf den Pankreaskarzinomzellen bindet. Allerdings konnte die Zell-Zell-Verbindung mit spezifischen Antikörpern gegen das MUC-1 bzw. gegen MAG nicht vollständig aufgehoben werden, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass noch andere Adhäsionsmoleküle bei der neuralen Invasion eine Rolle spielen. Die beiden Oberflächenmoleküle beta 1 Integrin und NCAM wurden bereits in diesem Zusammenhang im PCa untersucht und hierbei schien vor allem das beta 1 Integrin eine allgemein wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell Kontakten zu spielen.

Aufgrund der ausführlichen Expressionsanalyse mittels Immunhistochemie, Western Blot und qRT-PCR konnte festgestellt werden, dass das beta 1 Integrin in wesentlich größeren Mengen auf hSC vorhanden ist als das NCAM. Mit Hilfe der qRT-PCR konnte eine ca. 3400-fach höhere Expression von beta 1 Integrin auf hSC im Gegensatz zu NCAM eruiert werden. In der quantitativen

immunhistochemischen Analyse an intrapancreatischen Nerven konnte gezeigt werden, dass sowohl beta 1 Integrin, als auch NCAM in Nerven im PCa herunterreguliert wird. Bei NCAM konnte zusätzlich eine Herunterregulierung vor allem in stark von Karzinomzellen befallenen intrapancreatischen Nerven festgestellt werden. Dabei kommt es zu einer Reduktion der neuronalen Immunoreaktivität um ungefähr 20%. Das neu etablierte Adhäsionsassay zeigte, dass eine Antikörper-Behandlung der hSC mit beta 1 Integrin- und NCAM-blockierenden Antikörpern keinen Effekt auf die Zelladhäsion zwischen hSC und Pankreaskarzinomzellen ausübte. Eine Antikörper-Behandlung der Karzinomzellen mit beta 1 Integrin hingegen bewirkte eine Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion zwischen den genannten Zelllinien um bis zu 50%, wobei NCAM keinen dieser Effekte vorweisen konnte. Im Migrationsassay konnte der gezielte Tropismus der hSC zu den Pankreaskarzinomzellen reproduziert werden. Interessanterweise wiesen die hSC keine Affinität zu den Kolonkarzinomzellen bzw. Fibroblasten auf.

Die Herunterregulierung der beiden Adhäsionsmoleküle beta 1 Integrin und NCAM in Nerven im PCa kann möglicherweise auf die Verletzung und damit verbundene Apoptose der hSC zurückgeführt werden. Sowohl bei der Untersuchung der Adhäsion, wie auch der Migration bewirkt nur eine Behandlung der Karzinomzellen mit beta 1 Integrin blockierenden Antikörper eine Reduktion der adhärenzenden Zellen um bis zu 50% bzw. der gerichteten Migration. Dies lässt auf einen bis dato unbekanntem Bindungspartner von beta 1 Integrin auf den Schwannschen- bzw. Karzinomzellen schließen, den es in Zukunft zu identifizieren gilt. Sobald es möglich ist, die Zell-Zell-Adhäsion zwischen Glia- und Karzinomzellen in vitro vollständig zu unterbinden, können weitere Versuche in vivo fortgeführt werden. Dadurch ist es in Zukunft möglicherweise denkbar, die neurale Invasion im PCa bei Mensch und Tier zu unterbinden und die Prognose der PCa-Patienten so zu verbessern.

## VII SUMMARY

### **On the role of beta 1 Integrin and neural cell adhesion molecule (NCAM) in the heterotypic Schwann-cell-carcinoma cell-adhesion in pancreatic cancer**

Pancreatic cancer has an utmost dismal prognosis. 90 % of all diagnosed cases of pancreatic cancer are adenocarcinomas of the pancreas. This malignant neoplasia of the pancreas is extremely aggressive, and the patients' 5-year survival rate is less than 5 %. Due to lack of symptoms in the early phase, the diagnosis often comes too late, and only around 10-20% of all affected patients are candidates for a surgical resection of the tumor. Another major problem is that pancreatic cancer tends to metastasize early into the liver, spleen, mesentery or peritoneum. A further severe problem is the neural invasion which can be diagnosed in almost 100 % of patients. Here, nerves inside the pancreas are invaded by carcinoma cells which spread along neural structures until they reach retroperitoneal neural plexus which is behind the pancreas. As a result, strong pain and local relapses occur.

