

Chirurgische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Friess)

**Die Charakterisierung des Aktivierungszustandes der humanen Schwannschen  
Zellen in der pankreatischen Neuropathie im Pankreaskarzinom**

**Elke Tieftrunk**

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

**Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. G. O. Ceyhan

2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 30.07.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch  
die Fakultät für Medizin am 30.01.2013 angenommen.

*In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet*

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BCA	Bicinchoninic acid
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BSA	Bovine serum albumin
CA19-9	Carbohydrate antigen
CA-IX	Carboanhydrase IX
CCL	(C-C motif) ligand
CGRP	Calcitonin gene-relate peptide
CT	Computertomographie
d	Tag/e
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme linke immunosorbent assay
Epo	Erythropoetin
ERBB2	Human epidermal growth factor receptor 2
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FCS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAPDH	Gluceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyten-colony-stimulating factor
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein

Glut-1	Glucose transporter-1
h	Stunde/n
HIF	Hypoxia inducible factor
HNO-Trakt	Hals-Nasen-Ohren-Trakt
HRP	Horseradish peroxidase
hSc	Humane Schwannsche Zelle/n
IF $\gamma$	Interferon gamma
IGF	Insulin like growth factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP10	Interferon gamma induced protein
L1-CAM	L1-cell-adhaesion-molecul
LIF	Leukozyten
m	Minute/n
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches-Protein-1
MIP	Macrophage inflammatory protein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NGF	Nerve growth factor
NTN	Neurturin
PCa	Pankreaskarzinom
PDGF	Platelet-derived growth factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
rpm	rounds per minute
SFM	Serumfreies Medium
TEMED	Tetramethylethan-1,2-diamin

TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
µg	Microgramm
µl	Microliter
ÜS	Überstand
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

**Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation werden bei einem wissenschaftlichen Peer-Review-Journal mit dem folgenden Titel eingereicht:**

*„Hypoxia and neuro-inflammation induce an activated, pro-inflammatory Schwann cell phenotype in pancreatic cancer“*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
Pankreaskarzinom .....	9
Pankreatische Neuropathie und Schmerz .....	11
Neuropathie und gliale Aktivierung .....	12
Tumorhypoxie im Pankreaskarzinom .....	16
Hypoxie und gliale Aktivierung im zentralen Nervensystem .....	18
<b>Ziele der Studie</b> .....	<b>20</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
Reagenzien .....	22
Geräte.....	23
Verbrauchsmaterial .....	24
Patienten und Gewebe .....	24
Immunhistochemie (Carboanhydrase IX) .....	24
Zellkultur .....	25
Ko-Kultur.....	26
Hypoxie.....	26
Pankreaskarzinomzell-konditionierte Medien .....	26
Behandlung der Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzell-konditionierten Medien für Immunoblot-	
Analysen .....	27
Behandlung der Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzell-konditionierten Medien für	
Immunfluoreszenz-Färbungen.....	27
Fluoreszenz-Immunzytochemie.....	28
Quantitative Erfassung der humanen Schwann-Zellfläche .....	28
Immunblot.....	28
MTT .....	29
Multiplex-Elisa .....	29

Statistische Auswertung .....	30
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
Die Hypoxie führt zur Hochregulation der Intermediärfilamente in den hSc .....	31
Die Hypoxie unterstützt die Entstehung eines neurotrophen Milieus durch Steigerung der Neurotrophin-Sekretion aus den hSc .....	32
Die Entstehung eines proinflammatorischen Gliazellphänotyps wird durch Hypoxie induziert.....	34
Die Überstände hypoxischer hSc haben keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von humanen Pankreaskarzinomzellen .....	38
Die Hypoxie im Pankreaskarzinom hat einen direkten Einfluss auf die intrapankreatische Nerven.....	39
Die Behandlung der hSc mit Pankreaskarzinomzellüberständen führt zu keiner evidenten Hochregulierung der Intermediärfilamente .....	41
Pankreaskarzinomzellen, jedoch nicht Kolonkarzinomzellen vermitteln eine vermehrte Proliferation der hSc .....	43
Die Kultivierung der hSc mit Pankreaskarzinomzell-Überständen führt zu einer Hypertrophie und „Stellatisierung“ der hSc .....	44
Co-Kultivierung von Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzellen und T-Lymphozyten verstärkt die Expression von GFAP in den Schwannschen Zellen .....	46
<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
<b>Zusammenfassung und Schlussfolgerung .....</b>	<b>55</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>57</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>61</b>

# Einleitung

## Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist heute nicht vor allem durch seine Häufigkeit (10. Stelle der neu aufgetretenen Krebsfälle, 3% der neu aufgetretenen Krebsfälle) in aller Munde, sondern vor allem durch seine beängstlich hohe Letalität (4. Stelle der krebisbedingten Todesfälle, 6% (m), bzw. 7% (w) aller krebisbedingten Todesfälle) (Siegel et al. 2011). Die Anzahl der Pankreaskarzinom-Neuerkrankungen pro Jahr entspricht in etwa der Anzahl der Todesfälle pro Jahr, die durch das Pankreaskarzinom verursacht werden (Parkin et al. 2001; Siegel et al. 2011).

Eine Korrelation besteht vor allem zwischen dem Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose und dem Überleben. So zeigen lokal begrenzte Tumoren eine 5-Jahres-Überlebensrate von 23%, regional fortgeschrittene Karzinome von 9% und Pankreaskarzinome mit Fernmetastasen von nur 2% (Siegel et al. 2011). Insgesamt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei allen Stadien des Pankreaskarzinoms 6% (DiMagno et al. 1999). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind 8% der Pankreaskarzinome lokal begrenzt, 26% regional fortgeschritten und 53% bereits fernmetastasiert (Siegel et al. 2011).

In den letzten Jahren konnte eine steigende Inzidenz für das Pankreaskarzinom verzeichnet werden. Zu den Risikofaktoren für die Entstehung des Pankreaskarzinoms werden höheres Lebensalter, Rauchen, familiäre Disposition, hereditäre und chronische Pankreatitis, familiäre Krebs-Syndrome, Diabetes mellitus Typ II ohne Prädisposition bzw. Risikofaktoren für Diabetes, sowie ein erhöhter Body-Mass-Index diskutiert.

Durch die häufige Lokalisation der meisten Pankreaskarzinome im Pankreaskopf (65%) (Ghaneh et al. 2007) und der damit engen anatomischen Beziehung zum Gallengang, bieten die Patienten häufig das klinische Bild eines schmerzlosen Ikterus oder einer akuten Pankreatitis. Im Pankreaskörper- und -schwanz ist das Pankreaskarzinom eher seltener zu finden (15 und 10%) (Ghaneh et al. 2007), jedoch wenn vorhanden, haben diese Patienten meist eine schlechtere Prognose, da diese

Tumore oft nur sehr selten oder nur in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch werden. Zu 50% der Fälle sind die Patienten bei Erstdiagnose eher symptomlos. Die symptomatischen Pankreaskarzinom-Patienten präsentieren sich häufig mit einer meist epigastrischen Schmerzsymptomatik, wenn im Kopf lokalisiert oder mit Rückenschmerzen, wenn der Tumor im Pankreaskörper bzw. -schwanz liegen (Ghaneh et al. 2007; Siegel et al. 2011) .

Trotz kontroverser Diskussionen bietet sich bei einem klinischem Verdacht auf ein Pankreaskarzinom die laborchemische Bestimmung von CA19-9 an, welches sich gegenüber den anderen Tumormarkern durchgesetzt hat (Pleskow et al. 1989; Posner et al. 1994) . In der Diagnostik weiter von Nutzen ist der transabdominelle Ultraschall, der Raumforderungen ab einer Größe von über 2 cm, Pankreas- und Gallengangserweiterungen, sowie eventuelle Lebermetastasen mit einer Genauigkeit von 75% darstellen kann (Minniti et al. 2003; Ghaneh et al. 2007) . Der Goldstandard in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms ist jedoch weiterhin die Kontrastmittel-gestützte CT-Untersuchung mit einer Genauigkeit von 97 % (Catalano et al. 2003) . Ein essentieller Endpunkt der Diagnostik ist die Beantwortung der Frage nach der Resektabilität. So können zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nur ein Bruchteil (10-15 %) der Patienten potentiell kurativ operiert werden. Bei diesen kurativ operablen Patienten wird meist eine pyloruserhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie nach Kausch-Whipple durchgeführt (Seiler et al. 2000; Tran et al. 2004) . Eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine, führt zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens mit deutlich geringeren Nebenwirkungen als das 5-Fluoruracil (Neoptolemos et al. 2010) . Bei den nicht kurativ resektablen Patienten, die einen Großteil des Patientenguts ausmachen, wird ein palliatives Regime mit Chemotherapie mit Gemcitabine plus Capecitabine oder einem Platin-Medikament sowie eine symptomatische Therapie und Symptomkontrolle angestrebt (Ying et al. 2012) .

In diesem Patientenkollektiv zeigen neuere Studien einen Überlebensvorteil des FOLFIRINOX-Schemas (Fluoruracil, Leucovirin, Irinotecan und Oxaliplatin) gegenüber einer Therapie mit Gemcitabine, die jedoch auch mit einer höheren Toxizität vergesellschaftet ist (Giuliani et al. 2012) . Daher ist das FOLFIRINOX-Schema als eine 2nd-line Option für Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und

gutem Allgemeinzustand anzusehen (Conroy et al. 2011) . Es wurde auch gezeigt, dass eine Kombination von Gemcitabine und Erlotinib einen minimalen Überlebensvorteil bringen kann, vorausgesetzt der Patient spricht auf Erlotinib gut an (Ying et al. 2012) .

Häufig mindern die schwer zu bewältigenden Schmerzen die Lebensqualität der Patienten erheblich. Oft ist eine Hochdosis-Analgetika-Therapie erforderlich, sowie alternativ eine Plexus-coeliacus-Blockade oder thorakoskopische Splanchniektomie (Wong et al. 2004) . Dem ausgeprägten Gewichtsverlust wird versucht mit der Gabe von Pankreasenzymen entgegenzuwirken (Bruno et al. 1998) und biliäre und duodenale Obstruktion durch ERCP-gestützte Stent-Einlagen zu entlasten (Maire et al. 2006) (Ghaneh et al. 2007) .

## **Pankreatische Neuropathie und Schmerz**

Im Pankreaskarzinom kommt es zu spezifischen Veränderungen der neuralen Strukturen. Bei bis zu 100% aller Patienten mit Pankreaskarzinom kann eine intra- und extrapancreatische perineurale Invasion durch Krebszellen nachgewiesen werden (Bockman et al. 1994; Nakao et al. 1996; Ceyhan et al. 2009) . Der zunehmende Schweregrad der intrapancreatischen neuralen Invasion erhöht das Risiko der kontinuierlichen neuralen Metastasierung zu den unmittelbar anliegenden extrapancreatischen Nervenplexi, was wiederum vermehrt zu abdominellen Schmerzen führt, die Rate an kurativen Resektionen senkt und somit das Überleben der Patienten nachhaltig limitiert (Ceyhan et al. 2009; Demir et al. 2012) . Im Rahmen der neuralen Invasion kommt es durch die hohe Aggressivität der Pankreaskarzinomzellen zu einer fortschreitenden Destruktion der intrapancreatischen Nervenintegrität, weiterer endoneuraler Invasion und letztendlich Zerstörung der gesamten Nervengeflechts. Ein weiteres neurales Phänomen im Pankreaskarzinom ist gekennzeichnet durch die pankreatische Neuroplastizität. Dies ist vor allem durch eine Zunahme der Nerven-Dichte sowie eine Hypertrophie der intrapancreatischen Nerven gekennzeichnet (Ceyhan et al. 2009) . Diese Veränderungen stehen unmittelbar mit dem Schweregrad der neuralen Invasion in einem Zusammenhang, denn um so stärker das neurale Netz-

werk ist und umso größer die betroffenen Nerven sind, umso mehr und stärker ausgeprägt liegt die neurale Karzinomzellinvasion vor. Darüberhinaus gibt es einen Zusammenhang zwischen der Stärke der desmoplastischen oder fibrotischen Reaktion im Pankreasgewebe und dem Ausmaß der neuralen Invasion (Ceyhan et al. 2009). Es ist auffällig, dass Patienten mit starken abdominellen Schmerzen einen höheren Schweregrad der neuralen Invasion und stärkere Nervenhypertrophie im Vergleich zu schmerzlosen Patienten zeigen. Ein weiteres pathomorphologisches Merkmal im Pankreaskarzinom ist das Vorhandensein der charakteristischen pankreatischen Neuritis. Hierbei kommt es zu einer zielgerichteten Infiltration der Nerven durch Entzündungszellen, die das Perineurium der pankreatischen Nerven zerstören und sich im Endoneurium weiter ausbreiten. Diese schwere endoneurale Neuritis kann in 62% der Fälle nachgewiesen werden und korreliert mit der gesteigerten Nervendichte im Pankreaskarzinom (Ceyhan et al. 2009).

## **Neuropathie und gliale Aktivierung**

Nozizeptiver Schmerz entsteht durch die Wahrnehmung von starken oder schmerzhaften Stimuli über Nozizeptoren, Übermittlung von Aktionspotentialen zum Rückenmark und Weiterleitung zum Gehirn. Im Gegensatz dazu entsteht neuropathischer Schmerz in Abwesenheit eines schmerzhaften Stimulus. Für die Entstehung von neuropathischen Schmerzen sind nicht nur Neurone, sondern auch eine Vielzahl von anderen Zellen, wie Schwannsche Zellen, Immunzellen und Gliazellen des zentralen Nervensystems, verantwortlich (Scholz et al. 2007). Daher ist das Verständnis über den Beitrag von Immun- und Gliazellen bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen essentiell, da dessen Erforschung sicherlich in Zukunft zu neuen Methoden der Behandlung von neuropathischen Schmerzen führen wird.

Bei einer Schädigung peripherer Nerven (Abb. 1) kommt es zu einer Reaktivierung des Immunsystems und der Gliazellen (Abb. 2). Hierbei sezernieren aktivierte Makrophagen und denervierte Schwannsche Zellen Matrix-Metalloproteasen, welche die Basallamina der endoneuralen Blutgefäße schädigen und so zu einer Störung der Blut-Nerven-Schranke führen (Shubayev et al. 2006). Vasoakti-

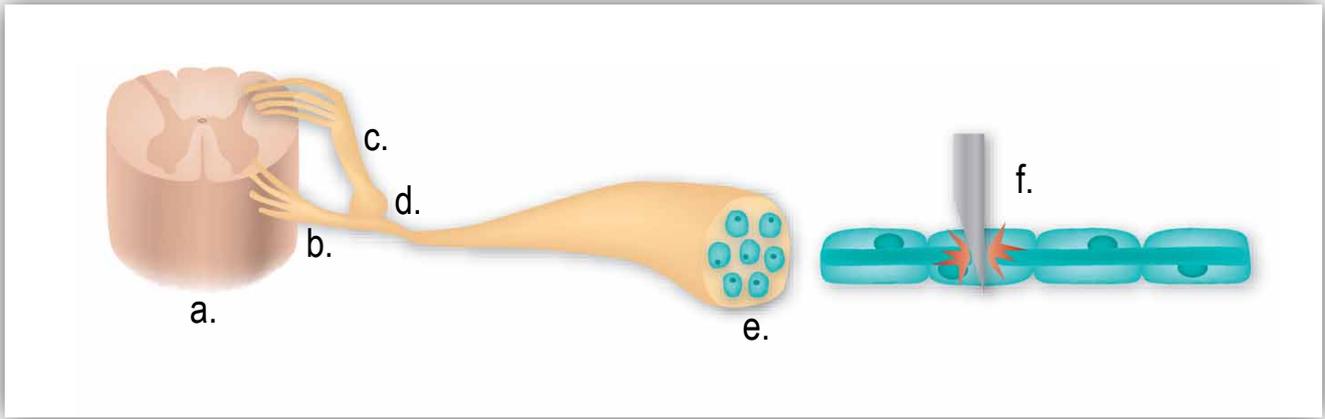
ve Mediatoren wie Calcitonin gene-related Peptid (CGRP), Substanz P, Bradykinin und Stickstoff werden von den geschädigten Axonen freigesetzt und führen zu einer Hyperämie und Ödembildung (Zochodne et al. 1999) . Durch die erhöhte Blutzirkulation kommt es zur Invasion weiterer Immunzellen, vor allem von Makrophagen, welche zur Beseitigung der distalen degenerierten Axone und des Myelin-Zell-Debris beitragen. Die Phagozytose durch die Makrophagen ermöglicht es den Schwannschen Zellen sich zu reorganisieren und bildet die Basis für die Reparatur der geschädigten Axone (Stoll et al. 2002) (Abb. 3).

Durch die Schädigung der Axone kommt es zur Freisetzung von Neuregulin, welches über einen Tyrosinkinase-Pathway (ERBB2) zu einer Proliferationssteigerung in den Schwannschen Zellen führt (Carroll et al. 1997) . Die Schwannschen Zellen setzen chemische Botenstoffe frei (z.B. NGF und GDNF), welche retrograd zu den neuronalen Zellkörpern transportiert werden und so zur Remyelinisierung und Axonenwachstum beitragen. Diese Botenstoffe können auch direkt Nozizeptoren aktivieren und somit die Schmerz Wahrnehmung nach einer Nervenverletzung herbeiführen (Malin et al. 2006) .

