

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

**Die funktionale Analyse der Schwann-Zell-assoziierten Adhäsionsmoleküle
in der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom**

Lea Martina Krauß

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Dirk Busch

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Güralp Onur Ceyhan

2. Prof. Dr. Hana Algül

Die Dissertation wurde am 01.02.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.05.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
1. DAS PANKREASKARZINOM	1
1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.2 Klinik und Therapie	2
1.3 Tumorpathogenese und Pathologie	3
2. NEURALE INVASION IM PANKREASKARZINOM	4
3. SCHWANNSCHE ZELLEN UND IHRE ADHÄSIONSMOLEKÜLE	9
3.1 Cadherine und N-Cadherin	10
3.2 Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22)	12
II. ZENTRALE FRAGESTELLUNG	15
III. MATERIAL UND METHODEN	17
1. MATERIALIEN	17
1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	17
1.2 Allgemeine Geräte	17
1.3 Allgemeine Reagenzien	17
1.4 Spezielle Materialien für Immunhistochemie und Immunzytofluoreszenz	18
1.5 Spezielle Materialien für Protein-Untersuchungen	19
1.6 Spezielle Materialien für RNA-Untersuchungen	22
1.7 Spezielle Materialien für Zellkultur	23
1.7.1 Materialien für Adhäsionsassay	25
1.7.2 Materialien für Migrationassay	25
1.7.3 Materialien für Invasionassay	25
1.8 Software	26
2. METHODEN	26
2.1 Patienten	26
2.2 Immunhistochemische Untersuchungen	26
2.2.1 Aufbereitung der Gewebeschnitte	26
2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	27
2.2.3 Immunhistochemische Färbung von PGP 9.5	27
2.2.4 Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin	27
2.2.5 Immunhistochemische Färbung von PMP22	27
2.2.6 Auswertung der Immunhistochemie	27
2.3 Immunzytofluoreszenz PMP22	28
2.4 Proteinchemische Untersuchungen	29
2.4.1 Lysaterstellung aus Zellen	29
2.4.2 Lysaterstellung aus Gewebe	29
2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	29
2.4.4 Probenherstellung für Westernblot	29
2.4.5 Westernblot	30
2.4.7 Auswertung Westernblot	31

2.5 RNA Untersuchungen	32
2.5.1 RNA-Extraktion aus Zellen	32
2.5.2 cDNA-Herstellung	32
2.5.3 PCR zur Primertestung	33
2.5.4 Quantitative Real-Time PCR	34
2.6 Zellbiologische Untersuchungen	35
2.6.1 Zelllinien und Zellkultivierung	35
2.6.2 Adhäsionsassay	37
2.6.3 Migrationassay	39
2.6.4 Stimulation der Zellen zur Myelinbildung	41
2.6.5 Ex vivo Invasionsassay	41
IV ERGEBNISSE	43
1. EXPRESSIONSANALYSE	43
1.1 Immunhistochemie von N-Cadherin und PMP22 in intrapankreatischen Nerven	43
1.1.1 Immunhistochemie von N-Cadherin im Normalpankreas und im Pankreaskarzinom	43
1.1.2 Immunhistochemie von PMP22 im Normalpankreas und im Pankreaskarzinom	44
1.1.3 Vergleich der Immunoreaktivität von N-Cadherin und PMP22 in Normalpankreas und PCa	46
1.2 Proteinchemische Untersuchungen von N-Cadherin auf SZ und PCa Zellen	47
1.3 Immunzytofluoreszenz von PMP22 auf Schwannschen Zellen	48
1.4 RNA-Untersuchungen von N-Cadherin und PMP22	49
1.5 Expressionsvergleich N-Cadherin, Beta-1-Integrin, NCAM, NrCAM, L1CAM, PMP22	51
2. KORRELATION DER IMMUNOREAKTIVITÄT N-CADHERIN UND PMP22 MIT NEURALER INVASION IM PANKREASKARZINOM	51
2.1 N-Cadherin	52
2.2 PMP22	53
3. FUNKTIONALE ANALYSEN VON N-CADHERIN UND PMP22 IN DER SCHWANN-ZELL-PCA-ZELL-ADHÄSION	54
3.1 Rolle von N-Cadherin für die Schwann-Zell-Tumorzell-Adhäsion	54
3.2 Rolle der Myelinisierung für die Neurale Invasion im Pankreaskarzinom	57
4. DIE ROLLE VON N-CADHERIN FÜR DIE TUMORZELLGERICHTETE MIGRATION DER SZ	59
4.1 Überprüfung der Spezifität der Schwann-Zell-Migration	59
4.2 Einfluss von N-Cadherin auf die Schwann-Zell-Migration	59
4.2.1 Einfluss von N-Cadherin auf Schwannschen Zellen auf die Schwann-Zell-Migration	60
4.2.2 Einfluss von N-Cadherin auf Pankreaskarzinomzellen auf die Schwann-Zell-Migration	61
V. DISKUSSION	62
VI. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	71
VII. LITERATURVERZEICHNIS	72

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
DAB	Diaminobenzidin
DRG	Dorsal root ganglion (Spinalganglion)
FMI	Forward Migration Index
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Hour (Stunde)
hSC	Humane Schwann-Zellen (human Schwann cells)
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunohistochemistry
IPMN	Intraduktale papillär muzinöse Neoplasie
kDa	Kilodalton
MCN	Muzinös cystische Neoplasie
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
N-Cad	N-Cadherin
NP	Normalpankreas
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCa	Pancreatic cancer (Pankreaskarzinom)
PCaZ	Pankreaskarzinom-Zellen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PMP22	Peripheres Myelin Protein 22
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
s	Sekunde
SZ	Schwannsche Zellen

I. Einleitung

1. Das Pankreaskarzinom

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren

2010 erkrankten 8020 Männer und 8060 Frauen in Deutschland an einem Pankreaskarzinom. Dies entspricht einer standardisierten Erkrankungsrate von 13,8 beziehungsweise 10 pro 100 000 Einwohner (Krebsregister des Robert-Koch-Instituts). Die standardisierte Sterberate von 12,8 beziehungsweise 9,5 zeigt, dass es sich um eine Tumorerkrankung mit einer äußerst ungünstigen Prognose handelt (Krebsregister des Robert-Koch-Instituts). In Deutschland liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 8 %. Damit ist das Pankreaskarzinom unter allen Krebserkrankungen die Tumorerkrankung mit der niedrigsten Überlebensrate und stellt die vierthäufigste Krebstodesursache dar (Krebsregister des Robert-Koch-Institut). Es handelt sich um eine Krebserkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 74 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen (Krebsregister des Robert-Koch-Institut).

Als gesicherter Risikofaktor für die Krankheitsentstehung gilt das Zigarettenrauchen, wobei 20-25 % der Pankreaskarzinome dadurch verursacht werden (Blackford, Parmigiani et al. 2009). Wie viele andere Tumorerkrankungen scheint das Pankreaskarzinom familiär gehäuft aufzutreten, sodass Verwandte ersten Grades von Patienten mit Pankreaskarzinom ein im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung 9-fach erhöhtes Risiko haben (Klein, Brune et al. 2004). Es haben jedoch nur 5-10 % der Patienten mit Pankreaskarzinom eine familiäre Disposition. Die meisten Studien definieren diese durch Angehörige ersten Grades mit Pankreaskarzinom. Oft bleiben bei familiärer Belastung die zugrundeliegenden Mechanismen unbekannt; einige dieser Patienten besitzen Keimzellmutationen in den Genen BRCA2, p16/CDKN2A, PRSS1, STK11/LKB1 (Koorstra, Hustinx et al. 2008). In 5-17 % der familiären Pankreaskarzinome können Keimbahnmutationen im BRCA2-Gen nachgewiesen werden, die damit den wichtigsten genetisch prädisponierenden Faktor darstellen (Murphy, Brune et al. 2002, Hahn, Greenhalf et al. 2003, Couch, Johnson et al. 2007). Der Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum, Diabetes mellitus und chronischer Pankreatitis wird kontrovers diskutiert. Starker Alkoholkonsum scheint zu einer Risikoerhöhung für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu führen (Hassan, Bondy et al. 2007). Des Weiteren scheint ein langjähriger Diabetes mellitus das Risiko zu steigern (Everhart and Wright 1995), eine chronische Pankreatitis stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar (Duell, Lucenteforte et al.

2012). In adulten Mäusen führt die endogene Expression des K-Ras-Onkogens allein nicht zur Entwicklung von pankreatischen Neoplasien. Nach Induktion einer milden chronischen Pankreatitis allerdings entwickelten diese Mäuse PanINs und Pankreaskarzinome (Guerra, Schuhmacher et al. 2007). Ein erhöhter Body-Mass-Index soll ebenfalls das Risiko erhöhen, das relative Risiko für Personen mit einem BMI zwischen 30 und 35 beispielsweise ist auf 1,19 erhöht (Jiao, Berrington de Gonzalez et al. 2010).