The pathomechanism of neural invasion has not been fully clarified, but recent research considers a cell-to-cell interaction between glia and carcinoma cells a possibility. It was possible to observe how myelin-associated glycoprotein (MAG) specifically binds to a trans-membranous Mucin (MUC-1) expressed on pancreatic cancer cells. The cell-to-cell link could, however, not be entirely disrupted by antibodies against MUC-1 and MAG, which leads to the conclusion that other adhesion molecules must also play a role in neural invasion. Beta 1 Integrin and NCAM, two adhesion molecules, are often mentioned in connection with pancreatic cancer. But their potential involvement in neural invasion has not yet been studied

An extensive expression analysis including immunohistochemistry, Western Blot and qRT-PCR revealed that beta 1 Integrin exists in significantly higher quantities on Schwann cells than NCAM. QRT-PCR demonstrated an approximately 3400-fold higher expression of beta 1 integrin on hSC unlike NCAM is identified. Analysis of nerves in human pancreatic cancer tissues showed that beta 1 Integrin as well as NCAM is down-regulated in intrapancreatic nerves of tumor tissues.

Additionally, NCAM displayed a down-regulation in nerves which were affected by neural invasion. This leads to a reduction of neuronal immunoreactivity to about 20%. The adhesion assay experiments revealed that treatment of Schwann cells with NCAM- or beta 1 integrin-blocking antibodies had no effect on the heterotypic cell adhesion between Schwann cells and pancreatic cancer cells. Treatment of pancreatic cancer cells with beta 1 Integrin blocking antibodies- but not with NCAM blocking antibodies- resulted in the reduction of cell-cell adhesion between Schwann cells and pancreatic cancer cells to 50%. The migration assay confirmed the Schwann cells' tropism towards pancreatic cancer cells. Interestingly, there was no affinity of Schwann cells towards colon cancer cells or fibroblasts.

The down-regulation of beta 1 Integrin and NCAM in intrapancreatic nerves in pancreatic cancer can possibly be interpreted as a result of nerve injury and entailing apoptosis of Schwann cells. Importantly, both in migration and adhesions assays, only the treatment of pancreatic cancer cells with anti- beta 1 Integrin-antibodies led to a reduction of in the Schwann cell-pancreatic cancer cell adhesion and the cancer-directed Schwann cell migration. These findings suggest the existence of a so far unknown binding partner of beta 1 Integrin on Schwann cells, which needs to be identified in future studies. Achieving the total disruption of the in vitro cell-cell adhesion between glia cells and carcinoma cells may pave the path for translation of these findings into in vivo studies and thereby contribute towards suppression of neural invasion in pancreatic cancer and improvement of its dismal prognosis.

## VIII LITERATURVERZEICHNIS

American Cancer Society Cancer Facts&Figures 2012. Atlanta, American Cancer Society: 65.

Acres, B. und J. M. Limacher (2005). "MUC1 as a target antigen for cancer immunotherapy." Expert Rev Vaccines **4**(4): 493-502.

Ben, Q. W., J. C. Wang, et al. (2010). "Positive expression of L1-CAM is associated with perineural invasion and poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma." Ann Surg Oncol **17**(8): 2213-2221.

Besmer, D. M., J. M. Curry, et al. (2011). "Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis." Cancer Res **71**(13): 4432-4442.

Bockman, D. E., M. Buchler, et al. (1994). "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." Gastroenterology **107**(1): 219-230.

Brakebusch, C. und R. Fassler (2005). "beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more." Cancer Metastasis Rev **24**(3): 403-411.

Büchler, W., W. Uhl, et al. (2004). Pankreaserkrankungen, Karger.

Burdick, M. D., A. Harris, et al. (1997). "Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines." J Biol Chem **272**(39): 24198-24202.

Cachau, R. E., E. H. Serspersu, et al. (1989). "Recognition in cell adhesion. A comparative study of the conformations of RGD-containing peptides by Monte Carlo and NMR methods." J Mol Recognit **2**(4): 179-186.

Ceyhan, G. O., F. Bergmann, et al. (2009). "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." Gastroenterology **136**(1): 177-186 e171.

Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2008). "Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **374**(3): 442-447.

Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2009). "Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer." Am J Gastroenterol **104**(10): 2555-2565.