Die einzelnen Neurone, Schwannsche Zellen und Immunzellen sind über ausgeprägte Signalwege untereinander stark vernetzt. Weiterhin spielen Chemokine und Zytokine in diesem Netzwerk eine große Rolle. Schwannsche Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen schütten dabei Prostaglandine (Ma et al. 2003) , proinflammatorische Zytokine, wie Interleukine 1 $\beta$ , 6, 12 und 18, Interferon- $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor sowie Zytokine mit immunregulatorischer Wirkung wie z.B. das Interleukin-10 aus (Tofaris et al. 2002) . Rezeptoren für die Chemokine sind vor allem auf den Gliazellen zu finden (Tofaris et al. 2002) . Diese pro-inflammatorischen Zytokine können eine Schädigung der Axone induzieren (Keswani et al. 2003) und zu einer spontanen Nozizeptoraktivität und einer Erhöhung der Stimulus-Sensitivität führen (Schafers et al. 2003; Cunha et al. 2005; Wolf et al. 2006) . Interleukin 1 führt zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung von NGF durch die Schwannschen Zellen (Lindholm et al. 1987) . So sind diese verschiedenen Signalwege Bestandteile eines komplexen Netzwerkes der Reaktionen von Neuronen, Gliazellen und Immunzellen. Ziel dieser Veränderungen im Rahmen einer Nervenschädigung ist eigentlich die Adaptation im Sinne eines Axonenwachstums und

Überleben des Nervens mit Wiederherstellung seiner Funktion. Diese verschiedenen Antworten der Zellen auf die Schädigung des Nervens können jedoch auch im Rahmen einer Maladaptation zur Entstehung von persistierenden Schmerzen beitragen. Diese Maladaptation basiert aber nicht nur auf Ebene der peripheren Nerven, sondern auch auf Veränderungen bzw. Aktivierung der zentralen Gliazellen und einer zentralen Immunantwort der Mikroglia, sowohl im Rückenmark als auch im Gehirn (Beggs et al. 2007; Hu et al. 2007) .

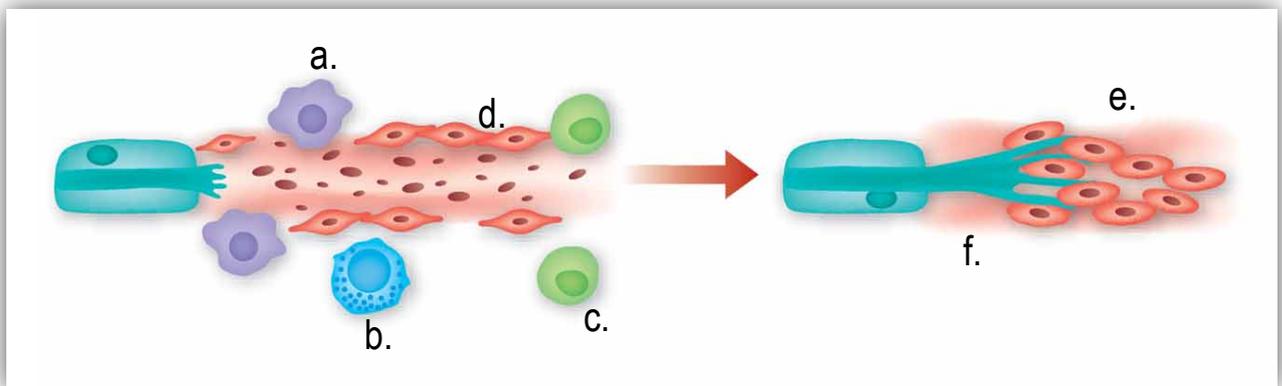
Das aktuelle Behandlungsregime für neuropathische Schmerzen besteht aus Medikamenten, die die Exzitabilität der Neurone im zentralen und peripheren Nervensystem durch Veränderung der Ionenkanäle (Gabapentin, Pregabalin, Carbamazepin, Lidocain und Capsaicin) oder durch Wirkung auf endogene Neurotransmitter (Trizyklika, Duloxetin oder Opiode) hemmen. Wenn man aber die wichtige Rolle der Gliazellen und der Immunzellen an der Entstehung neuropathischer Schmerzen berücksichtigt, könnten sich daraus neue therapeutische Optionen zur Behandlung neuropathischer Schmerzen ergeben (Scholz et al. 2007) .



**Abb. 1: Periphere Nervenverletzung als Auslöser der Neuropathie**

Den Beginn der Glia-Aktivierung an den peripheren Nerven kennzeichnet der Nervenschaden, hervorgerufen zum Beispiel durch Nervendurchtrennung, -kompression oder -invasion durch Tumorzellen, sowie anderen Arten von mechanischer oder chemischer Destruktion.

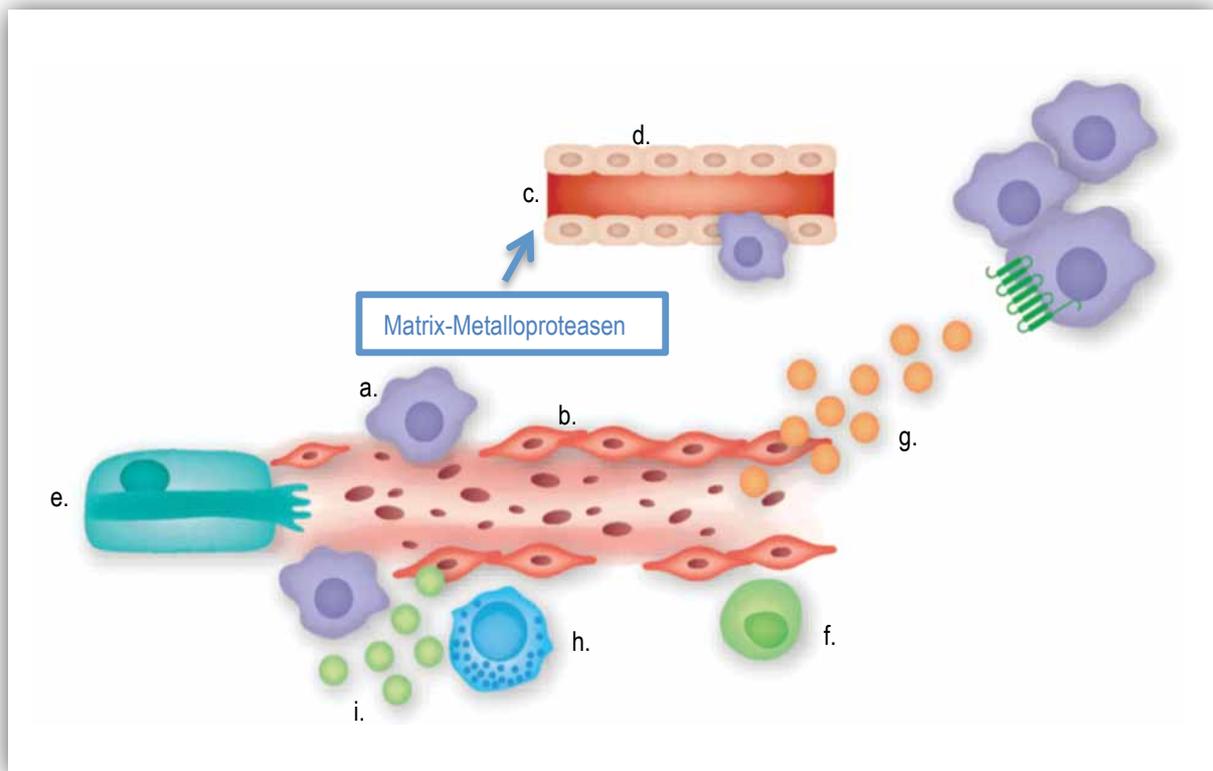
Rückenmark (a), Vorderwurzel (b), Hinterwurzel (c), Spinalganglion (d), peripherer Nerv (e), Verletzung der neuronalen Struktur (f). Quelle: Scholz und Woolf 2007



**Abb. 2: Immun- und Gliazellreaktion distal der Nervenläsion bei Nervenschaden**

Als Folge des peripheren Nervenschadens kommt es zu einer Degeneration distal des Nervenstumpfes (Wallerische Degeneration), die sich durch eine gleichzeitige Immunzellinfiltration des Nervenstumpfes kennzeichnet. Die Präsenz der Mastzellen (a), Makrophagen (b) und T-Lymphozyten (c) führt zu einer Aktivierung der Schwannschen Zellen (d). Es kommt zur Proliferation und Dedifferenzierung der Schwannschen Zellen (e.) und so zur Regeneration der geschädigten Axone (f).

Quelle: Scholz und Woolf 2007



**Abb. 3: Die periphere Entzündungsreaktion nach einem Nervenschaden potenziert die weitere Infiltration der Nerven durch Entzündungszellen**

Makrophagen (a) und Schwannsche Zellen (b) produzieren Matrix-Metalloproteasen, die die Blut-Nerven-Schranke zerstören. Blutgefäße (c), Endothel (d). CGRP, Substanz P, Bradykinin und Stickstoffmonoxid werden aus dem proximalen Nervenende (e) freigesetzt und führen zur Hyperämie und Schwellung und induzieren so die Invasion von weiteren Monozyten und T-Lymphozyten (f). Die Chemokine CCL2 und CCL3 (g) ziehen die Monozyten (h) an und führen sie zum Ort der Läsion. Makrophagen und Mastzellen sezernieren Prostaglandine und die IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF und LIF (i). TNF wirkt über einen autokrinen Mechanismus auf Makrophagen, welcher über TNFR1 Aktivierung zu einer vermehrten Zytokin-Synthese und Freisetzung führt. TNF führt auch zu einer vermehrten Infiltration von Makrophagen. Quelle: Scholz und Woolf 2007

## Tumorhypoxie im Pankreaskarzinom

Betrachtet man die außergewöhnlich schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms, so stellt man sich die Frage, welche Faktoren das Pankreaskarzinom so überaus maligne, metastasierungs-freudig und invasiv machen. Einer dieser Faktoren ist sicherlich die Tumorhypoxie (Garcea et al. 2006). Im Rahmen der Tumorhypoxie kommt es zu einer Sauerstoff-Minderversorgung des Gewebes, welche zu einer Selektionierung der Pankreaskarzinomzellpopulation führt. Nur die Hypoxie-resistentesten Zellen kön-

nen sich an dieses Milieu anpassen, sich weiter teilen und invasiv oder sogar metastasierend wachsen. Auf Genomebene kommt es dabei zu einer Aktivierung des Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF 1 $\alpha$ ), welches über Aktivierung verschiedenster Signalwege zur gesteigerten Angiogenese, Apoptose, Proliferation, extrazelluläres Remodeling, Invasion, Metastasierung, Genominstabilität und Immunregulation führt (Ruan et al. 2009). Definiert wird die Hypoxie als eine Reduktion des normalen Sauerstoffgehalts der Gewebe. Mögliche Auslöser sind akute oder chronische Gefäß-, Lungen- oder Tumorerkrankungen. Die Tumorphypoxie ist bedingt durch zwei Faktoren: die rapide Steigerung der Anzahl der Tumorzellen kann nicht von einer suffizienten Erhöhung der Sauerstoffversorgung im Gewebe beglichen werden. Der zweite Faktor ist, dass die Tumorangio-genese durch Bildung von dysfunktionellen Blutgefäßen, zu einem schwachen Blutfluß und einer veränderten Permeabilität führt (Garcea et al. 2006).

Der erste Nachweis der Tumorphypoxie wurde im Rahmen der strahlentherapeutischen Behandlung ermittelt. Die Destruktion von Tumorzellen durch Strahlentherapie erfordert die Präsenz von freien Sauerstoffradikalen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Tumorzellen, die sich in hypoxischen Tumorarealen befinden, die Strahlentherapie überleben können (Wouters et al. 1997). In der Pionierarbeit von Hockel und Mitarbeitern konnte durch die gezielte Messung des intratumoralen Sauerstoffgehalts mittels Sauerstoffelektroden gezeigt werden, dass vor allem solide Tumore, wie zum Beispiel Mamma-Karzinome, Tumore des HNO-Trakts, oder auch Pankreaskarzinome, eine Tumorphypoxie aufweisen (Hockel et al. 2001).

Die Hypoxie induziert Veränderungen in der transkriptionellen Regulation zahlreicher Gene, die den zellulären Metabolismus beeinflussen, und damit zum Beispiel die Abhängigkeit der Zellen von der Sauerstoffversorgung aufheben oder reduzieren (Karzinomzellen weisen mehr Glykolyse auf als oxidative Phosphorylierung, als Hinweis auf einen anaeroben Stoffwechsel) (Duffy et al. 2003). Die Hypoxie-induzierbaren Gene beeinflussen viele biologische Mechanismen, unter anderem Zellproliferation, Angiogenese, Metabolismus, Apoptose, Immortalisation und Migration. Die Hypoxie-induzierten Veränderungen der Genexpression können folgende Mechanismen bzw. Gene betreffen:

Sauerstofftransport (z.B. Epo), Angiogenese (z.B. VEGF), Glykolyse (z.B. Glut-1), Transkriptionsfaktoren (z.B. HIF-1 $\alpha$ , Zyklin G2), Metabolismus (z.B. Carboanhydrasen), Wachstumsfaktoren (z.B. IL-6, IL-8), Zelladhäsion (z.B. L1-CAM, Vimentin) (Harris 2002) .

Aber das vielleicht wichtigste Merkmal der Hypoxie ist die direkte Beeinflussung der Tumorzellbiologie durch seine modulierenden Effekte auf die Aktivität des Hypoxia-inducible Factor (HIF1). Die Antwort der Zellen auf Hypoxie wird durch die alpha-Einheit von HIF1 hervorgerufen, welcher durch Hypoxie induziert wird (Wang et al. 1995; Harris 2002) . Somit kommt es unter der Hypoxie zu einer Selektionierung von Zellen, die in diesem Milieu überleben können. Darüber hinaus kommt es aufgrund der Hypoxie zu einer markanten Hochregulierung der Angiogenese-fördernden Faktoren wie VEGF. Die vermehrte Angiogenese fördert die Invasivität und Metastasierung der Pankreaskarzinomzellen (Richard et al. 1999) .

## **Hypoxie und gliale Aktivierung im zentralen Nervensystem**

Im Falle der Gliazellen des zentralen Nervensystems kommt es unter hypoxischen Bedingungen, hier vor allem im Rahmen ischämischer Insulte, zu einer „Aktivierung“ der Gliazellen. Diese Aktivierung wird im ZNS durch eine Hochregulation der Intermediärfilamente GFAP (glial fibrillary acid protein), Nestin und Vimentin in Gliazellen des ZNS, v.a. der Astrozyten, beobachtet (Garnier et al. 2001) . Diese Hochregulation von Intermediärfilamenten als Folge von Neurotraumata, ischämischen Ereignissen oder neurodegenerativen Erkrankungen führt zu der Entstehung einer reaktiven Gliose (Pekny et al. 2007) .

Die Gliazellen wurden lange Zeit als reine Stützzellen für Neurone angesehen, jedoch hat man über das letzte Jahrzehnt hinweg zunehmend festgestellt, dass Gliazellen an einer Vielzahl von Reaktionen im Rahmen von krankhaften Prozessen im ZNS eine zentrale Rolle spielen. Die Hauptglia des ZNS, die Astrozyten, stellen in ihrem aktivierten Zustand einen wesentlichen Bestandteil der Gewebsinflammation und des Gewebeumbaus im Nervensystem dar. Es wird zunehmend angenommen, dass aktivierte Gliazellen Stammzell- oder Progenitorzell-ähnliche Merkmale aufweisen

und zum Schutz der Neurone nach einem Nervenschaden wesentlich beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Ablation von Gliazellen im Zentralnervensystem mit einem stärker verbreiteten Verlust der kortikalen Neurone aber auch der Motorneurone in experimentellen transgenen Mausmodellen einhergeht (Myer et al. 2006) . Somit wird die aktivierte Glia als ein essentieller Mechanismus zum Schutz der Neurone und so des gesamten Nervensystems aufgefasst (Buffo et al. 2010) . Aber nicht nur die Gliazellen des zentralen Nervensystems, sondern auch die des peripheren Nervensystems tragen zur Neuroprotektion und Regeneration nach einer Nervenschädigung bei (Scholz et al. 2007) .

## Ziele der Studie

Viszeraler Schmerz ist ein häufig auftretendes Symptom in verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen. Nichts desto trotz verlaufen die Versuche, den abdominellen Schmerz suffizient zu behandeln, häufig nicht zufriedenstellend, da die genauen Pathomechanismen der Schmerzentstehung bis heute nicht hinreichend erforscht und verstanden sind. Die eindeutige klinische Präsenz des abdominellen Schmerzsyndroms im Pankreaskarzinom hat daher das Interesse an den Alterationen im pankreatischen Nervensystem und dessen möglichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf geweckt. Der neuropathische Schmerz ist laut gängiger Klassifikation definiert als „ein Schmerz, der aus einer unmittelbaren Verletzung oder Krankheit des somatosensorischen Systems entspringt“ (Treede et al. 2008). Betrachten wir die verschiedenen Verletzungsmuster der pankreatischen Nerven im Pankreaskarzinom, so bietet sich hier eine Fülle von Läsionen, die entsprechende nozizeptive Signale aussenden können. Durch die oben dargestellten spezifischen neuropathischen Veränderungen kann zusammenfassend festgestellt werden, dass der pankreatische neuropathische Schmerz durch eine intra- als auch eine extrapancreatische Neuropathie induziert wird. Was jedoch bis zu diesem Zeitpunkt komplett unklar ist, ist die potentielle Rolle der Gliazellen des peripheren Nervensystem, den Schwannschen Zellen, im Rahmen der pankreatischen Neuropathie im Pankreaskarzinom.