1.2 Klinik und Therapie

Häufig präsentiert sich das Pankreaskarzinom klinisch mit nur sehr unspezifischen oder gar fehlenden Symptomen und wird daher häufig erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Cubilla and Fitzgerald 1978). Da circa 60-70 % der Karzinome im Pankreaskopf lokalisiert sind, kann es ab einer gewissen Tumorgöße neben der Kompression des Pankreasausführungsgangs zur Stenose des Ductus choledochus kommen. Dies führt zu dem bekannten Leitsymptom des Pankreaskarzinoms, dem schmerzlosen Ikterus (DiMagno 1999). Das am häufigsten beobachtete Symptom im fortgeschrittenen Stadium ist jedoch der Bauchschmerz durch eine Tumorinvasion in peripankreatische Nervenplexus wie den Plexus coeliacus und den Plexus mesentericus superior. Meist sind die Schmerzen im Oberbauch lokalisiert und anfangs präsentieren sie sich häufig diffus. Bei circa einem Viertel der Patienten kommt es im Verlauf zu in den Rücken ausstrahlende Schmerzen, welche durch eine Infiltration in die oben genannten Plexus und die Affektion des Nervus splanchnicus verursacht werden können (DiMagno 1999). Ein weiteres Symptom ist der Gewichtsverlust, der durch die Tumorkachexie und Maldigestion verursacht wird (Vincent, Herman et al. 2011). Eine Obstruktion des Ductus pancreaticus kann zu Pankreatitiden führen, außerdem können venöse Thrombosen als paraneoplastische Phänomene beobachtet werden. Circa 25 % der Patienten haben einen manifesten Diabetes mellitus bei Diagnosestellung, 40 % zumindest eine verminderte Glucosestoleranz (Vincent, Herman et al. 2011).

Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom bietet ein Mehrschicht-CT eine gute Darstellung des Organs sowie der umliegenden Gefäßstrukturen und gibt gleichzeitig Aufschluss über potentielle Lebermetastasen. Die meisten Karzinome zeigen sich als hypodense Strukturen, Pankreaskopfkarzinome sind häufig begleitet vom sogenannten "Double-Duct-Sign", eine gleichzeitige Dilatation des Ductus pancreaticus sowie des Ductus choledochus (Kleeff, Korc et al. 2016). Eine endoskopische, ultraschallgesteuerte Feinnadelbiopsie sichert die Diagnose, gleichzeitig bietet der endoskopische Ultraschall eine weitere gute Bildgebungsoption (Kleeff, Korc et al. 2016).

Die chirurgische Resektion ist die einzige potentiell kurative Therapie. Circa 15-20 % der Tumore sind bei Diagnosestellung noch resektabel. Dabei ist die Whipple'sche Operation der Standardeingriff bei Pankreaskopfkarcinomen (De La Cruz, Young et al. 2014). Als adjuvante Chemotherapie nach Resektion wird die Kombination von Gemcitabin und Capecitabine empfohlen (Neoptolemos, Palmer et al. 2017). Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Tumorleiden oder Metastasen steht die palliative Chemotherapie als therapeutische Option im Vordergrund. Ein Überlebensvorteil bei gleichzeitig geringerer Toxizität wurde unter FOLFIRINOX (Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin) im Vergleich zu Gemcitabin mono beschrieben (Conroy et al. 2011). Weitere palliative Optionen wie die Einlage eines biliären oder enteralen Stents zur Steigerung der Lebensqualität sind möglich (De La Cruz, Young et al. 2014).

1.3 Tumorpathogenese und Pathologie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt mit 92 % mit Abstand die häufigste Tumorentität des exokrinen Pankreas dar (Böcker, Denk). Andere Tumore, wie die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie, das seröse Zystadenom oder das Azinuszellkarzinom sind absolute Raritäten (DiMagno 1999). In der folgenden Arbeit ist vereinfacht vom Pankreaskarzinom die Rede, womit stets das duktales Adenokarzinom gemeint ist.

Von welchem Gewebetyp das Pankreaskarzinom genau abstammt wird kontrovers diskutiert. Die am weitesten verbreitete Hypothese über die Pathogenese des Pankreaskarzinoms ist die Entwicklung aus duktales Epithelzellen sowie deren Transformation über Vorläuferläsionen. Dazu zählen vor allem die PanIN-Läsionen. Über eine Akkumulation genetischer Alterationen können diese in ein duktales Adenokarzinom übergehen (Distler, Aust et al. 2014). Eine andere Theorie zieht die Entstehung aus azinären Zellen in Erwägung, die über eine azinär-duktales Metaplasie sogenannte atypische flache Läsionen als Vorläuferläsion ausbilden können (Esposito, Konukiewitz et al. 2012).

Die häufigste Entwicklung des Pankreaskarzinoms über PanIN-Läsionen zeichnet sich durch frühe aktivierende Mutation im KRAS-Gen aus, die bereits in über 90 % der low grade PanIN-Läsionen gefunden wird (Kanda, Matthaei et al. 2012). In 50 bis 80 % der Pankreaskarzinome finden sich inaktivierende Mutationen von TP53, CDKN2A und SMAD4 (Kleeff, Korc et al. 2016). Histologisch zeigt das Pankreaskarzinom meist eine atypische Drüsenstruktur. Die mehrschichtigen, gangartigen Strukturen aus polymorphzelligen, kubischen Tumorzellen sind meist noch recht gut differenziert und produzieren Schleim. Auch anaplastische Karzinome mit ungeordnet liegenden Zellen kommen vor (Böcker, Denk).

Sehr charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist die ausgeprägte desmoplastische Reaktion, die großteils durch aktivierte pankreatische Sternzellen verursacht wird (Apte, Park et al. 2004). Eine Besonderheit des Pankreaskarzinoms sind die typischen Nervenveränderungen, die in der Gesamtheit als die „pankreatische Neuropathie“ („pancreatic neuropathy“) bezeichnet werden. Charakteristisch ist dabei die gezielte Infiltration von Nerven durch Tumorzellen, die neurale Invasion. Es kommt außerdem zu einer erhöhten neuronalen Dichte sowie zu einer neuralen Hypertrophie. Die Nerven im Pankreaskarzinom zeigen zusätzlich häufig entzündliche Veränderungen, pankreatische Neuritis, die sogar stärker ausgeprägt sind als in der chronischen Pankreatitis (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

2. Neurale Invasion im Pankreaskarzinom

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts wurde das Phänomen der neuralen Invasion erstmals beschrieben (Cruveilhier J. 1835). Um 1930 tauchte erstmals der Begriff des Neurotropismus auf (Jentzer 1930). Damit beschrieb Jentzer den Vorgang der neuralen Invasion nicht als bloßen Befall der Nerven durch Tumorzellen, sondern als einen Ausbreitungsweg für Karzinomzellen jenseits ihres Primärlokus. Ein Meilenstein im Verständnis der neuralen Invasion waren elektronenmikroskopische Untersuchungen von Bockmann et al. Sie zeigten, dass der Befall von Tumorzellen nicht auf den perineuralen Raum beschränkt bleibt. Die Tumorzellen dringen tiefer in den Nerv ein und kommen dabei mit endoneuralen Strukturen wie zum Beispiel den Schwannschen Zellen in Kontakt. Das Perineurium wird dabei zerstört, und die Axone zeigen daraufhin eine ödematös geschwollene Morphologie (Bockman, Buchler et al. 1994).

Zum Verständnis der neuralen Invasion bedarf es der Kenntnis der aus drei Schichten bestehenden neuralen Hüllstrukturen. Von außen nach innen sind diese das Epineurium, das Perineurium und das Endoneurium (Liebig, Ayala et al. 2009). Das Epineurium umhüllt den gesamten Nerv. Es ist aus einer äußeren, lockeren Bindegewebsschicht und einer inneren, kompakten kollagen- und elastinhaltigen Schicht aufgebaut. Die äußere Schicht enthält die den Nerv versorgenden "Vasa nervorum" sowie Lymphgefäße. Entgegen früherer Annahmen penetrieren die lymphatischen Gefäße das Epineurium nicht. Das Perineurium unterteilt den Nerv in seine Faszikel. Konzentrisch angeordnete Zellschichten, jeweils umgeben von einer Basallamina, bilden dabei die äußere Schicht der Blut-Nerven-Schranke. Das Endoneurium als bindegewebige Hüllstruktur umgibt die einzelnen Nervenfasern mit ihren zugehörigen Schwann-Zellen (Liebig, Ayala et al. 2009).