Ceyhan, G. O., S. Deucker, et al. (2009). "Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis." Lab Invest **89**(3): 347-361.

Ceyhan, G. O., N. A. Giese, et al. (2006). "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." Ann Surg **244**(2): 274-281.

Ceyhan, G. O., C. W. Michalski, et al. (2008). "Pancreatic pain." Best Pract Res Clin Gastroenterol **22**(1): 31-44.

Ceyhan, G. O., K. H. Schafer, et al. (2010). "Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma." Ann Surg **251**(5): 923-931.

Christoph, H.-J. (2007). Klinik der Hundekrankheiten

257 Tabellen. Stuttgart, Enke.

Dai, H., R. Li, et al. (2007). "Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach." Hum Pathol **38**(2): 299-307.

Demir, I. E., G. O. Ceyhan, et al. (2010). "Neural Invasion in Pancreatic Cancer:

The Past, Present and Future." Cancers **2**(3): 1513-1527.

Demir, I. E., G. O. Ceyhan, et al. (2010). "The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity." Neurogastroenterol Motil **22**(4): 480-490, e112-483.

Desgrosellier, J. S. und D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.

Dhodapkar, K. M., D. Friedlander, et al. (2001). "Differential expression of the cell-adhesion molecule Nr-CAM in hyperplastic and neoplastic human pancreatic tissue." Hum Pathol **32**(4): 396-400.

DiMagno, E. P., H. A. Reber, et al. (1999). "AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association." Gastroenterology **117**(6): 1464-1484.

Ettinger, S. J. (2010). Textbook of veterinary internal medicine diseases of the dog and cat. Philadelphia, Saunders.

Fossum, T. W. (2009). Chirurgie der Kleintiere. München, Elsevier, Urban & Fischer.

Grzesiak, J. J., H. S. Tran Cao, et al. (2011). "Knockdown of the beta(1) integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis." Int J Cancer **129**(12): 2905-2915.

Guo, W., Y. Pylayeva, et al. (2006). "Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis." Cell **126**(3): 489-502.

Hanisch, F. G., T. R. Stadie, et al. (1996). "MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation." Eur J Biochem **236**(1): 318-327.

Hassan, M. O. und J. Maksem (1980). "The prostatic perineural space and its relation to tumor spread: an ultrastructural study." Am J Surg Pathol **4**(2): 143-148.

Hollingsworth, M. A. und B. J. Swanson (2004). "Mucins in cancer: protection and control of the cell surface." Nat Rev Cancer **4**(1): 45-60.

Horzinek, M. C. (2005). Krankheiten der Katze  
143 Tabellen. Stuttgart, Enke.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.

Issa, Y., D. Nummer, et al. (2009). "Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration." J Mol Med (Berl) **87**(1): 99-112.

Iwamoto, H., H. Sakai, et al. (1999). "Soluble Arg-Gly-Asp peptides reduce collagen accumulation in cultured rat hepatic stellate cells." Dig Dis Sci **44**(5): 1038-1045.

Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Jemal, A., R. Siegel, et al. (2006). "Cancer statistics, 2006." CA Cancer J Clin **56**(2): 106-130.

Kalluri, R. und R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.

Kameda, K., H. Shimada, et al. (1999). "Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion." Cancer Lett **137**(2): 201-207.

Kayahara, M., T. Nagakawa, et al. (1995). "Surgical strategy for carcinoma of the pancreas head area based on clinicopathologic analysis of nodal involvement and plexus invasion." Surgery **117**(6): 616-623.

Kayahara, M., H. Nakagawara, et al. (2007). "The nature of neural invasion by pancreatic cancer." Pancreas **35**(3): 218-223.

Kelly, D. M. und I. S. Benjamin (1995). "Pancreatic carcinoma." Ann Oncol **6**(1): 19-28.

Kenmotsu, M. (1990). "Relationship between perineurla Invasion and expression of neuro-endocrine markers and neural cell adhesion molecule in human pancreatic carcinoma." Jpn J Gastroenterol Surg **23**: 2580-2585.

Kessler, M. (2005). Kleintieronkologie

Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen ; 177 Tabellen. Stuttgart, Parey.

Kibbelaar, R. E., K. E. Moolenaar, et al. (1991). "Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma." Eur J Cancer **27**(4): 431-435.

Kleeberger, W., G. S. Bova, et al. (2007). "Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis." Cancer Res **67**(19): 9199-9206.