Daher war das Hauptziel der vorgelegten Dissertationsarbeit zu eruieren, ob es ähnlicherweise im Rahmen der pankreatischen Neuropathie im Pankreaskarzinom zu einer Aktivierung der Gliazellen kommt, wie man es aus dem zentralen nervalen Schaden bereits kennt.

Die Studie basiert auf der Untersuchung der Kardinalmerkmale von reaktiver bzw. aktivierter Gliazellen.

Dazu zählen folgende drei Merkmale:

- erhöhte Proliferationsrate
- Überexpression der intrazellulären Intermediärfilamente

- Veränderungen der Zellmorphologie der Gliazellen.

Um den Aktivierungsparameter „Proliferation“ zu untersuchen, wurde ein MTT-Proliferationsassay mit den hSc kultiviert mit Pankreaskarzinomzell-Überständen durchgeführt. So wurden veränderte Wachstumsraten bei nativen und behandelten Zellen untersucht. Um eine mögliche Überexpression der intrazellulären Intermediärfilamente zu untersuchen, wurden die Schwannschen Zellen unter hypoxischen bzw. in ko-kultivierten Bedingungen behandelt. Hierbei wurden die intrazellulären Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin nachgewiesen, um mögliche Veränderungen der Proteinexpression unter den verschiedenen Kulturkonditionen zu detektieren. Als dritter Aktivierungsparameter wurde die morphologische Reaktion der hSc unter den genannten Pankreaskarzinom-ähnlichen Kulturbedingungen untersucht. Das Ziel war morphologische Veränderungen im Sinne einer Zellhypertrophie der hSc als Antwort auf die Pankreaskarzinomzellen nachzuweisen.

Eine weitere wichtige Fragestellung war der Einfluss von Hypoxie auf die Nerven im Pankreaskarzinom in vivo. Hierbei galt es zu eruieren, ob die gliale Aktivierung im Rahmen des Pankreaskarzinoms durch die hypoxischen intratumoralen Nerven bedingt sein kann.

Neben diesen klassischen Merkmalen der glialen Aktivierung wurden weitere Hypoxie-induzierbare Gene in den Schwannschen Zellen, insbesondere inflammatorische Zytokine bzw. Chemokine mittels Multiplex ELISA quantifiziert.

Dabei wurden insbesondere Veränderungen der Expression folgender Proteine untersucht:

- Interleukine (IL-1R  $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12)
- Chemokine (IP10, MCP1)
- Wachstumsfaktoren (VEGF, basic FGF, G-CSF)
- Zytokine (IFN- $\gamma$ )

# Material und Methoden

## Reagenzien

Folgende chemische Reagenzien in alphabetischer Ordnung wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Ammoniumpersulfat, Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

Aqua destillata, Braun (Melsung, Deutschland)

BCA-Protein assay, Pierce, Thermo Scientific (Rockford, USA)

BSA, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

$\beta$ -2-Mercaptoethanol, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Complete Mini, EDTA-free, Roche (Mannheim, Deutschland)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

DMSO, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

$\epsilon$ -Amino-Caprinsäure, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Ethanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Fetales Kälberserum, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

Formaldehyde 4% Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

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

Glycin, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

HCl, Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland)

Humane Schwannsche Zellen, Sciencell (Kalifornien, USA)

Methanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Milchpulver, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas (St.-Leon-Rot, Deutschland)  
Phosphate-buffered saline (PBS), PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)  
Penicillin, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)  
Polyacrylamid, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
Poly-D-Lysin Hydrobromid, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)  
Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)  
Schwann Cell Medium, Sciencell (Kalifornien, USA)  
Sodiumdodecylsulfat (SDS), Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)  
Streptomycin, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)  
TEMED, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
Tween-20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)  
0,25 %Trypsin-EDTA, Gibco, Invitrogen (Paisley, England)  
Hydrogen peroxide 30%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

## **Geräte**

Inkubator: Hera Cell 150, Thermo Science (Bonn, Deutschland)  
Mikroskop: Axiovert 40, CFL, Zeiss (Jena, Deutschland)  
Multiplex ELISA: MAGPIX Multiplex ELISA, Merck Millipore (Massachusetts, USA)  
Power Pack 25, Biometra (Göttingen, Deutschland)  
Roller Mixer, Stuart (Shaffordshire, England)  
Sterile Werkbank, Hera Safe, Thermo Science (Bonn, Deutschland)  
Thermomixer Comfort 1,5ml, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Wasserbad: Aqualine AL 18 Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)

Western Blot Kammer, Biometra (Göttingen, Deutschland)

Zentrifuge: 5425 Eppendorf (Wesseling-Erzdorf, Deutschland)

Zentrifuge, Multifuge: 3SR+ Thermo Science (Bonn, Deutschland)

### **Verbrauchsmaterial**

Co-Culture Inserts 6-well: Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

Fuji Medical X-Ray Film, Fuji (Düsseldorf, Deutschland)

PVDF Membran, Merck Millipore (Massachusetts, USA)

MagPix Luminex® beads, Merck Millipore (Massachusetts, USA)

### **Patienten und Gewebe**

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Gewebestücke von PCa-Patienten im Rahmen von Pankreasresektionen gesammelt. Die untersuchten 11 Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 67,3 Jahren. Unter den Patienten waren 5 weibliche und 6 männliche Patienten. Bei 3 Patienten war der Tumor im Pankreasschwanz, bei 2 im Korpus und bei 6 im Pankreaskopf lokalisiert. Ein Patient zeigte ein T4- und die restlichen ein T3-Tumorstadium. Ein Großteil der Patienten (8 von 11) war Lymphknotenpositiv (N1). Fernmetastasen waren bei einem Patienten bekannt, bei 5 nicht vorhanden und bei weiteren 5 nicht sicher zu beurteilen. Das Grading zeigte bei zwei PCa-Geweben einen Grad-1-Tumor, bei 4 einen Grad-2-Tumor und bei 6 einen Grad-3-Tumor.

### **Immunhistochemie (Carboanhydrase IX)**

Die gesammelten Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und 3 µm dick geschnitten und rehydriert. Die Immunreaktivität des Hypoxiemarkers Carboanhydrase IX wurde detektiert. Die Schnitte wurden mit dem Erstantikörper Carboanhydrase IX (Abcam, ab15086, rabbit) in einer Verdünnung von 1:1000 über

Nacht bei 4°C inkubiert. Detektiert wurde das Antigen durch Inkubation mit dem DAKO Envision System-HRP (Hamburg, Deutschland) für die Spezies Kaninchen. Nach der Reaktion mit DAB wurden die Schnitte dehydriert und mit Mounting-Medium eingedeckelt.

## **Zellkultur**

### *Pankreaskarzinomzellen*

Die Pankreaskarzinomzelllinien Capan1, Colo357, Su86.86 und T3M4 wurden routinemäßig unter Normalbedingungen mit RPMI Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### *Humane Schwannsche Zellen*

Die humanen Schwannschen Zellen wurden von der Firma Sciencell aus humanen Spinalnerven isoliert, nach der 1. Passage kryokonserviert und in unser Labor verschickt. Die Schwannschen Zellen wurden unter Normalbedingungen in Schwann-Zell-Medium mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Schwann Cell Growth Serum in mit Poly-D-Lysin beschichteten Flaschen bzw. Platten im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### *Kolonkarzinomzellen*

Die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurde unter Normalbedingungen mit McCoy's 5A-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### *Immunzellen*

Die Jurkat T-Lymphozytenzelllinie wurde unter Normalbedingungen als Suspensionskultur in RPMI-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## **Ko-Kultur**

Für die Kultivierung der humanen Schwannschen Zellen in Ko-Kultur mit Pankreas- und Kolonkarzinomzellen, sowie T-Lymphozyten wurden 75.000 Schwannsche Zellen pro Well in Poly-D-Lysin beschichteten 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung unter Normalbedingungen wurde ein PBS-Waschschrift durchgeführt und die Schwannschen Zellen durch Verwendung von Ko-Kultur-Inserts mit einer Porengröße von 1  $\mu\text{m}$  der Firma BD mit je 100.000 Karzinomzellen bzw. T-Lymphozyten oder einer Kombination aus Karzinomzellen und T-Lymphozyten in serumfreiem Medium kultiviert. 24 und 48 Stunden nach Beginn der Exposition zu Karzinomzellen und T-Lymphozyten wurden die Ko-Kultur-Inserts entfernt, die Platte mit PBS gewaschen und auf Eis mit Radioimmunopräzipitations-Puffer (RIPA; Tris 50mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1 %, Na-Deoxycholat 0.5 %, und NP-40 1%) unter Zuhilfenahme eines Zellschabers lysiert. Die so gewonnen Proteinlysate wurden bei  $-20^\circ$  aufbewahrt.

## **Hypoxie**

1 Million hSc wurden in Poly-D-Lysin beschichteten 10cm-Platten ausgesät. Nach 12h erfolgte ein Mediumwechsel zu serumfreiem Schwann Cell Medium. 1 Stunde nach dem Mediumwechsel wurde die Hypoxieexposition gestartet. In einer Hypoxiekammer wurden die Platten nach 5 Minuten Dauer-CO<sub>2</sub>-Zufuhr für verschiedene Hypoxie-Zeitpunkte bei 37°C kultiviert. Am Ende der gewünschten Hypoxie-Dauer wurden die Überstände entnommen, für 5 Minuten bei 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert und wiederum der Überstand entnommen. Die Zellen wurden zur Gewinnung von Proteinlysaten erst mit PBS gewaschen und dann mit RIPA-Puffer lysiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

## **Pankreaskarzinomzell-konditionierte Medien**

Bei einer Konfluenz der Pankreaskarzinomzellen und der Kontroll-Kolonkarzinomzellen von ca. 80% erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS der Mediumwechsel zu serumfreiem RPMI-Medium mit 1%

Penicillin-Streptomycin. Die Pankreas- und Kolonkarzinomzellen wurden für 24 Stunden in diesem serumfreien Medium kultiviert. Danach wurde das Medium gesammelt, für 5 Minuten bei 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entnommen und bei -80°C aufbewahrt.

### **Behandlung der Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzell-konditionierten Medien für Immunoblot-Analysen**

Die humanen Schwannschen Zellen wurden für die Proteinanalysen mittels Immunoblot in mit Poly-D-Lysin beschichteten 6-well-Platten ausgesät. Für jedes Well wurden 75.000 Zellen verwendet. Die Schwannschen Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit PBS gewaschen und mit den Pankreaskarzinomzell-Überständen behandelt. Eine Proteinkonzentration von 100 µg Protein/ml serumfreiem RPMI-Medium wurde verwendet. 48 Stunden nach der Behandlung wurden die Schwannschen Zellen lysiert, dabei fand erst ein Waschschrift mit PBS und dann die Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer statt. Diese Schritte sind auf Eis durchgeführt worden. Die Lysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **Behandlung der Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzell-konditionierten Medien für Immunfluoreszenz-Färbungen**

5000 humane Schwannsche Zellen pro Well wurden in 24-well-Platten auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Glas-Coverslips ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit einem Waschschrift mit PBS und die Behandlung der hSc mit Pankreaskarzinom- und Kolonkarzinomzell-konditionierten Medien. Eine Proteinkonzentration von 100 µg Protein/ml Medium wurde verwendet. Nach 48h Inkubation wurden die hSc mit PBS gewaschen, für 15 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert und in PBS bis zur immunzytochemischen Färbung mit GFAP und DAPI bei 4°C aufbewahrt.

## **Fluoreszenz-Immunzytochemie**

Die mit Pankreas- und Kolonkarzinomzell-Überständen behandelten und mit 4%-Paraformaldehyd fixierten Schwannschen Zellen wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP, 1:400, DAKO) als glialen Marker gefärbt. Als Zweitantikörper wurde der Alexa Fluor® Goat anti-rabbit IgG-Antikörper (Invitrogen, Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:400 verwendet. Eine Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch die Gegenfärbung mit 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:2000, Invitrogen, Darmstadt).

## **Quantitative Erfassung der humanen Schwann-Zellfläche**

Die gefärbten humanen Schwannschen Zellen wurden mit einem Axiocop A1-System (Carl Zeiss, Göttingen) bei 20-facher Vergrößerung fotografiert und unter Benutzung der Schwellenwertfunktion der ImageJ-Software (Version 1,44p, Wayne Rasband, NIH) quantitativ erfasst und die Zellfläche in  $\mu\text{m}^3$  ausgedrückt.

## **Immunblot**

Die Proteinlysate der hSc-Hypoxie-Versuche wurden in einem 7,5%igem Trenngel aufgetrennt und in semitrockener Technik auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Blocken erfolgte mit 5 bzw. 7,5%iger Milch. Die Erstantikörper inkubierten über Nacht bei 4°C. Als Waschlösung wurde Milchpulver in destilliertem Wasser mit 0,1% Tween-20 verwendet. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (Maus bzw. Kaninchen) wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur bei einer Verdünnung von 1:2000, bzw. 1:6000 für GFAP) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit ECL-Chemilumineszenz-Reagenz.

Folgende Antikörper wurden im Rahmen der Immunoblot-Analysen verwendet:

GFAP	Dako Cytomation	Z0334	1:1000	Kaninchen
Nestin	Millipore	5922	1:5000	Kaninchen
Vimentin	Invitrogen	V6630	1:2000	Maus
NTN	Abcam	ab8061	1:500	Kaninchen
GAPDH	Santa Cruz	sc32233	1:2000	Maus
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc2005	1:2000	
donkey anti-rabbit IgG-HRP	Amersham	NA9340	1:2000	

### MTT

5.000 hSc/Well einer mit Poly-D-Lysin beschichteten 96-well-Platte wurden nach einer Anhaftungszeit von 24h mit Pankreaskarzinom-Zell-Überständen behandelt. Die verwendete Proteinkonzentration des Pankreaskarzinom-Zell-konditionierten Mediums wurde auf eine Endkonzentration von 100 µg Protein/ml mit serumfreien RPMI-Medium verdünnt. Nach folgenden Zeitpunkten nach Beginn der Behandlung wurden die hSc mit PBS gewaschen und mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide inkubiert: 0h, 24h, 48h, 72h, 5d, 7d, 9d und 11d. Nach einer MTT-Inkubation von 1h wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Platte für 12h bei 37°C getrocknet, und dann mit 100 µl Isopropanol/well versetzt. Die Absorption wurde mittels Spektrophotometer gemessen.

### Multiplex-Elisa

Die serumfreien Überstände der Schwannschen Zellen unter Hypoxie wurden mittels Multiplex-Elisa-Analyse laut Angaben des Herstellers (Millipore, USA) auf die vorhandenen Mengen folgender Proteine gemessen: PDGF, IL-1 $\beta$ , IL-1R $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF- $\alpha$  und VEGF.