Ein Befall neuraler Strukturen durch Tumorzellen findet sich nicht nur im Pankreaskarzinom, sondern auch im Prostatakarzinom, im Magenkarzinom, im Ösophaguskarzinom, im

Rektumkarzinom sowie in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. Das besonders hohe Interesse an der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom rührt von der außerordentlich hohen Prävalenz, die studienabhängig mit bis zu 100 % angegeben wird (Liu and Lu 2002, Liebl, Demir et al. 2014). Auch andere maligne Tumore des Pankreas weisen neurale Invasion auf, wie beispielsweise 50 % der neuroendokrinen Tumore, 35 % der IPMNs und 35 % der Ampullenkarzinome. Interessanterweise ist nicht nur die Prävalenz der neuralen Invasion in diesen Tumoren deutlich geringer, sondern auch der Ausprägungsgrad deutlich schwächer. Während in 42 % der Adenokarzinome eine endoneurale Invasion stattfindet, zeigt sich diese in nur 6,5 % der neuroendokrinen Tumore. Adenokarzinomzellen des Pankreas zeigen damit ein aggressiveres und neuro-invasiveres Verhalten als Tumorzellen anderer Entitäten, letztere bleiben eher auf das Epineurium begrenzt (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die Relevanz der Tumorzellausbreitung über den Weg der neuralen Invasion zeigen auch Untersuchungen von Modellen primär induzierter Pankreaskarzinome. In syrischen Hamstern war der häufigste Ausbreitungsweg die perineurale Invasion (in 88 %), gefolgt von lymphatischer (31 %) und hämatogener (2 %) Metastasierung (Pour, Egami et al. 1991). Die neurale Invasion speziell im Pankreaskarzinom besitzt eine große klinische Relevanz. Sie ist assoziiert mit verstärktem Schmerzempfinden. Patienten mit endoneuraler Invasion zeigen mehr Schmerzen im Vergleich zu Patienten mit nur perineuraler Invasion (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Gleichzeitig korreliert das Schmerzempfinden mit dem Überleben, wobei Patienten mit starken Schmerzen ein kürzeres Überleben aufweisen als Patienten ohne oder mit nur moderaten Schmerzen (Okusaka, Okada et al. 2001). Auch wird die Ausbreitung über die neurale Invasion in extrapancreatische Nervenplexus als ein Grund für die hohe Lokalrezidivrate nach vermeintlich kurativer Resektion angesehen (Pour, Bell et al. 2003). In einer pathomorphologischen Studie zeigten 79 % der Patienten mit einem Pankreaskopfkarzinom eine Nervenplexusinvasion (Makino et al., 2008). Studien haben einen möglichen Vorteil einer erweiterten Resektion mit Resektion des Plexus coeliacus und des Plexus der Arteria mesenterica superior untersucht. Die Studienlage zeigt hier inkonstante Ergebnisse, manche Autoren beschreiben keinen Benefit (Nakao, Kaneko et al. 2001), manche beschreiben dagegen ein verlängertes Überleben (Nagakawa, Nagamori et al. 1996). Die hohe klinische Relevanz der neuralen Invasion führte in den letzten Jahren zu einem ansteigenden wissenschaftlichem Interesse an der Erforschung ihres Pathomechanismus. Es bestehen verschiedene Erklärungsansätze, der genaue Pathomechanismus bleibt jedoch weiterhin unklar. Eine Hypothese ist die Ausbreitung der Tumorzellen entlang des Perineuralspalts als dem Weg des geringsten Widerstandes. Auch die Theorie der Infiltration

der Karzinomzellen über Lymph- und Blutgefäße durch das Perineurium wurde diskutiert (Kayahara, Nakagawara et al. 2007). Die bereits erwähnte fehlende epineurale Penetranz der Lymphgefäße lässt Zweifel an dieser Theorie aufkommen, sodass die neurale Invasion nicht nur als "erweiterte lymphatische Ausbreitung" betrachtet werden kann. Die Tatsache, dass Tumorzellen bis in das Innere der Nerven infiltrieren und dabei die multiplen Bindegewebsschichten überwinden, stellt auch den Weg des geringsten Widerstandes als alleinigen Erklärungsansatz in Frage (Liebig, Ayala et al. 2009). Von großem Interesse ist daher die Erforschung der spezifischen Interaktion zwischen Tumorzellen und nervalen Strukturen. Ein interessantes in-vitro Modell von Dai et al. untersuchte in einer Co-Kultur die Interaktion von Pankreaskarzinomzellen und DRGs. Es zeigte sich eine gegenseitige Stimulation der Zellen, die ein verstärktes Neuritenwachstum der DRGs, einen erhöhten Proliferationsindex der Tumorzellen, eine erhöhte Expression von pro-survival Genen sowie eine verstärkte Formierung von Tumorzellkolonien beinhaltete (Dai, Li et al. 2007). Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes mit der Besonderheit der anfänglich strikten, räumlichen Trennung von Tumorzellen und Nervenzellen von Ceyhan et al. schloss neben DRGs myenterische Plexusneurone mit ein (Ceyhan, Demir et al. 2008). Der Einschluss der myenterischen Nervenzellen gewährte eine realistischere Nachahmung der pankreatischen Innervation in vivo, die neben dem extrinsischen System mit seinen Nervenfasern des Nervus Vagus und des Nervus Splanchnicus intrinsische enterale Neurone beinhaltet (Kirchgessner and Gershon 1990, Kirchgessner, Adlersberg et al. 1992). Interessanterweise kam es schon vor Einsetzen der Zellmigrationsbewegung zu einer Morphologieänderung der Tumorzellen mit Bildung spitzer Zellausläufer in Richtung der Neurone, sodass von einer Aktivierung der Zellen über Botenstoffe auszugehen ist (Ceyhan, Demir et al. 2008).

In einer Untersuchung mit Prostatakarzinomzellen konnte durch Zusatz von Stromazellen zu einer Tumorzell-Neuronen-Co-Kultur die gegenseitige Stimulierung sogar noch verstärkt werden (Cornell, Rowley et al. 2003). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Interaktion von Tumor- und Nervenzellen durch gezielte parakrine oder autokrine Signalmechanismen von Tumor-, Nerven- und vermutlich Stromazellen vermittelt wird.

Es stellt sich die Frage, warum die Prävalenz der neuralen Invasion gerade im Pankreaskarzinom so hoch ist. Ein Erklärungsansatz ist die anatomische Lage des Pankreas. In der Tat enthält das Pankreas mit seiner retroperitonealen Lage und seiner Innervation durch das vegetative Nervensystem zahlreiche Nervenfasern (Marchesi, Piemonti et al. 2010). Autonome Nervenplexus wie der Plexus coeliacus, der Plexus mesentericus superior, der Plexus hepaticus und der Plexus splenicus befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft.

Welcher Plexus dabei befallen wird, ist abhängig von der Lage des Primärtumors und folgt interessanterweise embryonal angelegten Wegen. Während sich Tumore im ventralen Pankreas eher in das Nervengeflecht um die Arteria mesenterica superior ausbreiten, streuen Tumore im dorsalen Pankreas eher in den Plexus hepaticus und den Plexus des hepatoduodenalen Ligaments (Makino, Kitagawa et al. 2008). Zusätzlich bietet sich durch die für das Pankreaskarzinom typische Zunahme der neuronalen Gesamtfläche und der neuronalen Dichte eine vergleichsweise große Angriffsfläche für Tumorzellen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

Doch ist die anatomische Lage eine ausreichende Erklärung für die neurale Invasion im Pankreas? Dieser Zweifel und die oben beschriebenen Beobachtungen über die Interaktion der Zelltypen führte zur intensiveren Erforschung molekularer Vermittler und der Chemoattraktion zwischen Pankreaskarzinomzellen und neuralen Strukturen.

In der bereits erwähnten Co-Kultur von DRGs und Pankreaskarzinomzellen zeigte sich mit der Zeit ein Anstieg der Expression des "neurotrophic growth factor" (NGF) in den Tumorzellen (Ceyhan, Demir et al. 2008). Diese Beobachtung bestätigte die wichtige Rolle von NGF für die neurale Invasion im Pankreaskarzinom. Eine Hochregulation von NGF in Pankreaskarzinomzellen sowie seinem Rezeptor TrkA in intrapankreatischen Nerven und dem Perineurium wird im Pankreaskarzinom beobachtet, diese korreliert mit einer häufigeren neuralen Invasion und einem höheren Schmerzempfinden (Zhu, Friess et al. 1999). Auch GDNF als neurotropher Faktor konnte in vitro eine polarisierte, neurotrophe Migration von Pankreaskarzinomzellen auslösen. Die nervale Expression von GDNF scheint eine bedeutende Rolle zu spielen, Nerven von GDNF defizienten Mäusen werden weniger stark von Tumorzellen befallen. Auch seine Rezeptoren RET, ein Tyrosinkinase-Rezeptor, und GFRalpha1 waren in Geweben mit neuraler Invasion verstärkt exprimiert. Eine systemische Therapie mit einem RET Inhibitor unterdrückte den Befall des Nervus Ischiadicus nach Injektion von neuroinfiltrativen Pankreaskarzinomzellen (Gil, Cavel et al. 2010). Auch Artemin, ein weiteres Mitglied der GDNF-Familie, war im Pankreaskarzinom hochreguliert und vor allem in hypertrophen Nerven detektierbar. Eine in vitro Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit Artemin steigerte ihr invasives Verhalten (Ceyhan, Giese et al. 2006). Das von Neuronen und Nervenfasern exprimierte Chemokin Fraktalkin (CX3CL1) scheint in der Vermittlung der neuralen Invasion ebenfalls eine Rolle zu spielen. Die Expression des von Pankreaskarzinomzellen exprimierten Fraktalkinrezeptors (CX3CR1) zeigt sich besonders stark in Läsionen mit perineuraler Invasion und ist verbunden mit einer

früheren Lokalrezidivrate. Mit CX3CR1 transfizierten Pankreaskarzinomzellen zeigen nach in vivo Implantation eine starke neurale Invasion (Marchesi, Piemonti et al. 2008).