Knaebel, H. P., A. Marten, et al. (2005). "Phase III trial of postoperative cisplatin, interferon alpha-2b, and 5-FU combined with external radiation treatment versus 5-FU alone for patients with resected pancreatic adenocarcinoma -- CapRI: study protocol [ISRCTN62866759]." BMC Cancer **5**: 37.

Kraft, W. (2000). Kleintierkrankheiten. Stuttgart, Ulmer.

Kuhlbrodt, K., B. Herbarth, et al. (1998). "Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells." J Neurosci **18**(1): 237-250.

Lenz, J., P. Karasek, et al. (2011). "Clinicopathological correlations of nestin expression in surgically resectable pancreatic cancer including an analysis of perineural invasion." J Gastrointestin Liver Dis **20**(4): 389-396.

Li, D., K. Xie, et al. (2004). "Pancreatic cancer." Lancet **363**(9414): 1049-1057.

Liu, B. und K. Y. Lu (2002). "Neural invasion in pancreatic carcinoma." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **1**(3): 469-476.

Lowenfels, A. B. und P. Maisonneuve (2005). "Risk factors for pancreatic cancer." J Cell Biochem **95**(4): 649-656.

Maness, P. F. und M. Schachner (2007). "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration." Nat Neurosci **10**(1): 19-26.

Marchesi, F., L. Piemonti, et al. (2008). "The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Res **68**(21): 9060-9069.

Matter, M. L. und E. Ruoslahti (2001). "A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription." J Biol Chem **276**(30): 27757-27763.

Mazur, P. K. und J. T. Siveke (2011). "Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology." Gut.

McGavin, D. M. und J. F. Zachary (2009). Pathologie der Haustiere  
allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie

Pathologic basis of veterinary disease <dt.>. München, Urban & Fischer, Elsevier.

Minkus, G., C. Reusch, et al. (1991). "[Pathological changes of the endocrine pancreas in dogs and cats in comparison with clinical data]." Tierarztl Prax **19**(3): 282-289.

Nagakawa, T., M. Kayahara, et al. (1992). "Clinicopathological study on neural invasion to the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer." Hepatogastroenterology **39**(1): 51-55.

Nagakawa, T., M. Nagamori, et al. (1996). "Results of extensive surgery for pancreatic carcinoma." Cancer **77**(4): 640-645.

Nakao, A., T. Kaneko, et al. (2001). "The role of extended radical operation for pancreatic cancer." Hepatogastroenterology **48**(40): 949-952.

Nelson, R. W. (2006). Innere Medizin der Kleintiere

Small animal internal medicine <dt.>. München, Elsevier.

Nolte, I. (2000). Praxis der Onkologie bei Hund und Katze. Stuttgart, Enke.

Okusaka, T., S. Okada, et al. (2001). "Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings." Pancreas **22**(3): 279-284.

Petratos, S., H. Butzkueven, et al. (2003). "Schwann cell apoptosis in the postnatal axotomized sciatic nerve is mediated via NGF through the low-affinity neurotrophin receptor." J Neuropathol Exp Neurol **62**(4): 398-411.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Pour, P. M., H. Egami, et al. (1991). "Patterns of growth and metastases of

induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications." Gastroenterology **100**(2): 529-536.

Priester, W. A. (1974). "Data from eleven United States and Canadian colleges of veterinary medicine on pancreatic carcinoma in domestic animals." Cancer Res **34**(6): 1372-1375.

Ricart, A. D., A. W. Tolcher, et al. (2008). "Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study." Clin Cancer Res **14**(23): 7924-7929.

Rosewicz, S., K. Wollbergs, et al. (1997). "Retinoids inhibit adhesion to laminin in human pancreatic carcinoma cells via the alpha 6 beta 1-integrin receptor." Gastroenterology **112**(2): 532-542.

Roy, L. D., M. Sahraei, et al. (2011). "MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition." Oncogene **30**(12): 1449-1459.

Ryschich, E., A. Khamidjanov, et al. (2009). "Promotion of tumor cell migration by extracellular matrix proteins in human pancreatic cancer." Pancreas **38**(7): 804-810.

Sawai, H., H. Funahashi, et al. (2003). "Expression and prognostic roles of integrins and interleukin-1 receptor type I in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas." Dig Dis Sci **48**(7): 1241-1250.