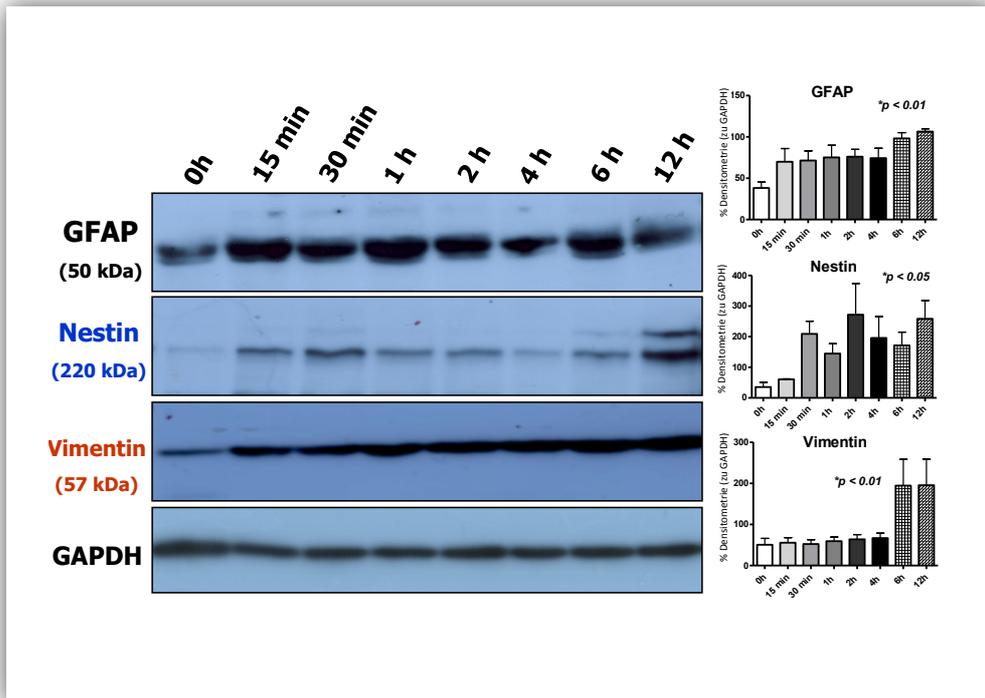
## **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte durch Verwendung der GraphPad Prism 4 Software. Zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Bei Analysen von mehr als zwei Gruppen kamen der one-way-Anova sowie der Bonferroni-post-hoc-Test zum Einsatz. Zwei-Gruppen-Analysen wurden durch Verwendung des Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts ausgedrückt. Errechnet wurden immer die zweiseitigen P-Werte. P-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

## Ergebnisse

### Die Hypoxie führt zur Hochregulation der Intermediärfilamente in den hSc

Der erste Teil der Dissertationsarbeit befasste sich mit der Frage, ob eine hypoxische Umgebung wie sie im Pankreaskarzinom vorkommt, einen Effekt auf die peripheren Gliazellen, also die hSc, ausübt. Diese Fragestellung lehnt insbesondere an die bekannte hypoxiebedingte Aktivierung der Astroglia in Folge eines hypoxischen Hirnschadens an (Qiu et al. 2011). Zu diesem Zweck wurden primäre humane Schwannsche Zellen wie oben beschrieben für unterschiedliche Zeitpunkte in einer hypoxischen Atmosphäre kultiviert, und anschließend wurde jeweils der intrazelluläre Gehalt der drei Hauptintermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin mittels Immunoblotanalyse bestimmt und mit normoxischen hSc verglichen. Ähnlich zu der bereits bekannten Reaktion der zentralen Glia auf Hypoxie, konnte auch für die hSc eine signifikante Hochregulation dieser drei Intermediärfilamente auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 4). Erstaunlicherweise war dieser aktivierende Effekt bereits nach 15 Minuten Hypoxie in den Zellen zu detektieren. Die densitometrische Analyse mittels Image-J-Software der hSc-Lysate aus verschiedenen Hypoxie-Zeitpunkten bestätigte die kinetische Hochregulation dieser drei Intermediärfilamente, welches eines der Hauptmerkmale der vor allem zentralen aktivierten Glia darstellt (*GFAP*: 38,20% des GAPDH unter Normoxie vs. 98,23% nach 6-stündiger Hypoxie und 106,5% nach 12-stündiger Hypoxie,  $p < 0.01$ ; *Nestin*: 35,57% unter Normoxie vs. 171,6% nach 6 Stunden und 258,5% nach 12 Stunden unter Hypoxie,  $p < 0.05$ ; *Vimentin*: 50,54% unter Normoxie vs. 194,6% nach 6 Stunden und 195,5% nach 12 Stunden unter Hypoxie).



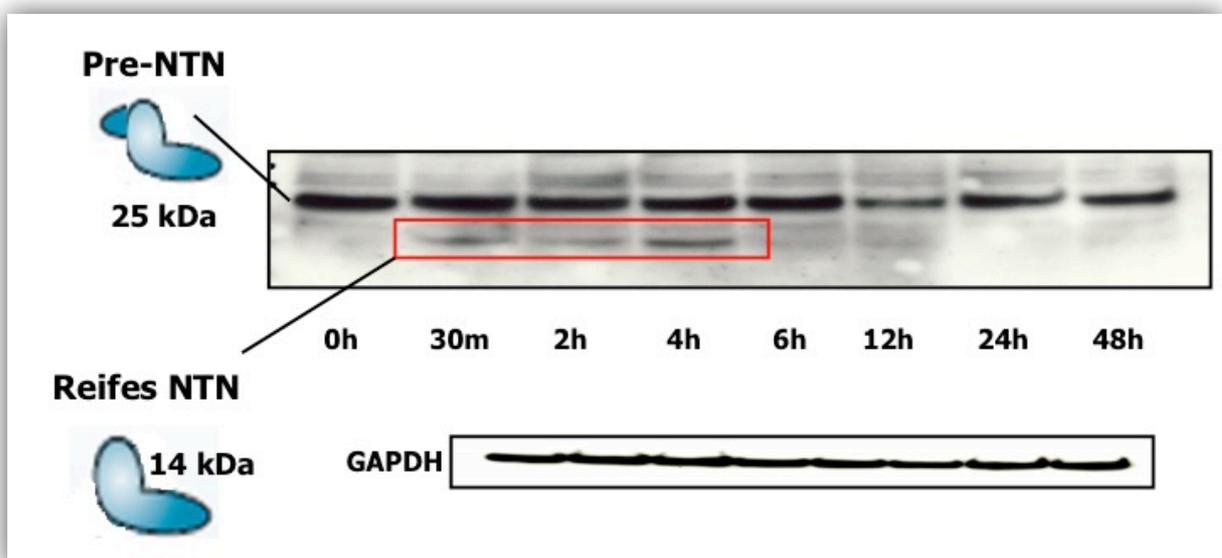
**Abb. 4: Die Kultivierung von humanen Schwannschen Zellen unter hypoxischen Bedingungen führt zu einer Hochregulation der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin**

Die humanen Schwannschen Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeitpunkte unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die gewonnenen Proteinlysate wurden dann mittels Immunoblot analysiert und die Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin bestimmt und anschließend densitometrisch analysiert (ImageJ). Bereits nach einer Hypoxie-Dauer von 15 Minuten kam es zu einer Hochregulation von GFAP und Nestin, nach 6 Stunden auch von Vimentin.

## Die Hypoxie unterstützt die Entstehung eines neurotrophen Milieus durch Steigerung der Neurotrophin-Sekretion aus den hSc

Um den ZNS-Schaden in Folge von Hypoxie oder Trauma zu reparieren, unterstützen Astrozyten im zentralen Nervensystem durch eine gezielte Hochregulation der neurotrophen Faktoren, NGF und GDNF die lokalen Reparatur- und Umbauprozesse (Buffo et al. 2010). Im Gegensatz zu Astrozyten ist eine ähnliche Reaktion der hSc auf Hypoxie im Sinne einer veränderten Neurotrophinbildung bisher nicht ausgiebig untersucht worden. In den wenigen Studien zu dieser Fragestellung konnten Zhu et al.

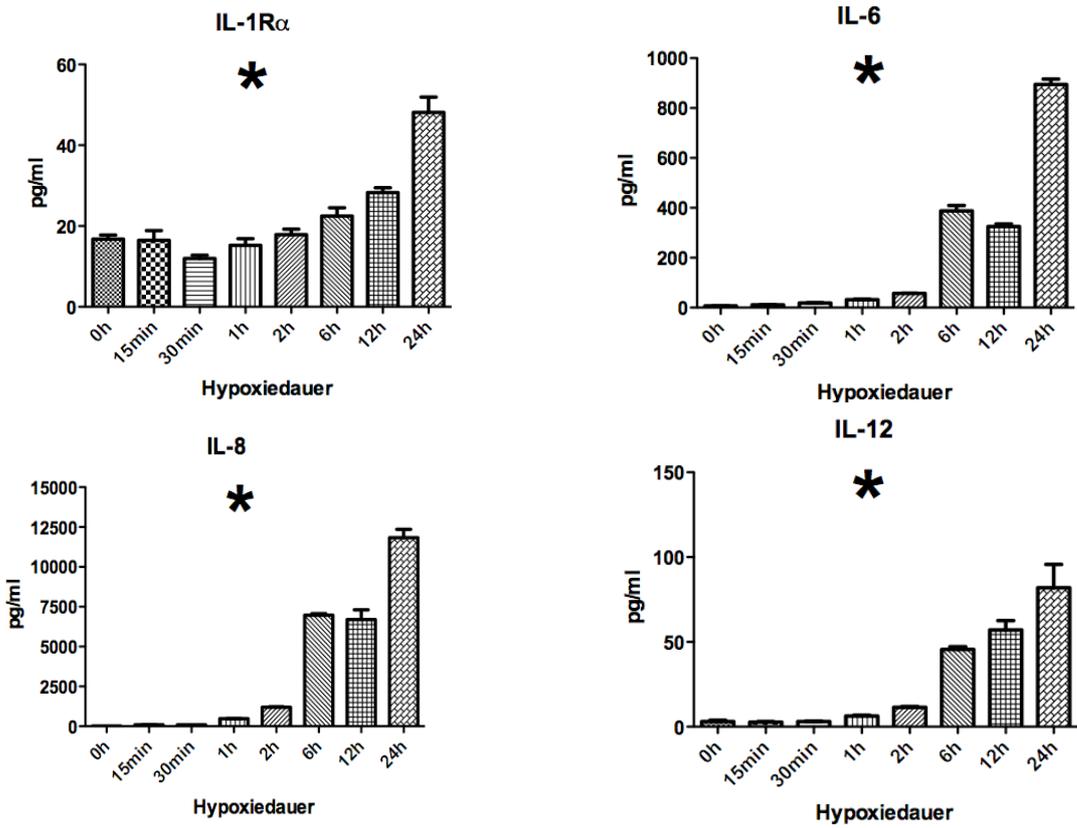
die signifikante Hochregulation der neurotrophen Faktoren NGF und BDNF in den hSc als Folge von Hypoxie detektieren (Zhu et al. 1999). Unter den neurotrophen Faktoren der GDNF-Familie spielt der neurotrophe Faktor Neurturin eine bedeutende Rolle. Er ist massgeblich an der physiologischen Ausbildung des intrapancreatischen nervalen Netzwerkes unmittelbar beteiligt (Rossi et al. 2005). Daher untersuchten wir gezielt die Neurturin-Bildung in den hSc unter Hypoxie-Einfluss mittels Immunoblotanalyse. Ähnlich wie bei den Astrozyten der zentralen Glia führte eine steigende Hypoxiedauer zu einer vermehrten Synthese der reifen Neurturin-Form in den hSc (Abb. 5). Neurturin ist als ein Homodimer in seiner reifen Monomer-Form aktiv. Das Monomer verfügt über ein Molekulargewicht von 14 kDa, das Dimer über 28 kDa. Die reife Form entsteht durch Prozessierung des pro-Neurturin, welches ein Molekulargewicht von 25 kDa aufweist. Während die Schwanschen Zellen unter normoxischer Umgebung lediglich die pro-Form aufweisen, kann man für eine gewisse Hypoxiedauer von 30 Minuten bis 4 Stunden auch die reife monomere Form des Neurturins detektieren (Abb. 5).



**Abb. 5:** Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer Hochregulation der reifen Form des neurotrophen Faktors Neurturin (NTN). Nach 30 Minuten bis 4 Stunden Hypoxiedauer der Schwanschen Zellen wird die reife Form des Neurturin vermehrt intrazellulär detektiert.

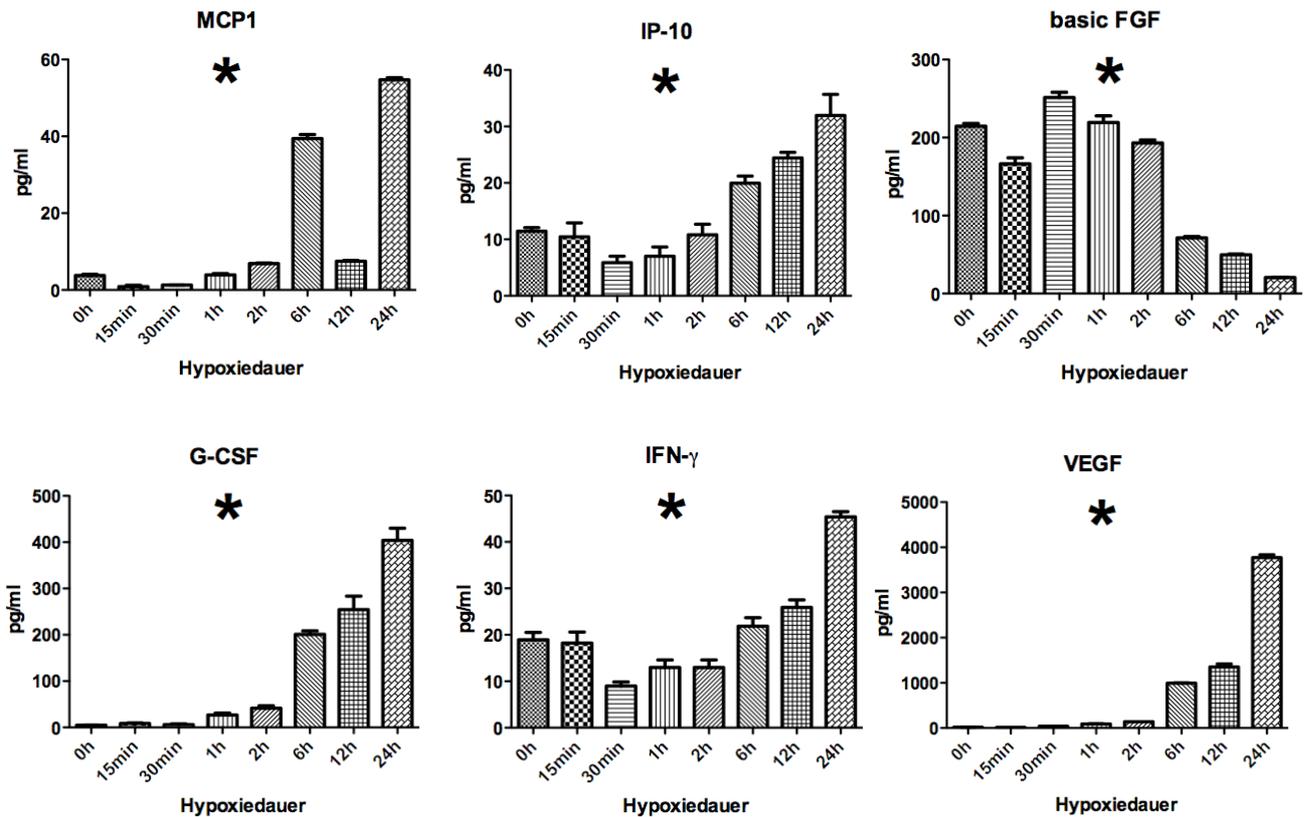
## **Die Entstehung eines proinflammatorischen Gliazellphänotyps wird durch Hypoxie induziert**

Nervenschäden infolge von Sauerstoffmangel bzw. mechanischem Trauma führen nicht nur zu einer Aktivierung der Gliazellen im Sinne einer vermehrten Gliazellproliferation oder einer Intermediärfilamenthochregulation, sondern auch zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren aus den hSc (Scholz et al. 2007). Diese Mediatoren, zu denen vor allem Chemokine gehören, dienen einer Kreuzaktivierung der Entzündungszellen, vor allem aber der zytotoxischen T-Lymphozyten. Erstaunlicherweise ist aber der Einfluss der Hypoxie auf die Sekretion von klassischen Entzündungsmediatoren in den hSc kaum untersucht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, IL-12, MCP-1 und TNF $\alpha$ , aber auch des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, sowie verschiedenen Chemokine und Wachstumsfaktoren in den Hypoxie-exponierten hSc-Überständen mittels Multiplex-ELISA (Luminex®) untersucht. In allen durchgeführten Experimenten kam es nach einer zweistündigen Hypoxiedauer zu einer dramatischen Hochregulation des proinflammatorischen Zytokins IL-6, welches zum Teil 1.000fache Mengen der basalen Sekretion der normoxischen hSc erreichte, sowie des Interleukin-1-Rezeptors  $\alpha$ , der Interleukine 8 und 12 (Abb. 6). Desweiteren wurden die Wachstumsfaktoren G-CSF und VEGF und die Chemokine IP10 und MCP1 sowie Interferon  $\gamma$  hochreguliert. Im Gegensatz zu diesen Hochregulation der pro-inflammatorischen und wachstumsanregenden Faktoren führte die Hypoxie zu keinerlei Veränderungen in der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , PDGF, IL-2, IL-5, IL-15, Eotaxin, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  und RANTES aus den hSc.