Eine neue Herangehensweise in der Erforschung der molekularen Mechanismen der neuralen Invasion war der Vergleich der Expression verschiedener Moleküle mittels einer cDNA Microarray-Analyse in neuroinvasiven versus weniger neuroinvasiven Pankreaskarzinomzellen. Es zeigte sich eine signifikante Herabregulierung von KIF14 sowie eine signifikante Expressionssteigerung von ARHGDIbeta (Rho GDP dissociation inhibitor beta). Ein Knockdown von KIF14 mittels siRNA führte in vitro zu verstärkter Invasivität der Pankreaskarzinomzellen (Abiatari, DeOliveira et al. 2009).

Bislang wurde vor allem dem Mechanismus nachgegangen, wie Karzinomzellen von neuralen Strukturen angelockt werden. Ein neuer und sehr interessanter Ansatz von Demir et al. ging erstmals der Möglichkeit nach, dass es initial zu einer Reaktion der Nerven sowie ihrer zugehörigen Strukturen kommen könnte, noch bevor überhaupt ein Kontakt mit Tumorzellen stattgefunden hat. Dabei wurde das Augenmerk auf die im peripheren Nerv predominantesten Schwannschen Zellen gerichtet und ein neuer 3D-Schwann-Zell-Assay etabliert. Schwannsche Zellen aus einem Stück eines murinen Nervus Ischiadicus migrierten dabei zielgerichtet zu räumlich getrennten Pankreaskarzinomzellen. Diese Migration konnte auch zu Karzinomzellen anderer gastrointestinaler Tumorentitäten beobachtet werden, allerdings in weit weniger ausgeprägtem Maße. Zu benignen Zellen wie Fibroblasten fand dagegen keine zielgerichtete Migration statt. In der gleichen Studie wurde in PanIN-Läsionen und in Karzinomzellverbänden das Vorkommen von verstreut liegenden Schwannschen Zellen detektiert, die keinen Kontakt zu neuralen Strukturen hatten (Demir, Boldis et al. 2014). Diese Daten regen dazu an, den Mechanismus der neuralen Invasion unter einem neuen Aspekt zu betrachten und die Nervenzellen mit besonderer Beachtung der Schwann-Zellen als aktiven Part im Vorgang der neuralen Invasion rezuevaluieren.

Zuvor hatten schon Swanson et al. eine potentielle Rolle der Schwannschen Zellen im Rahmen der neuralen Invasion in Betracht gezogen. Die Tumorzellen kommen bei einer endoneuralen Invasion zwangsläufig mit endoneuralen Strukturen sowie den die peripheren Neuronen einhüllenden Gliazellen in Kontakt. In der Studie von Swanson et al. wurde eine Anheftung von Pankreaskarzinomzellen an Schwann-Zellen untersucht und dabei vermittelnde Adhäsionsmoleküle identifiziert (Swanson, McDermott et al. 2007). MUC1 ist ein in Adenokarzinomen häufig verändert exprimiertes und verstärkt glykosiliertes transmembranöses Muzin (Hanisch, Stadie et al. 1996), das auch im Pankreaskarzinom hochreguliert wird (Burdick, Harris et al. 1997). Das "Myelin associated glycoprotein" (MAG)

wird von Schwannschen Zellen exprimiert (Trapp, Andrews et al. 1989) und vermittelt die Myelinbindung an Axone (Schachner and Bartsch 2000).

Beide Moleküle konnten immunhistochemisch in Abschnitten des Pankreaskarzinoms mit neuraler Invasion nachgewiesen werden. Die direkte Adhäsion zwischen Tumorzellen und Schwann-Zellen über diese Moleküle wurde untersucht. Hierbei führte eine Überexpression von MUC1 in Tumorzellen zu verstärkter Adhäsion, während eine antikörpervermittelte Blockade von MAG auf Schwannschen Zellen zu einer Abnahme der Adhäsion führte. Interessanterweise führte die Blockade von MAG nicht zu einem vollständigen Verlust der Adhäsion (Swanson, McDermott et al. 2007). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass MAG nicht als einziges Molekül die Adhäsion von Pankreaskarzinomzellen an Schwannsche Zellen vermittelt, sodass es Weitere zu identifizieren gilt.

3. Schwannsche Zellen und ihre Adhäsionsmoleküle

Im adulten Nervensystem lässt sich die Gruppe der Schwannschen Zellen in vier Subgruppen unterteilen: die myelinisierenden Schwann-Zellen, die nicht myelinisierenden Schwann-Zellen, die perisynaptischen Schwann-Zellen und die Satellitenzellen als Gliazellen der peripheren Ganglien. Alle diese Zellen haben ihre Abstammung von Zellen der Neuralleiste. Myelinisierende Schwannsche Zellen umhüllen jeweils eine Nervenfasern und bilden dabei die für die schnelle, saltatorische Erregung notwendige Myelinscheide. Sie umgeben vor allem motorische und einige sensorische Nervenfasern. Postganglionäre sympathische Fasern, C-Fasern und die meisten sensorischen Fasern werden von Zellausläufern nicht myelinisierender Schwann-Zellen umhüllt. Dabei umhüllt eine Zelle mehrere Nervenfasern und separiert diese voneinander. Die unterschiedlichen Typen der Schwannschen Zellen unterscheiden sich in ihrer Funktion, ihrer Morphologie und ihrer biochemischen Zusammensetzung. Die am besten charakterisierten myelinisierenden Zellen exprimieren Myelin-spezifische Proteine wie das "Myelin basic protein" (MBP), das "Peripheral myelin protein" (PMP22), das "Myelin protein zero" (P0), das "Myelin associated glycoprotein" (MAG) und das "Myelin and lymphocyte protein" (MAL) (Corfas, Velardez et al. 2004). Nicht myelinisierende Schwann-Zellen besitzen keine spezifischen Markerproteine, zeichnen sich aber durch den hohen Gehalt an "Glial fibrillary acidic protein" (GFAP) aus und exprimieren NCAM und L1CAM (Martini and Schachner 1986, Jessen, Morgan et al. 1990). Die Funktion der Schwannschen Zellen im peripheren Nervensystem ist vielfältig. Neben dem Erhalt der Myelinscheide spielen sie eine wichtige Rolle bei der Nervenregeneration. Nach Nervenschäden entdifferenzieren sich die Zellen, proliferieren und produzieren Nervenwachstumsfaktoren wie NGF (Nerve growth factor) und GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor).

Diese Faktoren stimulieren und leiten das axonale Wachstum und fördern die Remyelinisierung (Scholz and Woolf 2007). Studien deuten auf eine Aktivierung Schwannscher Zellen im Pankreaskarzinom hin. SOX10 ist ein von reifen Schwann-Zellen exprimierter Transkriptionsfaktor. Immunhistochemische Analysen zeigten eine verminderte Immunoreaktivität von SOX10 in Nerven im Pankreaskarzinom verglichen mit Nerven in normalem Pankreas. Eine Tendenz der verminderten Immunoreaktivität in Nerven mit endoneuraler Invasion wurde beobachtet (Ceyhan, Demir et al. 2009). Gleichzeitig zeigen Nerven im Pankreaskarzinom eine stärkere GAP-43-Färbung, welches von Vorläufer- und nichtmyelinisierenden Schwann-Zellen exprimiert wird (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Diese Ergebnisse sprechen für eine Aktivierung und Entdifferenzierung von Schwannschen Zellen im Pankreaskarzinom. Eine Schädigung durch die Infiltration durch Tumorzellen könnte dazu beitragen. Als möglicher Pathomechanismus der neuralen Invasion sollte die Adhäsion der Pankreaskarzinomzellen an die Schwannschen Zellen näher charakterisiert und dabei vermittelnde Adhäsionsmoleküle identifiziert werden. Zelladhäsionsmoleküle können in vier Subgruppen eingeteilt werden: Integrine, Cadherine, Proteoglycane und die der Immunglobulin-Familie. Während Integrine Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktionen eingehen können, sind Cadherin-Verbindungen meistens homophiler Natur (Vleminckx and Kemler 1999).