Sawai, H., Y. Okada, et al. (2008). "Basement membrane proteins play an important role in the invasive processes of human pancreatic cancer cells." J Surg Res **144**(1): 117-123.

Schachner, M. und U. Bartsch (2000). "Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of

myelin." Glia **29**(2): 154-165.

Schmid, R. S. und P. F. Maness (2008). "L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth." Curr Opin Neurobiol **18**(3): 245-250.

Scholz, J. und C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci **10**(11): 1361-1368.

Schoppmeyer, K. und J. Mossner (2003). "[Esophagus, stomach, liver, pancreas carcinoma. What recommendations for prevention?]." MMW Fortschr Med **145**(16): 30-33, 35.

Seki, H., K. Koyama, et al. (1995). "Neural cell adhesion molecule and perineural invasion in gallbladder cancer." J Surg Oncol **58**(2): 97-100.

Seki, H., J. Tanaka, et al. (1993). "Neural cell adhesion molecule (NCAM) and perineural invasion in bile duct cancer." J Surg Oncol **53**(2): 78-83.

Seki, T. und Y. Arai (1993). "Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system." Neurosci Res **17**(4): 265-290.

Song, X. Y., F. H. Zhou, et al. (2006). "Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice." J Neurochem **96**(3): 833-842.

Stupack, D. G., X. S. Puente, et al. (2001). "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." J Cell Biol **155**(3): 459-470.

Swanson, B. J., K. M. McDermott, et al. (2007). "MUC1 is a counter-receptor for myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion." Cancer Res **67**(21): 10222-10229.

Takahashi, T., H. Ishikura, et al. (1992). "Intra-pancreatic, extra-tumoral perineural invasion (nex). An indicator for the presence of retroperitoneal neural plexus invasion by pancreas carcinoma." Acta Pathol Jpn **42**(2): 99-103.

Takahashi, T., H. Ishikura, et al. (1997). "Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas." J Surg Oncol **65**(3): 164-170.

Tezel, E., Y. Kawase, et al. (2001). "Expression of neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer." Pancreas **22**(2): 122-125.

Thomas, S. K., C. A. Messam, et al. (2004). "Nestin is a potential mediator of malignancy in human neuroblastoma cells." J Biol Chem **279**(27): 27994-27999.

Trapp, B. D., S. B. Andrews, et al. (1989). "The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes." J Cell Biol **109**(5): 2417-2426.

Vincent, A., J. Herman, et al. (2011). "Pancreatic cancer." Lancet **378**(9791): 607-620.

Vyas, A. A., H. V. Patel, et al. (2002). "Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8412-8417.

White, D. E., N. A. Kurpios, et al. (2004). "Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction." Cancer Cell **6**(2): 159-170.

Zhu, Z., H. Friess, et al. (1999). "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." J Clin Oncol **17**(8): 2419-2428.

Zitzmann, S., V. Ehemann, et al. (2002). "Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-

---

peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo." Cancer Res **62**(18): 5139-5143.

## IX ANHANG

### 1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bzw.	beziehungsweise
CH	Schweiz
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	<i>dorsal-root-ganglion</i> (Hinterhorn ganglien)
ECL	<i>enhanced Chemolumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular receptor kinase</i>
EUS	endoskopischer Ultraschall
evtl.	eventuell
FCS	<i>Fetal calf serum</i>

FMI	<i>Forward Migration Index</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GER	Deutschland
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hSC	Humane Schwannsche Zellen
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IPMN	intraduktale papilläre muzinöse Neoplasien
MCN	muzinöse zystische Neoplasien
min.	Minuten
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
nex	intrapankreatische extratumorale perineurale Invasion
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NP	Normales Pankreas
ns.	nicht signifikant
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCa	Pankreaskarzinom
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PI3K-AKT	Phosphoinositide-3-Kinase

PVDF	Polyvinylidene Fluoride
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
SDS-PAGE	<i>sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis</i>
sec.	Sekunden
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
TBST	<i>Tris-buffered-saline with Tween20</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TrkA	Neurotropher Tyrosin Kinase Rezeptor Typ 1
T-Zellen	T(Tymus)-Lymphozyten
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	<i>United States of America</i>
ZNS	Zentralnervensystem