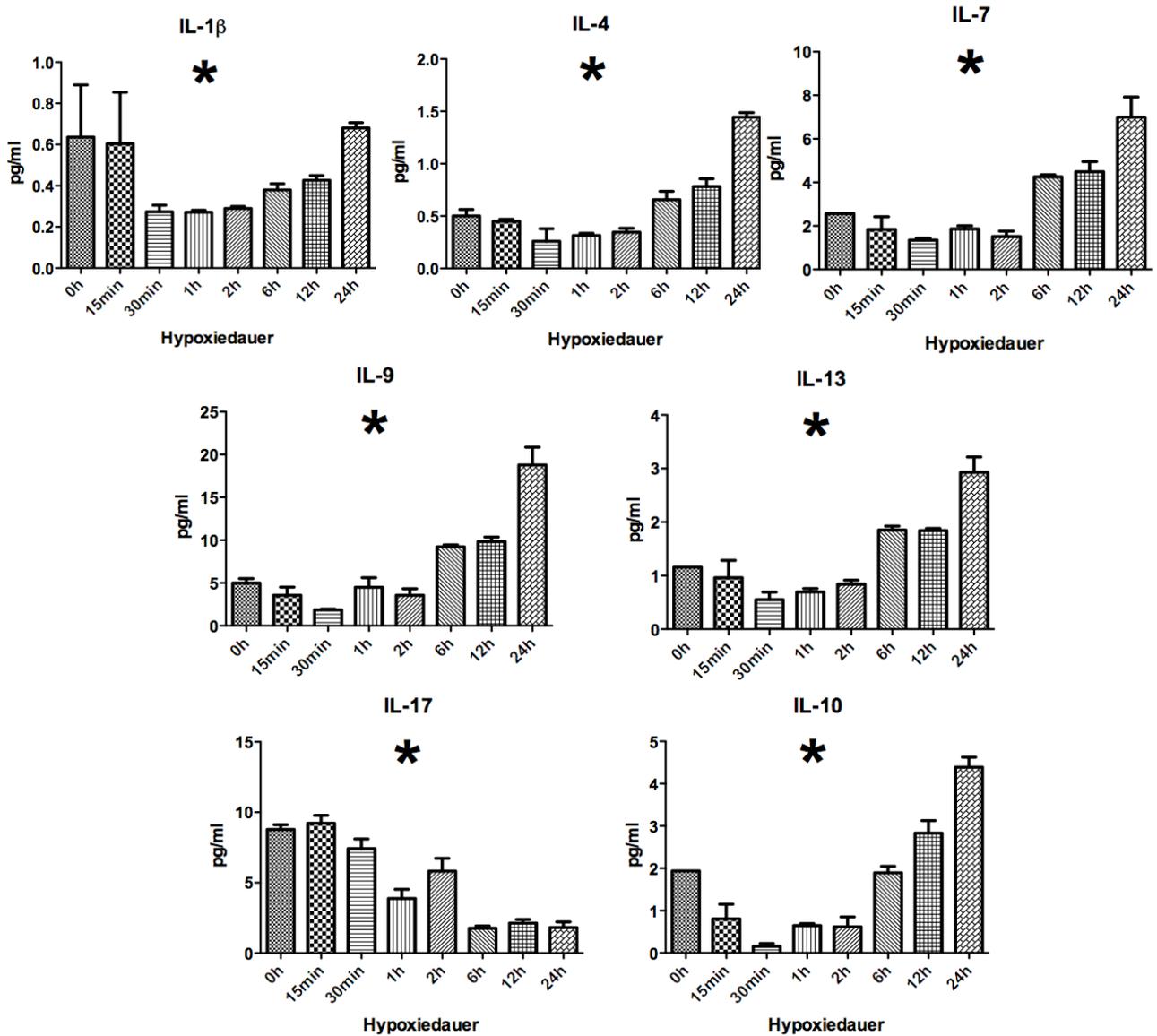
**Abb. 6: Unter hypoxischen Bedingungen sezernieren die humanen Schwann'schen Zellen vermehrt proinflammatorische Zytokine**

Um den Einfluss der Hypoxie auf die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen aus den hSc zu erfassen, wurden ein Multiplex-ELISA-Zytokinpanel durchgeführt. Hierbei wurde es deutlich, dass die pro-inflammatorischen Interleukine IL-6, IL-8 sowie IL-12 und der Interleukin-1-Rezeptor  $\alpha$  unter Hypoxie aus hSc vermehrt sezerniert werden.



**Abb. 7: Sekretion von Zyklokinen aus den Schwann'schen Zellen unter Hypoxie**

Die Chemokine Monozyten-Chemotaktisches-Protein-1 (MCP-1) und Interferon- $\gamma$ -induced-Protein (IP10) werden unter Hypoxie in den Schwann'schen Zellen hochreguliert, sowie Faktor „basic Fibroblast Growth Factor“ (basic FGF) herunterreguliert. Interessanterweise kommt es hierbei auch zu einer vermehrten Sekretion des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF), welcher die Differenzierung der Entzündungszellen, insbesondere aber der neutrophilen Granulozyten induziert, und des Interferon- $\gamma$ , welcher aufgrund seiner immunstimulierenden und anti-tumoralen Funktionen eine besondere Bedeutung beherbergt. Auch der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als Zeichen des Beitrages der Schwann'schen Zellen zur Angiogenese wird hochreguliert.

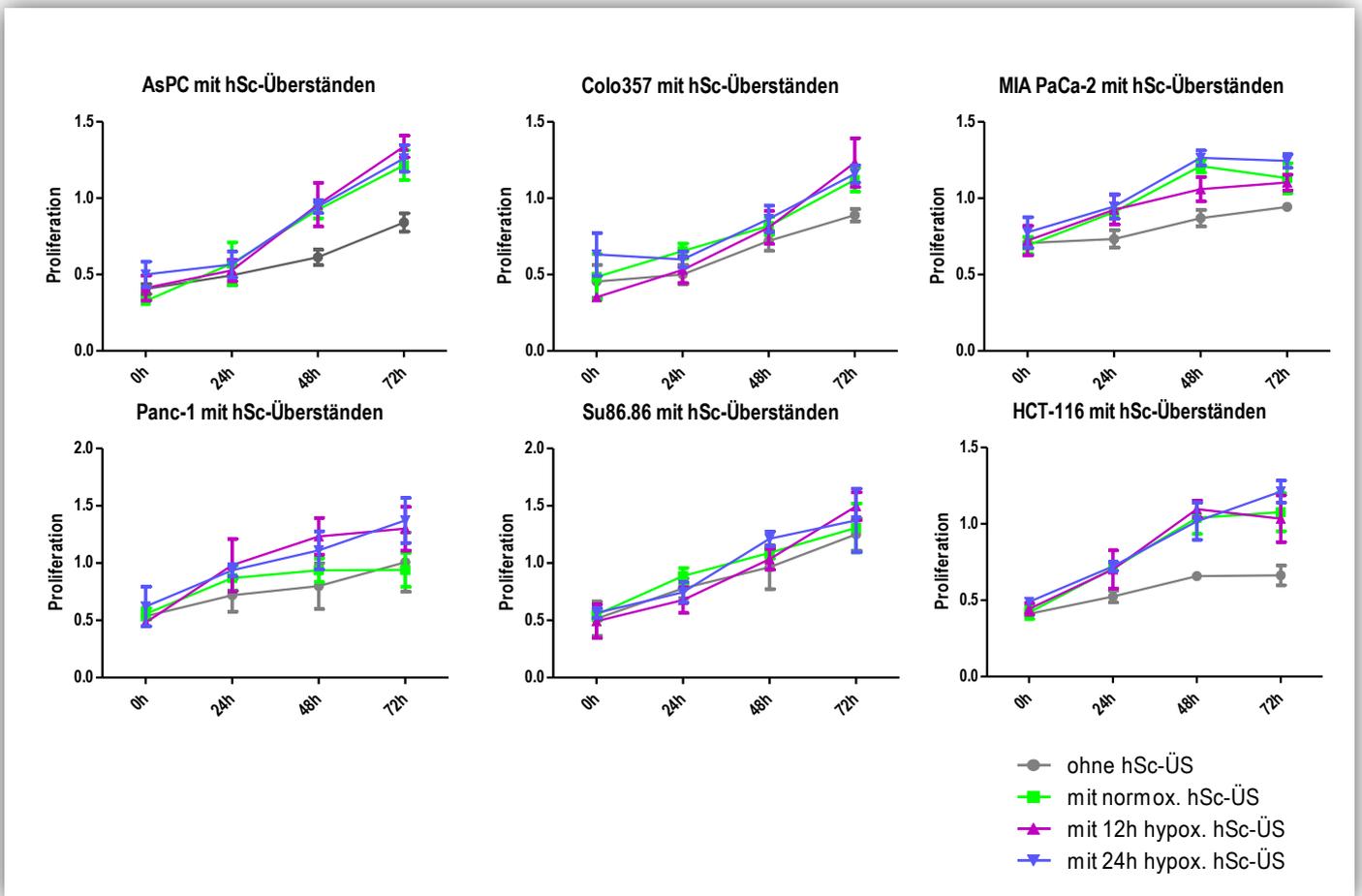


**Abb. 8: Sekretion von verschiedenen Interleukinen aus humanen Schwannschen Zellen unter hypoxischen Bedingungen**

Die in dieser Abbildung dargestellten Interleukine zeigen zwar auch eine statistisch signifikante Änderung ihrer Expression unter hypoxischen Bedingungen der humanen Schwannschen Zellen. Jedoch liegen ihre Konzentrationen in den jeweiligen Überständen an der Detektionsgrenze des MagPix-Systems (10pg/ml), weshalb die biologische Signifikanz zumindest einiger dieser Veränderungen fraglich ist.

## **Die Überstände hypoxischer hSc haben keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von humanen Pankreaskarzinomzellen**

Die Untersuchung glia-aktivierender Faktoren im Rahmen der pankreatischen Neuropathie im Pankreaskarzinom gehörte zu den Hauptzielen der vorgelegten Studie, insbesondere aufgrund der zentralen Rolle der aktivierten Glia in peripheren und zentralen Neuropathien und neuropathischen Schmerzformen. Hierbei stellte sich die wichtige Frage inwieweit die aktivierte Glia mit der Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms interagiert. Um dieser Frage nachzugehen wurden die humanen Pankreaskarzinomzellen AsPC, Colo357, MiaPaCa2, Panc1, Su86.86 und die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 mit Überständen von hSc ko-kultiviert, die einer Hypoxie bzw. Normoxie ausgesetzt waren. Anschließend erfolgte die Messung der Karzinomzell-Proliferationsrate via MTT-Assay. Über den Messzeitraum von 72 Stunden im MTT-Assay kam es in keiner der untersuchten Zelllinien unter der Kultivierung von hypoxischen hSc-Überständen zu einer unterschiedlichen Proliferationsrate, im Vergleich zu deren Kultivierung in normoxischem hSc-Medium.



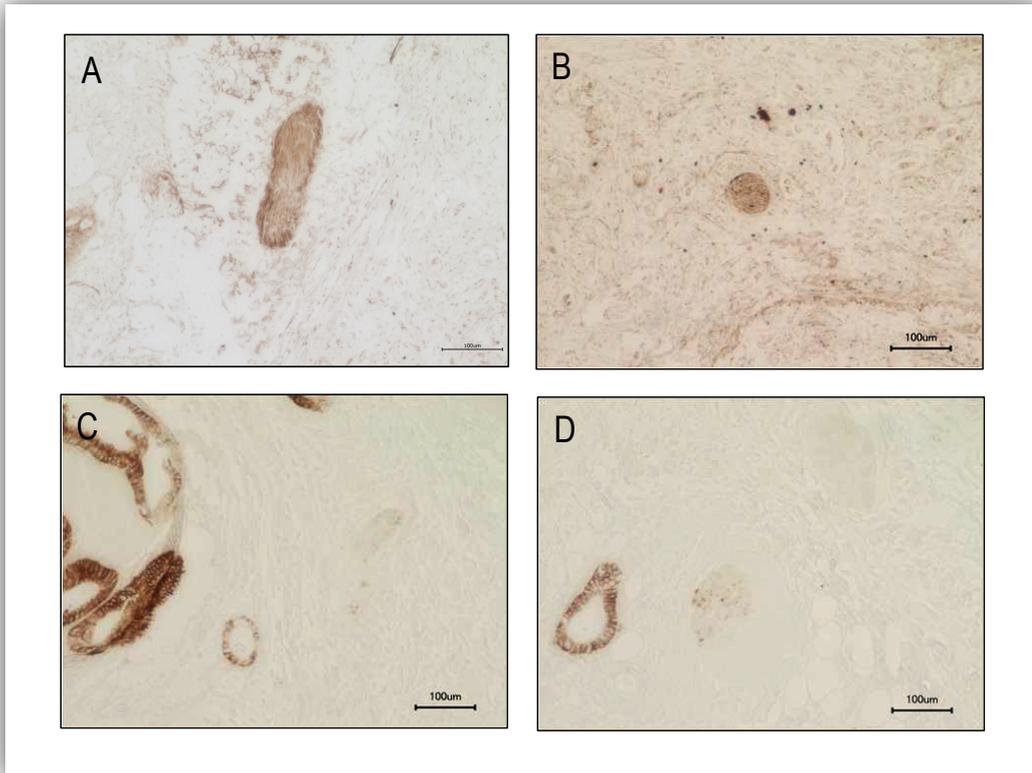
**Abb. 9: Proliferationsverhalten verschiedener Pankreas- und Kolonkarzinomzellen unter Behandlung mit hSc-Überständen**

Die Kultivierung der verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien AsPC, Colo357, MIA PaCa-2, Panc-1, Su86.86 sowie der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 mit Schwann-Zell-Überständen (normoxisch, 12 und 24 Stunden hypoxisch) führte zu keiner Veränderung des Proliferationsverhaltens dieser Zellen.

**Die Hypoxie im Pankreaskarzinom hat einen direkten Einfluss auf die intrapancreatische Nerven**

Um einen Glia-aktivierenden Effekt der Tumorphypoxie im Pankreaskarzinom nachweisen zu können, ist es unabdingbar zu demonstrieren, dass intrapankreatische Nerven auch in hypoxischen Gewebiszonen im Pankreaskarzinom anzutreffen sind. Zu diesem Zweck wurde unter anderem die Identifizierung der in hypoxischen Tumorarealen liegenden intrapankreatischen Nerven als Ziel gesetzt. Die Darstellung der hypoxischen Tumorareale erfolgte nicht unter Verwendung des klassischen Hypoxie-Markers Hypoxia-inducible-factor1- $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ). Da HIF1- $\alpha$  vor allem intranukleär und nur geringfügig zytoplasmatisch nachweisbar ist und in der Routine-Immunhistochemie daher fast das ganze Spektrum der Zellen im Tumorgewebe markiert, wurde ein relativ neuer Hypoxiemarker, das Enzym Carboanhydrase-IX verwendet, welcher sich in aktuellen vergleichenden Analysen der Hypoxiemarker zusammen mit Pimonidazol (Hydroxaprobe-1R) als der spezifischste und sensitivste Hypoxiemarker erwies.

Die immunhistochemische Färbung der humanen Pankreaskarzinomgewebsschnitte mittels Carboanhydrase-IX-Antikörper zeigte eine äußerst spezifische Detektion dieses Enzyms im Gewebe in zwei Kompartimenten. Das erste Kompartiment bestand aus den Pankreaskarzinomzellen, die eine starke Hochregulation von CA-IX auf ihrer Zellmembran aufwiesen (Abb. 10). Überraschenderweise war das einzig andere Gewebs-Kompartiment, wo CA-IX noch detektierbar war, die intrapankreatischen Nerven. Hierbei war es auffällig, dass CA-IX vor allem in den Nerven im Pankreaskarzinomgewebe verstärkt detektierbar war, welche unmittelbar in stark desmoplastischen Stroma eingebettet waren. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die Tumorphypoxie im Pankreaskarzinom einerseits die Pankreaskarzinomzellen, andererseits aber auch die intrapankreatischen Nerven direkt zu beeinflussen.



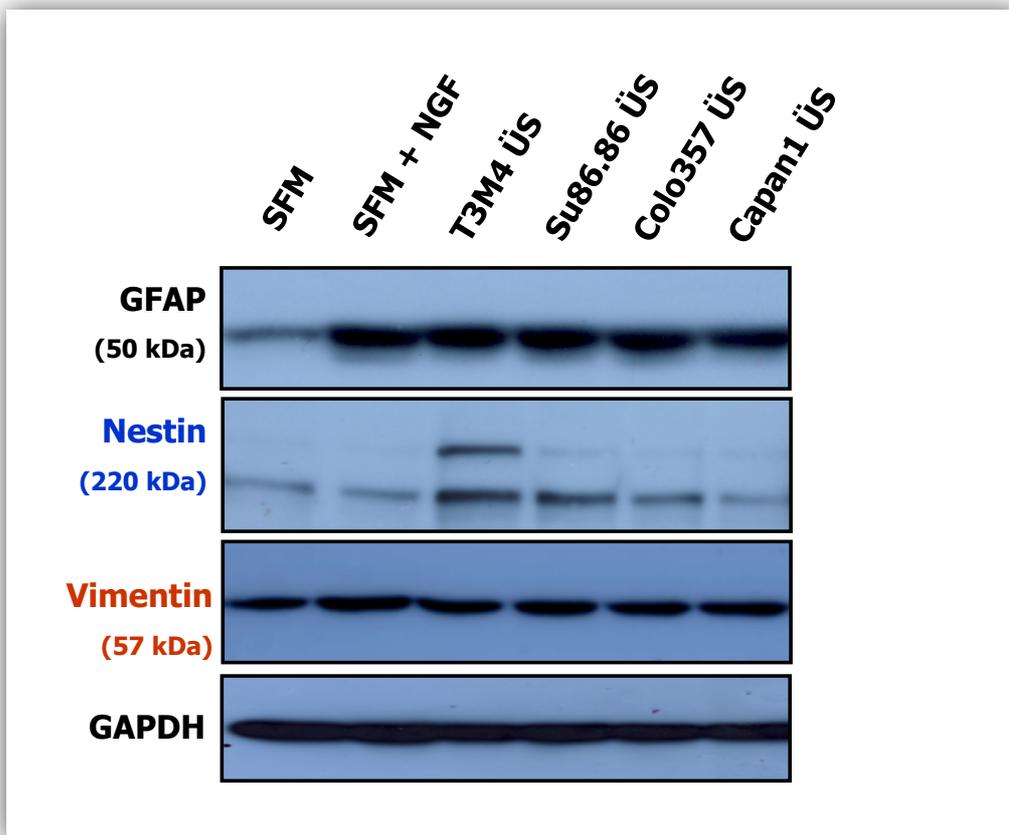
**Abb. 10: Färbung von Pankreaskarzinomgeweben mit dem Hypoxiemarker Carboanhydrase-IX**

Die immunhistochemische Darstellung des Hypoxiemarkers Carboanhydrase-IX in Nerven in humanem Pankreaskarzinom-Gewebe. Die beiden Abbildungen der obersten Reihe zeigen eine spezifische Immunoreaktivität der Pankreaskarzinom-Nerven mit Carboanhydrase-IX (A, B). In den unteren Bildern sieht man Nerven, die keine Carboanhydrase-IX-Antigene zu haben scheinen (C, D). Vergrößerung 20x.