3.1 Cadherine und N-Cadherin

Cadherine sind Calcium-abhängige Transmembranproteine, die interzelluläre Adhäsion und juxtakrine Zellinteraktion vermitteln. Sie tragen wesentlich zur Zellaggregation, Motilität und Differenzierung während der embryonalen Entwicklung und zum Erhalt adulter Gewebe bei (Edelman 1986). Zu den klassischen Cadherinen wird E-Cadherin (epithelial cadherin), N-Cadherin (neural cadherin), R-Cadherin (retinal cadherin) und VE-Cadherin (vascular-endothelial cadherin) gezählt.

Klassische Cadherine bestehen aus einem zytosolischen, einem transmembranen und einem extrazellulären Teil, welcher bei allen klassischen Cadherinen aus fünf extrazellulären, repetitiven Cadherin-Domänen (EC-Domänen) aufgebaut ist. Sie bilden Dimer-Komplexe, über die sie hauptsächlich homophile Verbindungen eingehen (Gumbiner 2005). Obwohl spezifische homophile Verbindungen die Regel sind, wurden Ausnahmefälle von heterophilen Verbindungen wie beispielsweise die Bindung zwischen E-Cadherin und $\alpha\text{E}\beta 7$ -Integrin beschrieben (Higgins, Mandlebrot et al. 1998).

Der zytosolische Part der Cadherine bindet β -Catenin und Plakoglobin, an die wiederum α -Catenin bindet. Dieses ist mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Vleminckx and Kemler

1999). Ein weiteres Cadherin bindendes Catenin, das p120-Catenin wird unter anderem für die Stabilisierung der Adhäsion durch Clustering verantwortlich gemacht (Anastasiadis and Reynolds 2000).

N-Cadherin Bindung führt zur Akkumulation phosphorylierter Proteine, einer Rekrutierung und Umverteilung von Aktinfilamenten und einem lokalen Membranumbau. Es wird daher von einer Umstrukturierung des Zytoskeletts sowie einer zytoplasmatischen Signalproteinrekrutierung über den Cadherin-Catenin-Komplex ausgegangen (Lambert, Padilla et al. 2000).

N-Cadherin spielt in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle. Erstmals detektiert wird es in Zellen des Primitivstreifens, die im Zuge der Gastrulation eine epithelial-mesenchymale Transition durchlaufen, um das Mesoderm zu bilden.

N-Cadherin ist vor allem wichtig in der Entwicklung des Nervensystems, der Herzentwicklung, der Entwicklung des Gefäßsystems und der Osteogenese (Mariotti, Perotti et al. 2007). Im adulten Organismus wird N-Cadherin vor allem im Nervensystem exprimiert, dabei im Speziellen in Synapsen, in axonalen Wachstumskegeln, aber auch in anderen Teilen von Neuronen (Gumbiner 2005).

Eine Transfektion von epithelialen Zellen mit N-Cadherin führt zu einer Morphologie- und Verhaltensänderung der Zellen durch Induktion eines motileren Phänotyps und weniger Adhäsion der Zellen (Islam, Carey et al. 1996).

Der "Cadherin-Switch" mit Abnahme der Expression von E-Cadherin und Zunahme der Expression von N-Cadherin spielt eine wichtige Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition. Dieser Switch wird von Karzinomzellen häufig zur Erlangung eines invasiveren und metastasierenden Phänotyps genutzt und korreliert mit der Tumorprogression (Cavallaro, Schaffhauser et al. 2002, Wheelock, Shintani et al. 2008). Neben der Migrationsförderung hat N-Cadherin einen positiven Effekt auf das Überleben von Zellen. In Melanomzellen führte eine homophile Bindung über N-Cadherin zur Aktivierung antiapoptotischer Signale (Li, Satyamoorthy et al. 2001). In der Frage danach, wie N-Cadherin Zellwachstum- und Motilität fördert, wird eine Interaktion mit Tyrosinkinase vermutet (Wheelock, Shintani et al. 2008). Zum Beispiel stabilisiert N-Cadherin durch Assoziation mit dem FGFR-1 diesen durch Reduktion der Rezeptorinternalisierung. Durch die dadurch verstärkte Aktivierung des MAPK-ERK-Signalwegs kommt es zur verstärkten MMP-9-Expression und zu invasiverem Zellwachstum (Suyama, Shapiro et al. 2002).

43 % der primären Pankreaskarzinome zeigen eine Expression von N-Cadherin. Interessanterweise korreliert die N-Cadherin-Expression mit dem Ausmaß des

intrapankreatischen Nervenbefalls. Tumoren mit neuraler Invasion zeigten eine stärkere Immunreaktivität für N-Cadherin und auch undifferenzierte Tumoren zeigten im Vergleich zu gut differenzierten eine stärkere N-Cadherin-Expression (Nakajima, Doi et al. 2004). Interessanterweise exprimieren Pankreaskarzinomzellen in 53 % der Lebermetastasen N-Cadherin. Assoziiert damit findet man in diesen eine höhere Vimentin-Expression, einen mesenchymalen Marker, als im Primärtumor. Die N-Cadherin-Hochregulierung trägt also auch im Pankreaskarzinom zur Tumorprogression bei (Nakajima, Doi et al. 2004).

Voraussetzung für unser Projekt war das Vorhandensein von N-Cadherin auf Schwannschen Zellen. In Co-Kulturen von DRGs und Schwann-Zellen von Ratten wurde N-Cadherin an der Kontaktstelle benachbarter Gliazellen sowie zwischen Gliazellen und Axonen detektiert. Diese Lokalisation spricht für einen vermittelnden Effekt in der Interaktion zwischen Schwann-Zellen sowie deren Bindung an Axone (Wanner and Wood 2002). Untersuchungen über das postnatale Verteilungsmuster von N-Cadherin zeigten eine mit dem Alter abnehmende Expression im Nervus Ischiadicus von Ratten. Nichtmyelinisierende Schwann-Zellen färbten sich weiterhin mit N-Cadherin an, und auch hier beschränkte sich die Färbung auf Gliazellkontakte und Glia-Axon-Kontakte. Mit DRGs co-kultivierte Schwann-Zellen exprimierten N-Cadherin, reduzierten die Expression jedoch bei Einsetzen des Myelinisierungsvorgangs (Corell, Wicher et al. 2010).

3.2 Peripheral Myelin Protein 22 (PMP22)

PMP22 ist ein 22 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein, welches vor allem von myelinisierenden Schwannschen Zellen exprimiert wird. PMP22 stellt 2-5 % aller Proteine der Myelinscheide peripherer Nerven und findet sich vor allem im Bereich der Internodien. Bekannt ist es durch die Mutationen im PMP22-Gen, die für hereditäre motorisch-sensible Neuropathien (Charcot-Marie-Tooth-Krankheit) verantwortlich sind. PMP22 besitzt vier transmembranäre Domänen, einen intrazellulären C-Terminus, einen intrazellulären, glykosilierten N-Terminus und zwei extrazelluläre Proteinloops, denen die Vermittlung einer homophilen Interaktion mit PMP22 sowie einer heterophilen Interaktion mit P0 zugeschrieben werden.

Das Gen auf Chromosom 17 wird während der Embryonalentwicklung diffus exprimiert. Im adulten Organismus bleibt es in manchen nicht neuronalen Gewebetypen nachweisbar, exprimiert wird es aber vor allem in den Myelinscheiden peripherer Nerven und in geringerem Maße im zentralen Nervensystem (Parmantier, Cabon et al. 1995, Roux, Amici et al. 2004, Ohsawa, Murakami et al. 2006). Wie auch bei anderen myelinassoziierten Molekülen führt der Kontakt zwischen Schwannschen Zellen und Axonen zu einer

gesteigerten Expression von PMP22 und einer vermehrten Translokation des Proteins in deren Membran (Pareek, Notterpek et al. 1997). Als ein Membranprotein durchläuft das Vorläuferprotein mit 18 kDa das endoplasmatischen Retikulum und den Golgi-Apparat zur posttranslationalen Modifikation und Glykosylierung. Interessanterweise kann man dabei einen hohen Umsatz des Proteins beobachten, ein Großteil des hergestellten Proteins (in Schwann-Zellen von Ratten bis 70 %) wird degradiert, sodass nur ein kleiner Teil die Membran erreicht (Li, Parker et al. 2013). Die genauen Funktionen des Proteins sind noch nicht ausreichend erforscht.