## 2      **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Die Struktur von Integrinen. ....	22
Abb. 2: Die Struktur der Ig Superfamilie.....	24
Abb. 3: Pipettierschema für Migrationsassays ohne Antikörper (AK)-Behandlung.....	34
Abb. 4: Pipettierschema für Migrationsassays bei AK-Behandlung der hSC.....	34
Abb. 5: Pipettierschema für Migrationsassays bei AK-Behandlung der SU86.86. ....	35
Abb. 6: Auswertung des Migrationsassays.....	37
Abb. 7: Schema einer mit hSC beschichteten 96 well Platte. ....	38
Abb. 8: Beispiel einer Zellfärbung mit Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit von Invitrogen. .....	39
Abb. 9: Auswertung eines Adhäsionsassays mittels Image J. ....	41
Abb. 10: Auswertung der Immunhistochemie mittels Image J.....	47
Abb. 11: Darstellung der graduell unterschiedlichen neuralen Invasion (Grad 0, 1 und 2). .....	48
Abb. 12: Funktionsweise des Wet-Blottens. ....	58
Abb. 13: Vorgehensweise bei der Auswertung der Western Blots. ....	60
Abb. 14: Darstellung der Fluoreszenzzunahme im Laufe einer qRT-PCR.....	69
Abb. 15: Schmelzkurve von beta 1 Integrin. ....	70
Abb. 16: Schmelzkurve von Cyclophilin B. ....	70
Abb. 17: Immunoreaktion von beta 1 Integrin im normalen Pankreas (NP). ....	74
Abb. 18: Immunoreaktion von beta 1 Integrin im PCa. ....	75
Abb. 19: Immunoreaktion von NCAM im normalen Pankreas (NP).....	75
Abb. 20: Immunoreaktion von NCAM im PCa. ....	76
Abb. 21: Western Blot-Analyse des beta 1 Integrin Rezeptors in hSC.....	77
Abb. 22: Western Blot-Analyse des NCAM Rezeptors in hSC.....	79
Abb. 23: Western Blot-Analyse von beta 1 Integrin im PCa und NP.....	81
Abb. 24: Western Blot-Analyse von NCAM im PCa und NP. ....	82
Abb. 25: Western Blot-Analyse von beta 1 Integrin in Karzinomzelllinien. ....	84
Abb. 26: Western Blot-Analyse von NCAM in Karzinomzelllinien. ....	85
Abb. 27: Schmelzkurve von beta 1 Integrin in den hSC-Passagen P3, P6 und P9. ....	86
Abb. 28: Schmelzkurve von NCAM in den hSC Passagen P3, P6 und P9.....	86
Abb. 29: Relative Expression von beta 1 Integrin und NCAM in den einzelnen hSC Passagen.....	87
Abb. 30: Relative Expression der Adhäsionsmoleküle beta 1 Integrin und NCAM auf hSC. ....	88
Abb. 31: Relative Expression von beta 1 Integrin im PCa und NP. ....	89
Abb. 32: Relative Expression von NCAM im PCa und NP.....	89

Abb. 33: Relative Expression von beta 1 Integrin in Karzinomzelllinien.....	90
Abb. 34: Relative Expression von NCAM in Karzinomzelllinien.....	91
Abb. 35: Neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin im NP und PCa.....	92
Abb. 36: Neurale Immunorektivität von beta 1 Integrin im PCa bei graduell unterschiedlicher neuraler Karzinomzell-Invasion.....	93
Abb. 37: Neurale Immunoreaktivität von beta 1 Integrin im PCa in Abhängigkeit vom Schweregrad der Schmerzempfindung (0, I, II).....	94
Abb. 38: Neurale Immunoreaktivität von NCAM im NP und PCa.....	94
Abb. 39: Neurale Immunorektivität von NCAM im PCa bei graduell unterschiedlicher neuraler Karzinomzell-Invasion.....	95
Abb. 40: Neurale Immunoreaktivität von NCAM im PCa in Abhängigkeit vom Schweregrad der Schmerzempfindung (0, I, II).....	96
Abb. 41: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	97
Abb. 42: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	98
Abb. 43: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	99
Abb. 44: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	100
Abb. 45: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	101
Abb. 46: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	102
Abb. 47: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	103
Abb. 48: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	103
Abb. 49: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	104
Abb. 50: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	105
Abb. 51: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	105
Abb. 52: Adhäsion von PCa-Zellen an hSC.....	106
Abb. 53: Migrationsgeschwindigkeit der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit BJ-Zellen.....	107
Abb. 54: Euklidische Migrationsstrecke der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit BJ-Zellen.....	108
Abb. 55: Forward Migration Index der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit BJ-Zellen.....	109
Abb. 56: Migrationsgeschwindigkeit der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit DLD-1-Zellen.....	110
Abb. 57: Euklidische Migrationsstrecke der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit DLD-1-Zellen.....	110
Abb. 58: Forward Migration Index der hSC bei deren simultaner Konfrontation mit T3M4- und mit DLD-1-Zellen.....	111
Abb. 59: Migrationsgeschwindigkeit der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der hSC.....	113