### **Die Behandlung der hSc mit Pankreaskarzinomzellüberständen führt zu keiner evidenten Hochregulierung der Intermediärfilamente**

Neben dem hypoxischen Tumormilieu kommen als potentielle Aktivatoren der hSc die Pankreaskarzinomzellen in Frage. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass Pankreaskarzinomzellen durch Bildung von Wachstumsfaktoren (IGF, TGF $\beta$ ) Zellen in der Tumorumgebung aktivieren können, wie zum Beispiel die Endothelzellen zur Angiogenese oder die tumor-assoziierten Fibroblasten zur vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix. Um eine mögliche Aktivierung der hSc durch PCa-Zellen zu eruieren,

wurden die hSc mit Überständen von unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien für eine Dauer von 24, 48 bzw. 72 Stunden lang ko-kultiviert. Als bekannte Aktivierungsparameter für die hSc wurden mit NGF-präinkubierte hSc als Positivkontrolle verwendet. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 48 Stunden kam es zu einer tendenziell höheren intrazellulären GFAP-Bildung in den hSc, die in den Überständen der Zelllinien Capan1, Colo357, Su86.86. und T3M4 kultiviert wurden (Abb. 11). Dieser Effekt der Karzinomzellüberstände war für die Intermediärfilamente Nestin und Vimentin (Abb. 11) oder aber auch nach Co-Kultur der hSc mit Pankreaskarzinomzellen nicht nachweisbar. Hiermit lässt sich schlussfolgern, dass Pankreaskarzinomzellen per se einen eingeschränkten aktivierenden Effekt auf die hSc ausüben.

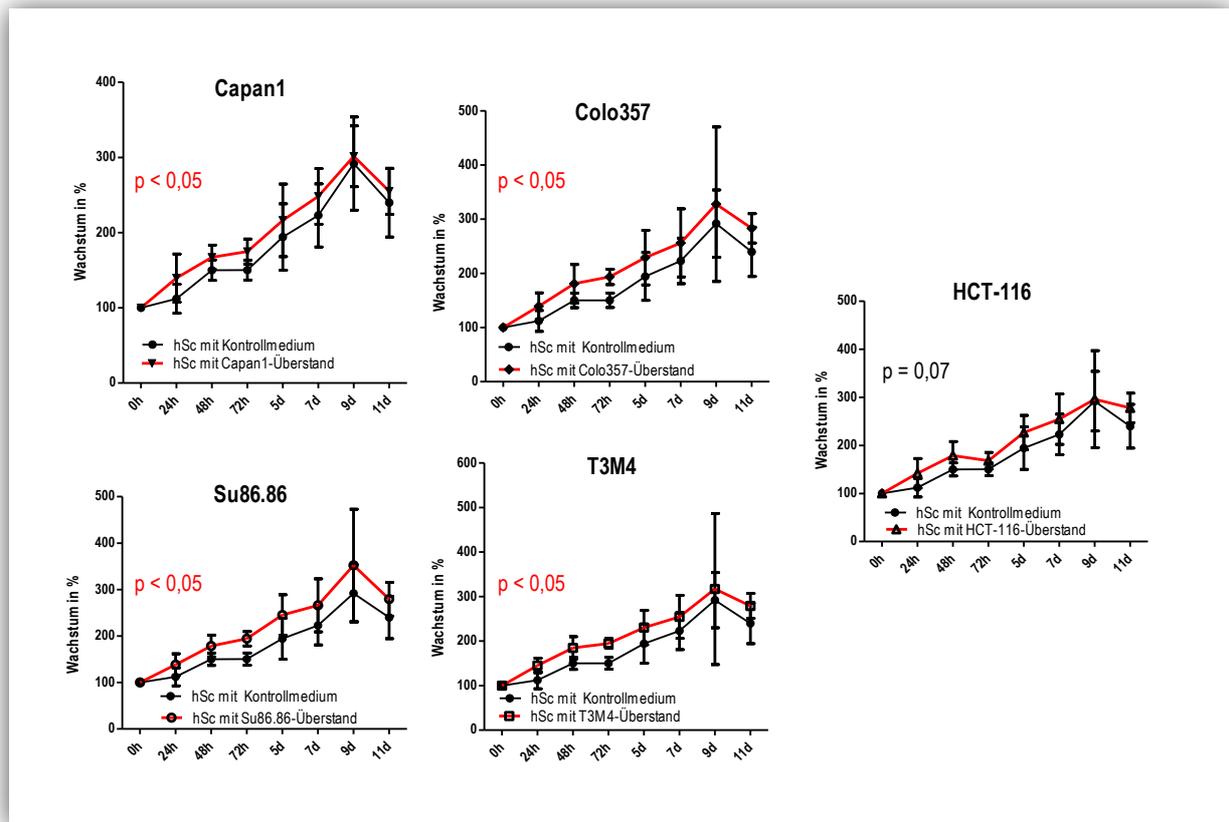


**Abb. 11: Intermediärfilamente der Schwannschen Zellen in Pankreaskarzinomzell-konditionierten Medien**

Darstellung der Immunoblot-Analyse von humanen Schwannschen Zellen kultiviert in serumfreiem Medium (SFM), in serumfreiem Medium mit Stimulation durch den Nerve Growth Factor (NGF), in Überständen (ÜS) der Pankreaskarzinom-Zelllinien T3M4, Su86.86, Colo 357 und Capan1.

## **Pankreaskarzinomzellen, jedoch nicht Kolonkarzinomzellen, vermitteln eine vermehrte Proliferation der hSc**

Zur Erfassung eines potentiell Glia-aktivierenden Effekt der Pankreaskarzinomzellen, wurden hSc mit Überständen unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien, aber auch zum Vergleich mit Kolonkarzinomzellüberständen bis zu 11 Tage behandelt und die Proliferationsrate detektiert (Abb.12). Der für ein herkömmliches MTT-Assay ungewöhnlich langer Zeitraum von 11 Tagen wurde gewählt, da die hSc einen langsameren Zellzyklus aufweisen als z.B. die Karzinomzellen. Bereits nach 24 Stunden überstieg die durchschnittliche Proliferationsrate der hSc, die mit PCa-Zellüberständen behandelt wurden, die der unbehandelten hSc und verdeutlichte sich zunehmend im Laufe des gesamten Beobachtungszeitraums von 11 Tagen (Colo357:  $117,9 \pm 19,5\%$ ; Su86.86:  $122,3 \pm 20,8\%$ ; T3M4:  $120,3 \pm 23,2\%$  im Vergleich zur Kontrolle:  $100 \pm 15,28\%$ ). Dahingegen war dieser Effekt bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 nicht signifikant ( $115,6 \pm 22,3\%$  im Vergleich zur Kontrolle:  $100 \pm 15,28\%$ ).



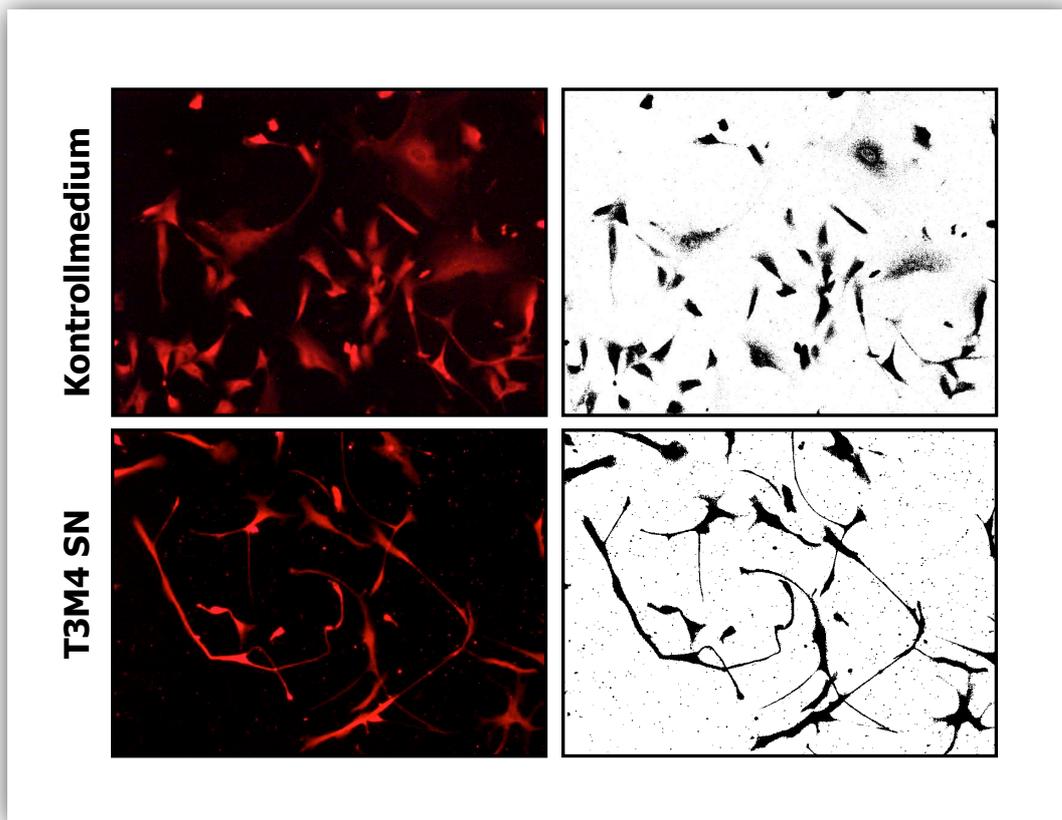
**Abb. 12: Der Einfluss der Pankreaskarzinomzelllinien Capan1, Colo357, Su86.86 und T3M4, sowie der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 auf die Proliferation der humanen Schwannschen Zellen.**

Im Vergleich zum Kontrollmedium führte die Behandlung der Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzell-Überständen zu einer Proliferationssteigerung der Schwannschen Zellen. Dieser Effekt konnte unter der Behandlung mit Überständen der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 nicht nachgewiesen werden.

## Die Kultivierung der hSc mit Pankreaskarzinomzell-Überständen führt zu einer Hypertrophie und „Stellatisierung“ der hSc

Zur Erfassung der Aktivierung der hSc wurde auch das dritte Kardinalmerkmal der zentralen aktivierten Glia, nämlich die somatische Hypertrophie und die Stern-ähnliche Zellkonformationsänderung (Stellatisierung) in den hSc unter Einfluss der Pankreaskarzinomzellüberständen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die auf 13mm Glas-Coverslips in 24-well-Platten ausgesäten hSc mit Karzinomzellüberständen

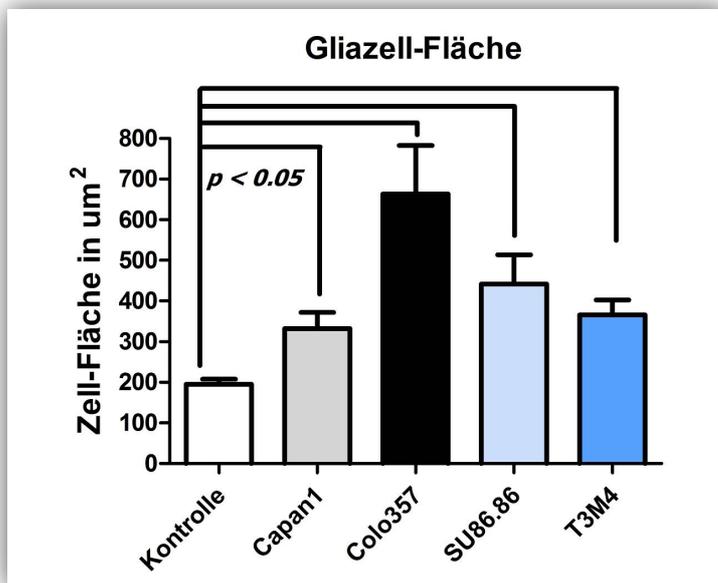
für 48h inkubiert. Zum Ende dieses Zeitraums wurden die Zellen nach Formalinfixierung zur Visualisierung mittels Anti-GFAP-Antikörper in Immunzytofluoreszenz-Technik gefärbt und auf ihre Zellgröße hin mit Kontrollmedium behandelten hSc verglichen. Beeindruckender Weise nahmen die hSc, die mit PCa-Zellüberständen behandelt wurden, eine der aktivierten zentralen Astroglia ähnlichen Konformation an, und wiesen dadurch eine sternähnliche Konformationsänderung auf, die bei den Astroglia als „Stellatisierung“ bezeichnet wird (Abb. 13). Diese Zellkonformationsänderung spiegelte sich an der Zellfläche der hSc im Sinne einer deutlichen Zunahme der durchschnittlichen Zellfläche unter Behandlung der Pankreaskarzinomzellüberständen wieder. Damit konnten wir eindrücklich zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen neben der Stellatisierung auch eine deutliche zelluläre Hypertrophie der hSc induzieren können (Abb. 14).



**Abb. 13: „Schwanzzell-Stellatisierung“ in Pankreaskarzinomzell-konditioniertem Medium**

Verglichen mit den Schwannschen Zellen, die in Kontrollmedium kultiviert werden, bilden die Schwannschen Zellen, die mit Überständen (SN) der Pankreaskarzinomzelllinien Capan1, Colo357, Su86.86 und T3M4 behandelt werden, längere zelluläre

re Ausläufer und nehmen eine sternähnliche Konformation an. Zur Erfassung der Zellfläche wurde eine Immunofluoreszenz-färbung gegen GFAP auf 13mm-Coverslips kultivierten hSc durchgeführt.



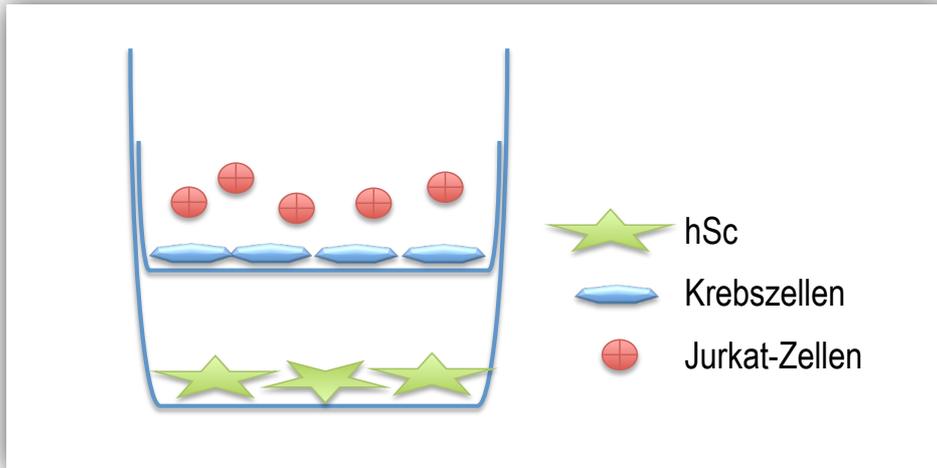
**Abb. 14: Die Zunahme der Gliazellfläche durch Pankreaskarzinomzell-konditioniertes Medium**

Unter Kultivierung der Schwannschen Zellen in Pankreaskarzinomzell-Überständen (Capan1, Colo357, SU86.86 und T3M4) kommt es zu einer Vergrößerung der Gliazellfläche verglichen zu den Schwannschen Zellen, die im Kontrollmedium kultiviert wurden.