Der Zusammenhang von Mutationen des PMP22-Gens mit demyelinisierenden Neuropathien spricht für eine myelinscheiden-erhaltende Funktion (Naef and Suter 1998). Ein Effekt von PMP22 auf die Schwann-Zell-Proliferation wird vermutet, wobei inkonstante Ergebnisse vorliegen. Während die Überexpression *in vitro* zu verminderter Proliferation führt, kommt es bei Überexpression *in vivo* in transgenen Mäusen zur Zunahme der Proliferation (Li, Parker et al. 2013). Interessanterweise führen alle Mutationen im PMP22-Gen *in vitro* und *in vivo* zu erhöhter Apoptose der Schwannschen Zellen (Li, Parker et al. 2013). Die Auswirkungen der Expression von PMP22 in Schwannschen Zellen auf die Neurone wurden bislang nicht ausreichend untersucht. Eine Studie zeigte einen Untergang von Motoneuronen im Rückenmark bei Überexpression von PMP22 in Mäusen und spricht damit für einen proapoptotischen Effekt (Nattkamper, Halfter et al. 2009). Eine andere diskutierte Rolle von PMP22 ist die Beteiligung an Extrazellulärmatrix-Interaktionen. Die Aminosäuresequenz von PMP22 hat eine Übereinstimmung von 20 % mit der Sequenz von Claudin-1, sodass sogar eine Zugehörigkeit zur Proteinfamilie der Claudine in Erwägung gezogen wurde. PMP22 zeigt in epithelialen Zellen eine Co-Lokalisation mit Tight Junctions-bildenden Membranproteinen. Ob es dabei zu einer Interaktion kommt, ist noch unklar. Die Co-Lokalisation zu diesen Zellverbindungen suggeriert eine Funktion für interzelluläre Interaktionen wie der Wicklung der Schwann-Zellfortläufer bei der Myelinbildung (Roux, Amici et al. 2004).

Eine direkte Rolle in der Verbindung der Schwann-Zellen zur Extrazellulärmatrix konnte von Amici et al. gezeigt werden. Sie zeigten die Komplexbildung von PMP22 mit $\alpha 6\beta 4$ Integrin in der abaxonalen Membran von Schwannschen Zellen, über welchen eine Verbindung zu Laminin, einem Bestandteil der Basalmembran, vermittelt werden kann. PMP22-defiziente Mäuse zeigten eine verspätete Myelinisierung und eine aufgelockerte Verbindung der Schwann-Zellen zur Basallamina. $\alpha 6\beta 4$ Integrin wurde vermindert exprimiert, woraus man auf eine stabilisierende Wirkung von PMP22 auf dieses Molekül und damit auf die

Verbindung zur Basallamina schließen kann (Amici, Dunn et al. 2006). Wie die Auswirkungen der Extrazellulärmatrix-Interaktionen von PMP22 auf die Proliferation und die Differenzierung von Schwann-Zellen sind, bleibt noch zu erforschen (Li, Parker et al. 2013). Li et al. untersuchten erstmals die Expression von PMP22 im Normalpankreas, im Pankreaskarzinom und in der chronischen Pankreatitis. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression im Pankreaskarzinom. Während duktale und azinäre Strukturen im Normalpankreas keine PMP22-Färbung zeigten, färbten sich Karzinomkomplexe an. Interessanterweise zeigten PanIN Läsionen 1B und 2 eine deutliche Immunreaktivität für PMP22, in PanIN 3 Läsionen nahm diese wieder ab. Konkordant mit diesen Ergebnissen war die Expression von PMP22 auf mRNA-Ebene in einigen Pankreaskarzinomzelllinien nachweisbar, in Untersuchungen mittels Immunoblot war das Molekül jedoch nicht detektierbar. Unter Annahme der Hypothese der Apoptoseinduktion durch PMP22 (Zoidl, Blass-Kampmann et al. 1995) könnte die Abnahme der PMP22-Expression in der Progression der PanIN-Läsionen zum invasiven Verhalten der Tumorzellen beitragen (Li, Kleff et al. 2005).

II. Zentrale Fragestellung

Das Thema "neurale Invasion im Pankreaskarzinom" ist aufgrund seiner klinischen Relevanz in den letzten Jahren zunehmend in wissenschaftliches Interesse gerückt. Trotz allem ist der genaue Pathomechanismus noch weitgehend unverstanden.

Erstmals wurden Untersuchungen veröffentlicht, die eine potentielle Rolle der peripheren Gliazellen, den Schwannschen Zellen, für den Vorgang der neuralen Invasion in Erwägung ziehen (Demir, Boldis et al. 2014, Deborde, Omelchenko et al. 2016). Dieser Ansatz ist sehr interessant, denn im Rahmen der im Pankreaskarzinom häufig stattfindenden endoneuralen Invasion kommt es zum zwangsläufigen Kontakt zwischen Tumor- und Gliazellen, und durch Swanson et al. wurden erstmals vermittelnde Moleküle dieser Adhäsion identifiziert (Swanson, McDermott et al. 2007). Ein neuartiger Ansatz von Demir et al. betrachtet nicht mehr nur den geläufigen "Neurotropismus" der Tumorzellen als ursächlich für die neurale Invasion, sondern geht von einer initial aktiven Rolle der Schwannschen Zellen aus, noch bevor überhaupt ein Tumorzell-Nerv-Kontakt stattgefunden hat (Demir, Boldis et al. 2014).

In einem größeren Forschungsprojekt soll die Rolle der Schwannschen Zellen in der neuralen Invasion weiter evaluiert werden. Wir wollen Moleküle finden, die die Interaktion zwischen Pankreaskarzinomzellen und Gliazellen vermitteln. Die Interaktion soll im Rahmen der endoneuralen Infiltration der Tumorzellen betrachtet werden, in der es zu einem unmittelbaren Kontakt der Zellen kommt. Die Zellinteraktion soll aber auch unter dem neuen Aspekt der initial aktiven Rolle der Schwann-Zellen in der neuralen Invasion untersucht werden.

Unpublizierte Vordaten zeigen, dass die Adhäsionsmoleküle Beta-1-Integrin und L1CAM auf Pankreaskarzinomzellen die Schwann-Tumor-Zelladhäsion vermitteln. Beta-1-Integrin hat zusätzlich einen Effekt auf die tumorzellgerichtete Migration der Schwannschen Zellen. Eine Blockade von Beta-1-Integrin auf Tumorzellen vermindert diese und spricht für einen parakrinen Effekt des Moleküls. Sowohl Beta-1-Integrin als auch L1CAM waren auf Schwannschen Zellen exprimiert, sie spielten allerdings keine Rolle für die untersuchte Adhäsion.

Der Hauptfokus der vorgelegten Arbeit war die Untersuchung der Schwann-Zell-assozierten Adhäsionsmoleküle N-Cadherin und PMP22 als mögliche Bindungspartner für Tumorzellen auf Schwannschen Zellen. Zunächst wurde eine ausführliche Expressionsanalyse durchgeführt, anschließend immunhistochemisch der Einfluss der Moleküle auf die neurale

Invasion bestimmt und durch in vitro sowie ex vivo Experimente der Einfluss auf Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zellen untersucht.

Zur Expressionsanalyse und zu Untersuchungen über die Rolle von Beta-1-Integrin, NCAM, NrCAM und L1CAM wird hier auf die Dissertationen von Frau Dr. vet. med. Eva Brunner (geb. Kufner), und Frau Dr. vet. med. Natascha Klose aus der Tiermedizinischen Fakultät der LMU, 2013, verwiesen.

III. Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

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

1.2 Allgemeine Geräte

- Kühlplatte: Medite Medizintechnik (Burgdorf, GER)
- Magnetrührer: MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
- Mikroskop 1: Primo Vert, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikroskop 2: Observer Z1, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Mikroskop 3: Axioskop40, Zeiss (Oberkochen, GER)
- Nanodrop: Nanodrop 2000, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- Photometer: Multiskan EX, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- Pipet Boy, Integra (Fernwald, GER)
- Roll-Mixer: Stuart Roller-SRT9 (Shaffordshire, UK)
- Scanner: Nikon LS-5000 ED (Zürich, CH)
- Shaker: Shaker DRS-12, neolab (Heidelberg, GER)
- Thermomixer: Comfort 1,5 ml, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Vortexer: IKA Works, INC., MS 1 Minishaker (Wilmington, USA)
- Waage: Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
- Wasserbad: GFL (Burgwedel, GER)
- Zentrifuge: Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)

1.3 Allgemeine Reagenzien

- Ammoniumpersulfat, Sigma Life Scienc (St. Louis, USA)
- Chloroform, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

- EDTA: Ethylendiamin Tetraessigsäure, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Ethanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Glycin, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- HCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Isopropanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Methanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Nuclease-Free water: Ambion, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- Paraformaldehyd 8 %, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- TEMED, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tween 20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

1.4 Spezielle Materialien für Immunhistochemie und Immunzytofluoreszenz

Geräte

- Entwässerungsmaschine: Vakuum Gewebeinfiltrationsautomat, Leica ASP 200S (Nussloch, GER)
- Microtom: Leica JUNG RM2055, (Nussloch, GER)
- Mikrowelle: Sharp (Ōsaka, Japan)
- Paraffineinbettautomat: EG 1160, Leica (Nussloch, GER)

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- CSA-Kit, Dako (Hamburg, GER)
- DAB, Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako (Hamburg, GER)
- DAPI, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- Dako Pen: Dako Pen, Dako (Hamburg, GER)
- DAKO Envision system für Kaninchen und Maus, Dako (Hamburg, GER)
- Dako REAL Detection systems, Dako (Hamburg, GER)
- Eosin Y, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Normal Goat serum 10 % ready to use, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