---

Abb. 60: Euklidische Migrationsstrecke der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der hSC.. .....	114
Abb. 61: Forward Migration Index der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der hSC. ....	115
Abb. 62: Migrationsgeschwindigkeit der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der SU86.86.....	116
Abb. 63: Euklidische Migrationsstrecke der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der SU86.86. ....	117
Abb. 64: Forward Migration Index der hSC hin zu den SU86.86 Zellen bei unterschiedlichen Behandlungen der SU86.86.....	118
Abb. 65: NCAM als Co-Rezeptor von beta 1 Integrin.....	125

### 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkulturmedien inkl. Zusätze .....	29
Tabelle 2: Zusammensetzung der Lösungen für IHC .....	44
Tabelle 3: Zusammensetzung der Lösungen für Western Blot .....	52
Tabelle 4: Zusammensetzung des Master Mix für DNase Verdau.....	65
Tabelle 5: Zusammensetzung des Master Mix für die cDNA Synthese .....	66
Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription .....	66
Tabelle 7: Zusammensetzung des Master Mix für die PCR.....	67
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der PCR.....	68
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die qRT-PCR bezogen auf ein Well .....	71
Tabelle 10: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR .....	71

## **X DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Güralp O. Ceyhan für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Beratung, die Unterstützung zu jeder Zeit und die konstruktive und gute Zusammenarbeit. Unsere wöchentlichen Labmeetings haben dazu beigetragen, dass ich mein Projekt schnell und zügig vorantreiben konnte.

Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger vom Institut für Tierphysiologie danke ich für die freundliche und unkomplizierte Betreuungsübernahme dieser Arbeit am Fachbereich.

Meinem Betreuer innerhalb der AG Ceyhan, Dr. Ekin Demir, gilt ein besonders großer Dank! Du warst in allen Phasen der Arbeit ein hilfsbereiter, kompetenter und unverzichtbarer Ansprechpartner. Durch dich hab ich sehr viel über Labor- und wissenschaftliches Arbeiten gelernt. Du hast mich zu selbstständigem Denken erzogen und mich bei den vielen Rückschlägen während des Projektes immer wieder aufgebaut. Vielen Dank für alles!

Allen Mitgliedern der AG Ceyhan möchte ich für die schöne, unvergessliche Zeit im Labor danken. Ulrike Bourquain, danke für die herzliche Aufnahme und Einarbeitung im Labor! Dr. Daniel Hartmann, danke für Aufmunterungen und lieben Worte zwischendurch! Steffi Werscher, danke für die lustigen, albernen aber auch ernsten Stunden im Labor! Aber auch allen anderen ein herzliches Dankeschön, unsere gemeinsamen Feiern werde ich nicht so schnell vergessen!

Ein Dank gilt auch Dr. Timo Kehl, der mich in der Anfangszeit des Projektes tatkräftig unterstützt hat und mir viele wichtigen Tipps mit auf den Weg gegeben hat.

Natascha Klose, Lieblingskollegin, du bist mir während der Zeit im Labor sehr ans Herz gewachsen. Wir haben gemeinsam nicht enden wollenden Adhäsionsassays, Western Blots ohne Signal, unendlichen Mikroskopier Stunden usw. getrotzt und haben es nun geschafft. Danke!

Bei meinem Mann Reiner Brunner möchte ich mich herzlich für die Unterstützung, die Motivation, die entgegengebrachte Geduld im alltäglichen Umgang und den Verzicht auf so manche gemeinsamen Stunden bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meinen tollen Eltern und meinem Bruder Max, die niemals Zweifel an meinem Gelingen aufkommen ließen und mich immer während des gesamten Studiums und der Promotionsarbeit liebevoll unterstützt haben.

Und an alle anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: DANKE!