### **Co-Kultivierung von Schwannschen Zellen mit Pankreaskarzinomzellen und T-Lymphozyten verstärkt die Expression von GFAP in den Schwannschen Zellen**

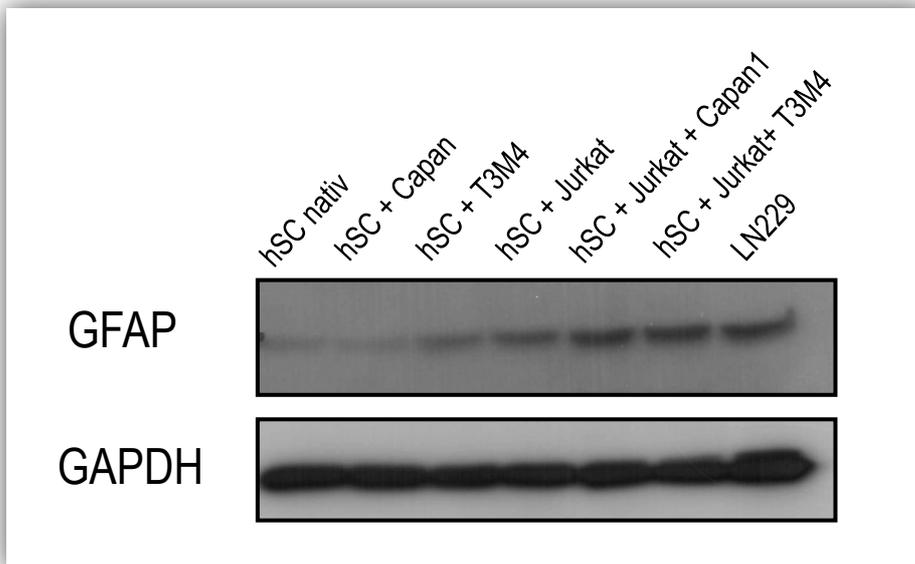
Die Co-Kultur der hSc mit der T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat und den Pankreaskarzinomzellen führte zu einer deutlicheren Aktivierung der hSc, als mit einer Ko-Kultur mit Pankreaskarzinomzellen alleine (Abb. 15). Die Aktivierung der peripheren Glia in Folge eines Nervenschadens induziert eine prominente Rekrutierung von Entzündungszellen, hierbei insbesondere T-Lymphozyten aber auch Makrophagen (Scholz et al. 2007). Diese Zellen sezernieren in der Nähe des geschädigten Nervs neben proinflammation-

torischen Zytokinen auch pro-apoptotische Signale für Gliazellen und unterstützen diese im Rahmen der nervalen Reparatur- und Umbauprozesse (Keswani et al. 2003) . Desweiteren induzieren sie nozizeptive Signale und neurotrophe Faktoren, die die peripheren schmerzleitenden Nervenendigungen sensibilisieren. Damit ist die Neuroinflammation eines der Hauptmerkmale des peripheren Nervenschaden, der peripheren Neuropathie, aber auch diverser neuropathischer Schmerzsyndrome. Eine ähnliche Neuroinflammation ist im Pankreaskarzinom im Falle der pankreatischen Neuritis mit einer besonderen Häufigkeit zu beobachten. Voruntersuchungen konnten zeigen, dass der Schweregrad der pankreatischen Neuritis mit dem Ausmaß der neuroplastischen Veränderungen im Pankreaskarzinom stark korreliert (Ceyhan et al. 2009) . Um eine mögliche Transaktivierung der hSc im Pankreaskarzinom über die gleichzeitige Präsenz von Karzinomzellen und begleitenden T-Lymphozyten zu simulieren, wurde eine Dreifach-Ko-Kultur von hSc zusammen mit Pankreaskarzinomzellen und Lymphozyten der Jurkat-Zelllinie durchgeführt (Skizze 1). In diesem Ansatz kam es interessanterweise nicht nur zu einer deutlichen Hochregulation des Intermediärfilaments GFAP durch Pankreaskarzinomzellen alleine, sondern dieser Effekt war umso stärker, als die hSc mit Pankreaskarzinomzellen und Jurkat-T-Lymphozyten für 48 Stunden simultan co-kultiviert wurden (Abb. 14). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch im Pankreaskarzinom, analog zu anderen peripheren Neuropathien, Entzündungszellen, insbesondere T-Lymphozyten einen aktivierenden Einfluss auf die hSc haben.



**Skizze 1: 3x-Ko-Kultur von hSc mit Jurkat-Zellen und Pankreaskarzinomzellen**

Die hSc wurden in 6-well-Platten ausgesät. Nach 24 h Kultivierung werden Co-Kultur-Inserts eingesetzt und die als Monolayer wachsenden Pankreaskarzinomzellen sowie die in Suspension wachsenden Jurkat-Zellen in das Co-Kultur-Insert hinzugefügt.



**Abb. 15: Die Dreifach-Co-Kultur von hSc mit T-Lymphozyten und Pankreaskarzinomzellen führt zu einer höheren Expression von GFAP als die Co-Kultivierung von hSc mit Pankreaskarzinomzellen alleine.**

Die Kultivierung der humanen Schwannschen Zellen in Co-Kultur mit den Pankreaskarzinomzelllinien T3M4 oder Capan1 und der T-Lymphozytenzelllinie Jurkat führt zu einer Expressionssteigerung des intrazellulären Intermediärfilaments GFAP im Vergleich zu den Schwannschen Zellen, die nur in Co-Kultur mit den Pankreaskarzinomzelllinien Capan1 und T3M4 kultiviert wurden.

## Diskussion

Die pankreatische Neuropathie im Pankreaskarzinom, mit der Präsentation einer erhöhten Nervendichte, einer isolierten Nervenhypertrophie, einer pankreatischen Neuritis und neuralen Invasion, stellt eines der eindrucklichsten Beispiele für eine Neuropathie viszeraler Nerven dar (Ceyhan et al. 2009). Es konnte auch imponierend nachgewiesen werden, dass genau diese pankreatische Neuropathie im Pankreaskarzinom unmittelbar an der Entstehung der abdominellen Schmerzsymptomatik der Patienten und somit der Ausbildung eines neuropathischen Schmerzsyndroms in Verbindung steht (Ceyhan et al. 2010). Jedoch gingen bisherige Untersuchungen bezüglich der pankreatischen Neuropathie im Pankreaskarzinom nicht auf die Aktivierung der Gliazellen ein, die eines der klassischen Merkmale zentraler und peripherer Neuropathien darstellen. Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, den Aktivierungsgrad der intrapancreatischen Gliazellen, also den Schwannschen Zellen, im Pankreaskarzinom näher zu beschreiben und auf vor allem auf funktioneller Ebene *in vitro* im Detail zu ermitteln.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte eindrücklich demonstriert werden, dass periphere Gliazellen (Schwannschen Zellen) im Pankreaskarzinom durch äußere Einflüsse des Tumormikromilieus entscheidend beeinflusst werden konnten. Hier zeigte sich, dass die Tumorphypoxie, die Interaktion mit Entzündungszellen oder die direkte Exposition zu Pankreaskarzinomzellen, einen aktivierten Zustand der Schwannschen Zellen bedingen konnte. Wenn man die entscheidende Rolle der glialen Aktivierung für Neuroplastizität, Neuropathie und neuropathische Schmerzen berücksichtigt, könnten diese neuen Erkenntnisse zum besseren Verständnis der pankreatischen Neuropathie im Pankreaskarzinom und der damit assoziierten neuropathischen Schmerzen beitragen.

Wenn man die untersuchten, potenziell Glia-aktivierenden Faktoren im Pankreaskarzinom vergleicht, dann sieht man, dass das größte Ausmaß an Gliazellaktivierung durch die Hypoxie bedingt wird. Interessanterweise haben die Gliazellen bereits 15 Minuten nach Beginn der Hypoxie-Exposition einen aktivierten Zustand eingenommen, was die äußerst hohe Hypoxiesensitivität dieser Schwannschen Zellen verdeutlicht. Wenn man in diesem Zusammenhang die Schwannschen Zellen mit anderen im

Pankreaskarzinom vorhandenen Zelltypen, wie zum Beispiel den Stern-Zellen („pancreatic stellate cells“) vergleicht, fällt auf, dass diese Zellen über viel längere Zeiten (bis zu 72 Stunden) in hypoxischem Milieu ausharren können, ohne dabei aktiviert zu werden (Erkan et al. 2009).

Die Aktivierung der Schwannschen Zellen unter Hypoxie ist unabhängig der Ergebnisse im Pankreaskarzinom ein bisher noch nicht beschriebener Effekt und konnte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit erstmalig demonstriert werden. Die Aktivierung der Glia ist ein ausgesprochen gut untersuchtes Phänomen im zentralen Nervensystem, insbesondere als Folge von hypoxischem oder traumatischem Hirnschaden (Richard et al. 1999; Buffo et al. 2010). Es konnte bereits demonstriert werden, dass es im Rahmen einer zerebralen Ischämie zu einer Aktivierung der Astrozyten kommt, welche durch eine vermehrte Proliferation, eine Überexpression der Intermediärfilamente und eine Zellhypertrophie gekennzeichnet ist (Qiu et al. 2011) (Buffo et al. 2010).

In dieser Dissertationsarbeit konnten erstmals dieselben Aktivierungserscheinungen für die periphere Glia, in diesem Fall die Schwannschen Zellen, gezeigt werden. Offensichtlich sind die Aktivierungsmechanismen, die als Folge eines lokalen Sauerstoffmangels in den Gliazellen angeschaltet werden, dieselben im peripheren Nervensystem wie im zentralen Nervensystem. Die Reparaturmechanismen, die durch das hypoxische Tumormilieu im Pankreaskarzinom aktiviert werden, scheinen am ehesten demselben Zweck zu dienen wie im zentralen Nervensystem, nämlich der Regeneration von geschädigten neuronalen Komponenten. Dies wiederum würde voraussetzen, dass eine vermehrte Bildung von trophischen Signalen für die Neurone stattfindet. Im Falle eines Nervenschadens stammen diese Signale bekanntermaßen vor allem aus den aktivierten Gliazellen. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Schwannsche Zellen im Rahmen einer Hypoxie-Exposition den Nerve Growth Factor (NGF) hochregulieren und den Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) runterregulieren (Zhu et al. 1999). Die Hochregulation von NGF scheint daher ein entscheidender Mechanismus zur Regeneration der hypoxiegeschädigten Axone zu sein. In der vorliegenden Studie konnte zusätzlich zu NGF ein weiteres Mitglied der GDNF-Familie, Neurturin, als ein durch Hypoxie aktivierten neurotrophen Faktor identifiziert werden. Neurturin ist ein potenter Wachstumsfaktor für enterische Neurone und ist essentiell

für die korrekte Ausbildung des enterischen Nervensystems, aber auch der pankreatischen und somato-sensorischen Innervation (Heuckeroth et al. 1999) .

Hier ist es gut denkbar, dass neben dem hypoxischen Milieu, welches einen Einfluss auf den Zellmetabolismus aufweist, auch Zellen bzw. zelluläre Mediatoren die Aktivierung von peripheren Gliazellen im Pankreaskarzinom vermitteln können. Die zwei wahrscheinlichsten Akteure in diesem Zusammenhang waren die Pankreaskarzinomzellen einerseits und die Entzündungszellen andererseits. Die Ergebnisse in der vorgelegten Dissertationsarbeit zeigen eindeutig, dass die Pankreaskarzinomzellen *per se* einen Proliferations-steigernden und Zellhypertrophie-induzierenden Effekt auf die humanen Schwannschen Zellen haben. Jedoch war dieser Effekt der Pankreaskarzinomzellen nicht ausreichend genug, um eine zytoskelettale Aktivierung der Schwannschen Zellen zu induzieren, das mit einer erhöhten Motilität der Zellen assoziiert gewesen wäre. Die Hochregulation dieser so genannten Intermediärfilamente, im Falle der humanen Schwannschen Zellen, vor allem des GFAP, war durch die simultane Ko-Kultur von Pankreaskarzinomzellen zusammen mit T-Lymphozyten wesentlich eindrücklicher. Die Aktivierung der Schwannschen Zellen durch Entzündungszellen stellt einen der integralen Mechanismen als Antwort auf Nervenschäden im Rahmen der Wallerschen Degeneration dar. Die nach Axon-durchtrennung proliferierenden aktivierten Schwannschen Zellen stellen zahlreiche aktivierende Chemokine, wie die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukine IL 1 $\beta$ , 6, 12 und 18, sowie Tumor Necrosis Factor (TNF) und anti-inflammatorische oder regulatorische Zytokine wie IL-10 zur Verfügung, um eine lokale Entzündungsreaktion um den geschädigten Nerven zu induzieren. Diese Entzündungszellinfiltrate im Rahmen der Wallerschen Degeneration bestehen hauptsächlich aus zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen. Die infiltrierenden Entzündungszellen können aber auch durch Bildung von Wachstumsfaktoren oder Interleukinen die Schwannschen Zellen im Sinne eines positiven Feedbacks weiter aktivieren und damit den Reparaturprozess beschleunigen (Stoll et al. 2002) , (Guertin et al. 2005) (Scholz et al. 2007).

Ähnlicherweise konnte in der vorgelegten Studie demonstriert werden, dass T-Lymphozyten, die einer Kultivierung von Pankreaskarzinomzellen und Schwannschen Zellen zugefügt werden, einen zusätzlichen aktivierenden Effekt ausüben können. Es ist daher anzunehmen, dass die initiale Aktivierung der humanen Schwannschen Zellen durch die Präsenz von Pankreaskarzinomzellen oder aber auch durch den Nervenschaden, den diese Karzinomzellen verursachen, durch Entzündungszellen, wie zum Beispiel den T-Lymphozyten, potenziert wird. Somit scheint die Aktivierung der Gliazellen im Falle des Pankreaskarzinoms viele Aspekte der Glia-Aktivierung in der Wallerschen Degeneration nachzuahmen.

Eine sehr interessante Erkenntnis in Bezug auf die gliale Aktivierung in der vorgelegten Studie stellt die Hochregulierung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6, 8 und 12 sowie des Interleukin-1-Rezeptor  $\alpha$  dar. Diese Hochregulation von Interleukinen kannte man schon im Rahmen der Reparaturvorgänge bei einer peripheren Nervenschädigung, sowie als Antwort auf eine mechanische Schädigung und Schädigung durch Hypoxie/Ischämie der Astrozyten im zentralen Nervensystem. Hierbei kommt es ebenfalls zu einer Hochregulation von IL-1, TNF $\alpha$  und IF $\gamma$  (Lau et al. 2001). Die erhöhte Interferon- $\gamma$  als Antwort auf die hypoxischen Bedingungen der humanen Schwannschen Zellen leisten ebenfalls einen Beitrag zu dem pro-inflammatorischen Milieu. Durch die Ausschüttung des Chemokins IP10 kommt es zu einer chemoattraktiven Wirkung auf Lymphozyten. Auch MCP1 wirkt als Chemokin und fördert so das Entzündungsmilieu und die Infiltration der T-Lymphozyten. Ein sehr interessanter Aspekt ist die Hochregulierung von VEGF, der das Angiogenese-induzierende Potential der humanen Schwannschen Zellen unter Hypoxie hervorhebt. Dieses Potential ist für die Sternzellen im Pankreaskarzinom sowie für Epithelzellen bekannt, jedoch wurde diese Erkenntnis für Schwannsche Zellen bislang nicht veröffentlicht (Gupta et al. 2005). Der Fibroblasten Growth Factor (basic FGF) unterstützt als stark neurotropher Faktor die Neuritenbildung, so dass unter Hypoxie die Schwannschen Zellen offensichtlich andere Faktoren als bFGF zur Nervenregeneration ausschütten.

Zusammengefasst scheint die Hypoxie neben der Aktivierung der Schwannschen Zellen auch einen proinflammatorischen Schwann-Zell-Phänotyp zu induzieren, welcher durch Chemoattraktion und Aktivierung von Entzündungszellen zur Entstehung einer Neuritis und Neuroinflammation beitragen,

sogar auch induzieren kann. Damit zeigen diese Ergebnisse nicht nur eine potentielle Verbindung zwischen Hypoxie und Gliazellaktivierung, sondern auch eine dreischichtige Interaktion zwischen Tumorphypoxie, Gliazellaktivierung und Nervenentzündung.

Viele solide Tumore weisen eine Tumorphypoxie auf, insbesondere weil die Tumore aufgrund ihrer starken Proliferation einen erhöhten Sauerstoffbedarf haben, obwohl die soliden Tumore durch das reichlich vorhandene Stroma einen relativen Mangel an Blutgefäßen aufweisen (Richard et al. 1999) . Insbesondere im Pankreaskarzinom ist dieser relative Mangel am Ausgeprägtesten. Beispielsweise konnten Olive et al. zeigen, dass im murinen und humanen Pankreaskarzinom die Gefäßdichte im Tumorgewebe erheblich niedriger ist, weshalb die Chemotherapeutika nicht bis in das Tumorgewebe vordringen können (Olive et al. 2009) . Desweiteren ist die Hypoxie problematisch, weil es durch einen relativen Sauerstoffmangel zu einer Aktivierung von Hypoxia inducible Factor 1  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) kommt. HIF1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von zahlreichen Wachstumsfaktoren, aber auch von pro-angiogenetischen Faktoren, wie vor allem VEGF (Vascular endothelial growth factor) induzieren kann. Dies bedeutet, dass das hypoxische Tumormilieu das Tumorstadium durch eine direkte Stimulation der Angiogenese unterstützen kann. Das fast sogar größere Problem scheint zu sein, dass es durch die Hypoxie zu einer lokalen Selektion der aggressiveren überlebenden Tumorzellklone im Primärtumor kommt und viele überlebensaktivierende, Invasivitäts-fördernde und Metastasen-triggender Signalwege mitaktiviert werden (Chang et al. 2011) , (Onozuka et al. 2011) .

Bis heute jedoch gibt es keine Daten zwischen dem Zusammenhang von Tumorphypoxie und der pankreatischen Neuropathie. Daher stellte sich in der vorliegenden Studie vor allem zugleich die Frage, ob die Tumorphypoxie auch die intrapancreatischen Nerven mitbeeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der spezifische Hypoxie-Marker Carboanhydrase-IX benutzt, So konnte erstmals gezeigt werden, dass nicht nur die metabolisch hochaktiven Karzinomzellen durch Hypoxie beeinflusst werden, sondern auch ein Teil der intrapancreatischen Nerven. Somit hat man einerseits die Möglichkeit die potenziell durch Hypoxie befallenen Nerven zu identifizieren, aber auch solche Nerven in Bezug auf Gliazellaktivierung zu untersuchen. Wie genau es aber zu einer Hochregulierung der Carboanhydrase-

IX im gesamten Nerv kommt, das heißt, nicht nur in den Schwannschen Zellen sondern auch in den axonalen Komponenten, bleibt unklar.