- Triton X, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Vecta Mount Permanent mounting medium, H5000, Vector (Burlingame, USA)
- Wasserstoffperoxid 30 %, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Zusammensetzung Lösungen Immunhistochemie:
 - 10 x TBS: Tris 24,22 g; NaCl 87,66 g; ad 1 l H₂O
 - TBST: 100 ml 10 x TBS, 1 ml Tween 20, ad 1 l H₂O

Antikörper

Erstantikörper:

- Anti-PMP22: monoklonaler Anti-PMP22 aus der Maus, CF1, Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Für IHC: Verdünnung 1:1000 in TBST
- Anti-N-Cadherin: monoklonaler Antikörper aus der Maus, 3B9, Invitrogen (Californien,USA)
Für IHC: Verdünnung 1:5000 in TBST
- Anti-PGP 9.5: monoklonaler Antikörper aus der Maus, Dako (Hamburg, GER)
Für IHC: Verdünnung 1:1000 in TBST

Zweitantikörper:

- Für IHC: EnVision+System-HRP, anti-mouse, Dako (Hamburg, GER)
- Für Immunzytofluoreszenz: Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488, Goat-anti rabbit IgG Alexa Fluor® 568, Thermo Scientific (Dreieich, GER)

1.5 Spezielle Materialien für Protein-Untersuchungen

Geräte

- Entwicklermaschine: Optimax, Protec (Oberstenfeld, GER)
- Gewebeaufschluss: TissueLyser LT, Quiagen (Hilden GER)
- Netzgerät: Power Pack 25, Biometra (Göttingen, GER)
- Western Blot Laufkammer: Model: 45-2020-I, Rated: 0-600 V, 0-200 mA, class II, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Wet Blottingkammer, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- BCA Protein Assay: Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
- PVDF Transfer-Membran: Millipore (Massachusetts, USA)
- Röntgenfilm: Fuji Medical X-Ray Film (Düsseldorf, GER)

- SDS: SDS Ultrapure, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Fermentas (St. Leon-Rot, GER)
- Whatman Paper: Chromatografie Paper, Whatman (Kent, UK)

Zusammensetzung Puffer und Lösungen:

RIPA (200 ml)	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1mM Na ₂ EDTA 1 % NP-40 1 % sodium deoxycholate pH 7,5
6x LSB für 200 ml	35 ml Tris HCl, 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β-2-Mercapto pH 6,8
4x Upper Tris	1,5 M (=60,8 g) Tris 0,4 % (=4 g) SDS ad 1 l H ₂ O pH 6,8
4x Lower Tris	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4 % (= 4 g) SDS ad 1 l H ₂ O pH 8,8
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g, Glycin 144 g, SDS 10 g, ad 1 l H ₂ O
Anodenpuffer I	Tris 36,3 g Methanol 200 ml ad 1 l H ₂ O pH 10,4
Anodenpuffer II	Tris 3,03 g Methanol 200 ml

	ad 1 l H ₂ O pH 10,4
Kathodenpuffer	Tris 3,03 g ε-Amino-capronsäure 5,24 g Methanol 200 ml ad 1 l H ₂ O
10x PBS (Phosphate buffered saline)	Natriumchlorid 137 mM Kaliumchlorid 2,7 mM Dinatriumhydrogenphosphat 10,14 mM Kaliumhydrogenphosphat 1,8 mM
PBST	100 ml 10 x PBS 1 ml Tween 20
7,5% Milch (in PBS)	Milchpulver 7,5 % Tween 20 0,1 % ad 1 l H ₂ O
Wet Blotting Puffer	50 ml Stock Puffer Lsg. (Nupage 20 x transfer buffer) 18,5 µl 20 % SDS ad 1 l H ₂ O
4 % Sammelgel (20ml)	Bidest 12,4 ml 4 x UT 5 ml AA/BIS 2,7 ml TEMED 40 µl 10 % APS 60 µl
6 % SDS Polyacrylamidgel (40 ml)	Bidest 21,6 ml 4 x LT 10 ml AA/BIS 8 ml TEMED 40 µl 10 % APS 400 µl

Antikörper

Erstantikörper:

- Anti-N-Cadherin: monoklonaler Antikörper aus der Maus, 3B9, Invitrogen (Californien, USA)

Für Westernblot: Verdünnung 1:2600 in PBST

- Anti-GAPDH, monoklonaler Antikörper aus der Maus, 6C5, SantaCruz (Heidelberg, GER)

Für Westernblot: Verdünnung 1:5000 in PBST

Zweitantikörper:

- Horseradisch Peroxidase Linked, anti-Maus-IgG, Santa Cruz (Heidelberg, GER)

1.6 Spezielle Materialien für RNA-Untersuchungen

Geräte

- LightCycler® 480, Roche (Basel, CH)
- PCR Maschine: Mastercycler, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)
- UV Kammer: Geno Smart, VWR (Darmstadt, GER)

Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

- qRT-PCR Abklebefolie: Adhäs. PCR Folie, Sarstedt (Nürnberg, GER)
- qRT-PCR Platten: LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche (Basel, CH)
- Agarose: Agarose Broad Range, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- cDNA Kit: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (Californien, USA)
- dNTPs, Promega (Madison, USA)
- Ethidium Bromide, Merck (Darmstadt, GER)
- GoTaq DNA Polymerase, Promega (Madison, USA)
- GoTaq Flexi Puffer, Promega (Madison, USA)
- Mastermix: LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix, Roche (Basel, CH)
- MgCl₂, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- PCR Ladder: Gene Ruler Low Range DNA Ladder, Fermentas (St. Leon- Rot, GER)
- RNase away: Molecular Bio Products (San Diego, USA) Rneasy Plus Mini Kit, Qiagen (Hilden, GER)

Primer

Alle Primer stammen von Sigma Life Sciences (St. Louis, USA). Für Beta-1-Integrin lag die Effizienz bei 1,79, für NCAM bei 1,83 und für Cyclophyllin B bei 2,27.

Beta-1-Integrin:

CAAGAGAGCTGAAGACTATCCCA forward

TGAAGTCCGAAGTAATCCTCCT reverse

L1CAM:

CTGCCACGCCCACTTCCCAG forward

CAGGCGCGGCTTCCTGTCAA reverse

NCAM:

TGAGGTTCTCACCCCGCCC forward

CCCAGCCTCAGCACACTCGC reverse

NrCAM:

TGCCGGGGCTAGAGCCCTTT forward

ATGCCATTCGGGTGGCTCGG reverse

N-Cadherin:

TGTTTGACTATGAAGGCAGTGG forward

TCAGTCATCTCCACCAT reverse

PMP22:

TCTGTCCAGGCCACCATGA forward

GAAGAGTTGGCAGAAGAACAGGA reverse

Cyclophyllin B:

TGTGGTGTTTGGCAAAGTTC forward

GTTTATCCCGGCTGTCTGTC reverse

1.7 Spezielle Materialien für Zellkultur

Geräte

- Fluoreszenzlampe: HBO 100, Zeiss (Oberkochen, GER) Zellkultur: FASTER BHA 72, BHA 72M 1013 (Ferrara, Italien)
- Große Zentrifuge: Centrifuge, 5810 R, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)
- Kleine Zentrifuge: Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Inkubator: Galaxy 170S, New Brunswick an Eppendorf company (Wesseling-Berzdorf, GER)

- Primärzellkultur: FASTER S.R.L., BHA-48 (Ferrara, Italien)
- Wasserbad: Aqualine AL 18, Lauda (Lauda Königshofen, GER)

Verbrauchsmaterialien

- 96 well Platten: 96 well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Migrationsassay Dish: Fluoro Dish TM, dish 35 mm, glass 23 mm, WPI (Sarasota, USA)
- Zellkulturflaschen: Cellstar, 75 cm², Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Zellschaber: Cell Lifter, Costar (Washington, USA)

Zelllinien

- Human Schwann Cells: ScienCell, (Carlsbad, USA)
primäre Zellen aus einem humanen Nervus ischiadicus isoliert
- BJ: LCG Standards, (Wesel, GER) ATCC CRL-2522
aus der Vorhaut eines Neugeborenen isoliert
- MiaPaCa-2: ATCC, (Manassas, USA) ATCC CRL-1420
undifferenzierte Tumorzellen, aus dem Pankreas eines 65 Jahre alten Mannes
kaukasischer Abstammung mit PDAC isoliert
- SU86.86: ATCC, (Manassas, USA) ATCC CRL-1837
aus einer Lebermetastase eines PDAC einer 57 Jahre alten Frau kaukasischer
Abstammung isoliert
- T3M4: freundlicherweise von Prof. R.S. Metzgar (Duke University) zur
Verfügung gestellt, ATCC HTB-134
aus einer Lymphknotenmetastase eines PDAC eines 64 Jahre alten Mannes isoliert
- Ln-229: freundlicherweise von Prof. J. Schlegel (Neuropathologie, TU München) zur
Verfügung gestellt, ATCC CRL-2610
isoliert aus dem Glioblastom im rechten Temporallappen des Großhirns eines 65 Jahre
alten Mannes
- Panc-02-Cherry, murine PDAC-Zellen
Freundlicherweise überlassen von Dr. Mark Pines, The Hebrew University of
Jerusalem, Israel