Abschließend stellt sich die wichtigste Frage, welche klinische und vor allem therapeutische Relevanz aus den Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit hervorgehen können. Diese neu ermittelten Erkenntnisse zeigen, dass die Glia-Aktivierung, vor allem durch die Tumorhypoxie, einen Hauptfaktor in der Entstehung der pankreatischen Neuropathie und des neuropathischen Schmerzsyndroms bei den Pankreaskarzinom-Patienten darstellt. Zukünftige Studien sollten anhand von *in vivo* Modellen verifizieren, ob zunehmende Tumorhypoxie im Pankreaskarzinomgewebe auch mit erhöhtem Schmerzempfinden assoziiert ist. Aber unabhängig davon deuten diese Ergebnisse auf die potenzielle Wirksamkeit neuropathischer Therapiemöglichkeiten, wie zum Beispiel mit Neuroleptika, GABA-Inhibitoren, etc. in der Behandlung von Pankreaskarzinom-assoziierten Schmerzen. Desweiteren stellt sich auch die interessante Frage, ob die aktivierte Glia mit ihrer erhöhten Expression an neurotrophen Faktoren wie NRTN und NGF und weiteren zahlreichen pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 die Aggressivität der Pankreaskarzinomzellen und damit die neurale Invasion potenzieren und somit die Prognose der Patienten mit Pankreaskarzinom entscheidend beeinflussen kann.

## Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die pankreatische Neuropathie im Pankreaskarzinom ist durch eine erhöhte Nervenfaserdichte, eine neurale Hypertrophie, nervale Invasion und pankreatische Neuritis und die Entstehung von neuropathischen Schmerzen charakterisiert. Im Rahmen der Beschreibung dieser besonderen viszeralen Neuropathie im letzten Jahrzehnt wurde aber auf die mögliche Beteiligung der glialen Aktivierung, welche ein elementarer Bestandteil und Mechanismus der Neurodegeneration und neuropathischen Schmerzsyndromen ist, nicht näher eingegangen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Tumor-Mikro-Umgebung im Pankreaskarzinom eine Aktivierung der peripheren Gliazellen, der Schwannschen Zellen, induzieren kann. Die Tumorphoxie, die einen der wichtigsten Metastasen- und Invasions-fördernden Faktor im Pankreaskarzinom darstellt, wurde hierbei als der führende Gliazell-aktivierende Faktor in den peripheren Nerven identifiziert. Analog dem zentralen Nervensystem kommt es durch die Hypoxie zu einer Hochregulation der Intermediärfilamente GFAP, Nestin und Vimentin in den Schwannschen Zellen. Diese Hypoxie-bedingte Gliazellaktivierung im Pankreaskarzinom weist aber auch zusätzliche besondere Merkmale auf. Insbesondere kommt es zu einer Hypoxie-bedingten Sekretion zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine, die die lokale nervale Entzündung potenzieren können. Nicht nur aber die Hypoxie als alleiniger Faktor, sondern aber auch die zellulären Hauptbestandteile der Pankreaskarzinom-Mikroumgebung, die Pankreaskarzinomzellen als auch die T-Lymphozyten induzieren eine Hochregulation des Intermediärfilaments GFAP, eine verstärkte Schwann-Zell-Population und eine Schwann-Zell-Hypertrophie, ähnlich der Stellatisierung der aktivierten Gliazellen des zentralen Nervensystems.

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Verwendung eines spezifischen Hypoxiemarkers, Carboanhydrase IX, erstmals gezeigt werden, dass neben den Pankreaskarzinomzellen, auch die intrapancreatischen Nerven im Pankreaskarzinom eine zelluläre Hypoxie aufweisen und Bestandteil der Hypoxie-induzierten Gliazellaktivierung sein können. Die erstmalige Demonstration der Gliazellaktivierung in einer viszero-neuropathischen Tumorerkrankung kann als eine entscheidende

Erkenntnis in der Entwicklung zukünftiger Therapiemöglichkeiten für die neuropathisch bedingten quälenden Schmerzen und die stark eingeschränkte Prognose der Pankreaskarzinom-Patienten dienen.

## Literatur

- Beggs, S. and M. W. Salter. "Stereological and somatopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury." *Brain Behav Immun* 21(2007) 624-633.
- Bockman, D. E., M. Buchler and H. G. Beger. "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." *Gastroenterology* 107(1994) 219-230.
- Bruno, M. J., E. B. Haverkort, G. P. Tijssen, G. N. Tytgat and D. J. van Leeuwen. "Placebo controlled trial of enteric coated pancreatin microsphere treatment in patients with unresectable cancer of the pancreatic head region." *Gut* 42(1998) 92-96.
- Buffo, A., C. Rolando and S. Ceruti. "Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential." *Biochem Pharmacol* 79(2010) 77-89.
- Carroll, S. L., M. L. Miller, P. W. Frohnert, S. S. Kim and J. A. Corbett. "Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration." *J Neurosci* 17(1997) 1642-1659.
- Catalano, C., A. Laghi, F. Fraioli, F. Pediconi, A. Napoli, M. Danti, I. Reitano and R. Passariello. "Pancreatic carcinoma: the role of high-resolution multislice spiral CT in the diagnosis and assessment of resectability." *Eur Radiol* 13(2003) 149-156.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, B. Altintas, I. E. Demir, U. Hinz, M. W. Muller, T. Giese, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess. "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain-a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." *Gastroenterology* 136(2009) 177-186 e171.
- Ceyhan, G. O., K. H. Schafer, A. G. Kerscher, U. Rauch, I. E. Demir, M. Kadihasanoglu, C. Bohm, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese, M. Erkan and H. Friess. "Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma." *Ann Surg* 251(2010) 923-931.
- Chang, Q., I. Jurisica, T. Do and D. W. Hedley. "Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer." *Cancer Res* 71(2011) 3110-3120.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot and M. Ducreux. "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." *N Engl J Med* 364(2011) 1817-1825.
- Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., J. S. Silva, S. Poole, F. Q. Cunha and S. H. Ferreira. "A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(2005) 1755-1760.
- Demir, I. E., H. Friess and G. O. Ceyhan. "Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer." *Front Physiol* 3(2012) 97.
- DiMagno, E. P., H. A. Reber and M. A. Tempero. "AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association." *Gastroenterology* 117(1999) 1464-1484.
- Duffy, J. P., G. Eibl, H. A. Reber and O. J. Hines. "Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer." *Mol Cancer* 2(2003) 12.
- Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski, S. Deucker, D. Sauliunaite, S. Streit, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff. "Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Neoplasia* 11(2009) 497-508.
- Garcea, G., H. Doucas, W. P. Steward, A. R. Dennison and D. P. Berry. "Hypoxia and angiogenesis in pancreatic cancer." *ANZ J Surg* 76(2006) 830-842.

- Garnier, P., C. Demougeot, N. Bertrand, A. Prigent-Tessier, C. Marie and A. Beley. "Stress response to hypoxia in gerbil brain: HO-1 and Mn SOD expression and glial activation." *Brain Res* 893(2001) 301-309.
- Ghaneh, P., E. Costello and J. P. Neoptolemos. "Biology and management of pancreatic cancer." *Gut* 56(2007) 1134-1152.
- Giuliani, F., M. Di Maio, G. Colucci and F. Perrone. "Conventional chemotherapy of advanced pancreatic cancer." *Curr Drug Targets* 13(2012) 795-801.
- Guertin, A. D., D. P. Zhang, K. S. Mak, J. A. Alberta and H. A. Kim. "Microanatomy of axon/glial signaling during Wallerian degeneration." *J Neurosci* 25(2005) 3478-3487.
- Gupta, R., M. Gray, T. Chao, D. Bear, E. Modafferi and T. Mozaffar. "Schwann cells upregulate vascular endothelial growth factor secondary to chronic nerve compression injury." *Muscle Nerve* 31(2005) 452-460.
- Harris, A. L. "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." *Nat Rev Cancer* 2(2002) 38-47.
- Heuckeroth, R. O., H. Enomoto, J. R. Grider, J. P. Golden, J. A. Hanke, A. Jackman, D. C. Molliver, M. E. Bardgett, W. D. Snider, E. M. Johnson, Jr. and J. Milbrandt. "Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons." *Neuron* 22(1999) 253-263.
- Hockel, M. and P. Vaupel. "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." *J Natl Cancer Inst* 93(2001) 266-276.
- Hu, P., A. L. Bembrick, K. A. Keay and E. M. McLachlan. "Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve." *Brain Behav Immun* 21(2007) 599-616.
- Keswani, S. C., M. Polley, C. A. Pardo, J. W. Griffin, J. C. McArthur and A. Hoke. "Schwann cell chemokine receptors mediate HIV-1 gp120 toxicity to sensory neurons." *Ann Neurol* 54(2003) 287-296.
- Lau, L. T. and A. C. Yu. "Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury." *J Neurotrauma* 18(2001) 351-359.
- Lindholm, D., R. Heumann, M. Meyer and H. Thoenen. "Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve." *Nature* 330(1987) 658-659.
- Ma, W. and J. C. Eisenach. "Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury." *Neuroscience* 121(2003) 691-704.
- Maire, F., P. Hammel, P. Ponsot, A. Aubert, D. O'Toole, O. Hentic, P. Levy and P. Ruszniewski. "Long-term outcome of biliary and duodenal stents in palliative treatment of patients with unresectable adenocarcinoma of the head of pancreas." *Am J Gastroenterol* 101(2006) 735-742.
- Malin, S. A., D. C. Molliver, H. R. Koerber, P. Cornuet, R. Frye, K. M. Albers and B. M. Davis. "Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo." *J Neurosci* 26(2006) 8588-8599.
- Minniti, S., C. Bruno, C. Biasiutti, D. Tonel, A. Falzone, M. Falconi and C. Procacci. "Sonography versus helical CT in identification and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma." *J Clin Ultrasound* 31(2003) 175-182.
- Myer, D. J., G. G. Gurkoff, S. M. Lee, D. A. Hovda and M. V. Sofroniew. "Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury." *Brain* 129(2006) 2761-2772.
- Nakao, A., A. Harada, T. Nonami, T. Kaneko and H. Takagi. "Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer." *Pancreas* 12(1996) 357-361.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R. Padbury, M. J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M. N. Wenthe, J. R. Izbicki, H. Friess, M. M. Lerch, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, R. Doi, P. A. Lind, D. Smith, J. W. Valle, D. H. Palmer, J. A. Buckels, J. Thompson, C. J. McKay, C. L. Rawcliffe and M. W. Buchler. "Adjuvant

- chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial." *JAMA* 304(2010) 1073-1081.
- Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. Denicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Ruckert, R. Grutzmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths and D. A. Tuveson. "Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer." *Science* 324(2009) 1457-1461.
- Onozuka, H., K. Tsuchihara and H. Esumi. "Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs." *Cancer Sci* 102(2011) 975-982.
- Parkin, D. M., F. I. Bray and S. S. Devesa. "Cancer burden in the year 2000. The global picture." *Eur J Cancer* 37 Suppl 8(2001) S4-66.
- Pekny, M., U. Wilhelmsson, Y. R. Bogestal and M. Pekna. "The role of astrocytes and complement system in neural plasticity." *Int Rev Neurobiol* 82(2007) 95-111.
- Pleskow, D. K., H. J. Berger, J. Gyves, E. Allen, A. McLean and D. K. Podolsky. "Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer." *Ann Intern Med* 110(1989) 704-709.
- Posner, M. R. and R. J. Mayer. "The use of serologic tumor markers in gastrointestinal malignancies." *Hematol Oncol Clin North Am* 8(1994) 533-553.
- Qiu, Y., J. Pan, Y. Li, X. Li, M. Li, I. Abukhousa and Y. Wang. "Relationship between activated astrocytes and hypoxic cerebral tissue in a rat model of cerebral ischemia/reperfusion." *Int J Neurosci* 121(2011) 1-7.
- Richard, D. E., E. Berra and J. Pouyssegur. "Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia." *Biochem Biophys Res Commun* 266(1999) 718-722.
- Rossi, J., P. Santamaki, M. S. Airaksinen and K. H. Herzig. "Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2)." *Diabetes* 54(2005) 1324-1330.
- Ruan, K., G. Song and G. Ouyang. "Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer." *J Cell Biochem* 107(2009) 1053-1062.
- Schafers, M., D. H. Lee, D. Brors, T. L. Yaksh and L. S. Sorkin. "Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation." *J Neurosci* 23(2003) 3028-3038.
- Scholz, J. and C. J. Woolf. "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." *Nat Neurosci* 10(2007) 1361-1368.
- Seiler, C. A., M. Wagner, C. Sadowski, C. Kulli and M. W. Buchler. "Randomized prospective trial of pylorus-preserving vs. Classic duodenopancreatectomy (Whipple procedure): initial clinical results." *J Gastrointest Surg* 4(2000) 443-452.
- Shubayev, V. I., M. Angert, J. Dolkas, W. M. Campana, K. Palenscar and R. R. Myers. "TNFalpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve." *Mol Cell Neurosci* 31(2006) 407-415.
- Siegel, R., E. Ward, O. Brawley and A. Jemal. "Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths." *CA Cancer J Clin* 61(2011) 212-236.
- Stoll, G., S. Jander and R. R. Myers. "Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation." *J Peripher Nerv Syst* 7(2002) 13-27.
- Tofaris, G. K., P. H. Patterson, K. R. Jessen and R. Mirsky. "Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF." *J Neurosci* 22(2002) 6696-6703.

- Tran, K. T., H. G. Smeenk, C. H. van Eijck, G. Kazemier, W. C. Hop, J. W. Greve, O. T. Terpstra, J. A. Zijlstra, P. Klinkert and H. Jeekel. "Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard Whipple procedure: a prospective, randomized, multicenter analysis of 170 patients with pancreatic and periampullary tumors." *Ann Surg* 240(2004) 738-745.
- Treede, R. D., T. S. Jensen, J. N. Campbell, G. Cruccu, J. O. Dostrovsky, J. W. Griffin, P. Hansson, R. Hughes, T. Nurmikko and J. Serra. "Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes." *Neurology* 70(2008) 1630-1635.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza. "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(1995) 5510-5514.
- Wolf, G., E. Gabay, M. Tal, R. Yirmiya and Y. Shavit. "Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice." *Pain* 120(2006) 315-324.
- Wong, G. Y., D. R. Schroeder, P. E. Carns, J. L. Wilson, D. P. Martin, M. O. Kinney, C. B. Mantilla and D. O. Warner. "Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial." *JAMA* 291(2004) 1092-1099.
- Wouters, B. G. and L. D. Skarsgard. "Low-dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the "adaptive response" and cannot be explained by a subpopulation of sensitive cells." *Radiat Res* 148(1997) 435-442.
- Ying, J. E., L. M. Zhu and B. X. Liu. "Developments in metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the standard?" *World J Gastroenterol* 18(2012) 736-745.
- Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc and M. W. Buchler. "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." *J Clin Oncol* 17(1999) 2419-2428.
- Zochodne, D. W., D. Levy, H. Zwiers, H. Sun, I. Rubin, C. Cheng and M. Lauritzen. "Evidence for nitric oxide and nitric oxide synthase activity in proximal stumps of transected peripheral nerves." *Neuroscience* 91(1999) 1515-1527.

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Güralp O. Ceyhan bedanken. Du hast im Juni 2009 während meines Praktikumtags bei Dir auf Station die Weichen sowohl für meinen beruflichen, als auch meinen privaten Weg gestellt. Du hast mich motiviert, mein Interesse für die Forschung und wissenschaftliches Arbeiten geweckt, mich gefordert und gefördert, mich manchmal an meine Grenzen gebracht, jedoch auch ein offenes Ohr gehabt, wenn ich nicht mehr weiter wusste.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Friess für die Möglichkeiten, die er mir geboten hat und die Unterstützung, die er mir entgegengebracht hat und bringt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, AG Ceyhan. Dr. rer. nat. Timo Kehl für die Einarbeitung und Unterstützung vor allem in der Anfangsphase. Ulrike Bourquain, die sich für alle und alles im Labor so gut kümmert. Meinen Kollegen Dr. Jan D'Haese, Daniel Hartmann und Florian Liebl, dass sie immer ein offenes Ohr haben und sich unser Zusammenleben nicht nur auf die Klinik beschränkt.

Herrn Prof. Dr. J. Schlegl und Frau Dr. Melanie Laschinger für den Input und die Hilfe bei schwierigen Fragestellungen, sowie die freundliche Bereitstellung von benötigten Zelllinien. Priv.-Doz. Dr. Mert Erkan und Priv.-Doz. Dr. Christoph Michalski für anregende Gespräche, wertvollen Tipps und Hilfestellungen. Frau Dr. E. Costello-Goldring und Frau Dr. V. Shaw für die Unterstützung bei den Multiplex-ELISA-Versuchen.

Ich danke Dr. med. I. Ekin Demir von ganzem Herzen für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die Hilfe, sowie das Verständnis und alles darüber hinaus. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen!

Der Großteil meines Dankes gilt meiner Familie, die mich immer tatkräftig unterstützt, an mich geglaubt und liebevoll für mich gesorgt hat.