Medien und Lösungen

- Cell Dissociation Solution, non-enzymatic 1x, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- dbcAMP: Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- DMSO: Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- L-Ascorbic acid, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Paraformaldehyd 8 %, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Poly-D-Lysine hydrobromide, Sigma Life Science (St. Louis, USA) Trypan Blue Stain 0.4 %, Invitrogen (Darmstadt, GER) Trypsin- EDTA, Solution 1 x, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Zellkulturmedien:

Für humane Schwannsche Zellen:

- Schwann Cell Medium, ScienCell, (Carlsbad, USA)
ZUSÄTZE: 5 % FBS, 1 % P/S Solution, 1 % SCGS, alles ScienCell, (Carlsbad, USA)

Für SU86.86 und T3M4:

- RPMI 1640 with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)
ZUSÄTZE: 10 % Fetal Bovine Serum, 1 % Penicillin-Streptomycin

Für MiaPaCa-2, mPanc-Cherry-2, LN-229, BJ:

- DMEM High Glucose (4,5 g/l) with L-Glutamine, PAA, (Pasching, A)
ZUSÄTZE: 10 % Fetal Bovine Serum, 1 % Penicillin-Streptomycin

1.7.1 Materialien für Adhäsionsassay

- Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen (Darmstadt, GER)

1.7.2 Materialien für Migrationsassay

- ECM-Gel: Extracellular cell matrix gel from Engelbreth Holm Swarm mouse sarcoma, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- HEPES buffer solution, Sigma Life Science (St. Louis, USA)

1.7.3 Materialien für Invasionassay

- Hamilton Pipette, 5µl, Model 65 RN SYR, Hamilton Company (USA)
- Hamilton Kanüle, 30 Gauge, 51 mm, Hamilton Company (USA)
- L- α -Lysophosphatidylcholine, Sigma Life-Science (St. Louis, USA)

1.8 Software

- AxioVision, V 4.8.2.0, Göttingen, GER
- Office 2010 (Word, Excel), Microsoft, 14.0.4760.1000, Redmond, USA
- GraphPad Prism 5, GraphPad Software, CA, USA
- ImageJ, National Institutes of Health, version 1.44
- LightCycler® 480 Software, Version 1.44 Roche, Version 1.5, Basel, CH

2. Methoden

2.1 Patienten

Das Material für die immunhistologischen Untersuchungen stammte aus chirurgischen Resektaten von Patienten mit Pankreaskarzinom. Die Patienten wurden über die Verwendung des entnommenen Gewebes zu Forschungszwecken informiert und gaben dazu ihre schriftliche Einwilligung. Das Gewebe des Normalpankreas stammte von Organspendern, für deren Pankreas keine Verwendung gefunden wurde (n=16 (NP), n=15 (PCa)).

2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

In den immunhistochemischen Untersuchungen sollte die Immunreaktivität der zu untersuchenden Moleküle N-Cadherin und PMP22 in humanen Gewebeschnitten von Normalpankreas und Pankreaskarzinom untersucht werden. Desweiteren korrelierten wir die Färbestärke der Moleküle mit dem Grad der neuralen Invasion, den wir in einer PGP 9.5-Färbung einschließlich einer Hämatoxylin-Gegenfärbung bestimmten.

2.2.1 Aufbereitung der Gewebeschnitte

Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme bei 4 °C für 24 Stunden in PBS mit 4 % Formaldehyd fixiert. Danach wurde das Gewebe für 24 Stunden in 70 % Ethanol gewaschen und in einem Gewebeinfiltrationsautomaten durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Das entwässerte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe des Rotationsmikrotoms 3 µm dick geschnitten, wir fertigten dabei konsekutive Schnitte der einzelnen Gewebe an. Die fertigen Präparate wurden für 24 Stunden bei 37 °C getrocknet. Mittels einer dreimaligen 10-minütigen Roticlear Behandlung wurden die Schnitte vor der jeweiligen Färbung entparaffinisiert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Nach der jeweiligen Färbung wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach dreimaliger 10-minütigen Roticlearbehandlung mit Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Gewebebeurteilung wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Kerne färben sich durch das Hämatoxylin blau an, während das Zellplasma und Proteine durch Eosin rot dargestellt sind. Die Schnitte wurden dazu 15 Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Nach 5-minütiger Benetzung mit Eosin wurden sie mit Wasser gespült.

2.2.3 Immunhistochemische Färbung von PGP 9.5

Die Gewebeschnitte wurden durch eine 5-minütige Inkubation mit Triton X (0,5 % in PBS) vorbehandelt. Nach einmaligem Waschvorgang mit TBST erfolgte eine 5-minütige Blockierung der endogenen Peroxidase mittels Wasserstoffperoxid (3 % in PBS) sowie ein 60-minütiger Blockvorgang unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 10 %igem Ziegen Serum. Über Nacht wurden die Schnitte bei 4 °C mit je 100 µl Primäantikörpersuspension (1:1000 in TBST) inkubiert. Nach dreimaligem Waschvorgang erfolgte bei Raumtemperatur die 60-minütige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Anti-Rabbit-Sekundäantikörper. Nach dessen Entfernung durch Waschen wurde die Sichtbarmachung der Antikörperbindung durch die Zugabe von DAB unter mikroskopischer Sicht erzielt. Das Eintauchen der Schnitte in Wasser nach 20 Sekunden beendete die Reaktion.

2.2.4. Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin

Die immunhistochemische Untersuchung von N-Cadherin wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des CSA-Kits durchgeführt. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Präparate zuvor 5 min in der Mikrowelle in Citratpuffer erhitzt.

2.2.5 Immunhistochemische Färbung von PMP22

Die immunhistochemische Untersuchung von PMP22 wurde nach Herstellerangaben mit dem Dako REAL Detection System durchgeführt.

2.2.6 Auswertung der Immunhistochemie

Die Verwendung konsekutiver Gewebeschnitte ermöglichte uns das mikroskopische Abfotografieren der jeweils gleichen Nerven in den unterschiedlichen Färbungen. Die einzelnen Nerven wurden durchnummeriert, durch die Software Image J geöffnet und ausgewertet. Dazu wurde das Bild zunächst in ein 8-Bit-Dateiformat konvertiert, die Maßeinheit wurde von Inch auf µm umgestellt und der Nerv inklusive des Perineuriums

manuell umzeichnet. Mittels eines eigens eingestellten „Thresholds“ wurde der immunoreaktive Bereich des Nervens durch das Programm rot markiert. Der immunoreaktive Teil wurde anteilig am Gesamtnerv berechnet.

Alle Nerven wurden so ausgewertet und in eine Exceltabelle übertragen. Auf der PGP 9.5-Färbung der Pankreaskarzinomschnitte bestimmten wir für jeden Nerv dessen Ausprägungsgrad der neuralen Invasion. Diese erfassten wir durch ein bereits vorgeschriebenes Scoring System (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Nerven mit Score 0 wiesen keine neurale Invasion auf, Nerven mit Score 1 zeigten eine perineurale Invasion, Nerven mit Score 2 zeigten eine intraneurale Invasion.

Bei der perineuralen Invasion befinden sich die Karzinomzellen in unmittelbarem Kontakt mit dem Perineurium, aber sie haben dieses noch nicht überschritten. Die intraneurale Invasion ist charakterisiert durch ein Überschreiten der perineuralen Hülle durch die Tumorzellen.

2.3 Immunzytofluoreszenz PMP22

Für die Immunzytofluoreszenz-Färbung wurden 1000 Schwannsche Zellen auf Teflonslides in 50 µl Medium ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die haftenden Zellen nach mehrmaligem Spülen für 1,5 h mit Anti-PMP22-Antikörper (Verdünnung 1:200) und Anti-GFAP-Antikörper (Verdünnung 1:300) inkubiert. Die Zweitantikörper (Anti-Mouse-Antikörper und Anti-Rabbit-Antikörper) wurden zusammen mit DAPI zur Kernfärbung für 45 min zugegeben. Die Teflonslides wurden anschliessend eingedeckelt und zum Schutz der Fluoreszenz in Alufolie im Kühlschrank aufbewahrt. Die Betrachtung der Färbung erfolgte mit dem Keyence BioRevo BZ-9000 Mikroskop.

2.4 Proteinchemische Untersuchungen

Der Westernblot dient der Detektion und semi-quantitativen Analyse der zu untersuchenden Moleküle auf Proteinebene. Dafür stellten wir Lysate aus Schwannschen Zellen in unterschiedlichen Passagen sowie aus Pankreaskarzinomzellen her. Die Proteine wurden zunächst in einer Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine für Antikörper zugängliche Membran übertragen. Mittels spezifischer Antikörper und einem Enzym beladenen Zweitantikörper können die zu untersuchenden Moleküle mit bekannter Molekülgröße darauf sichtbar gemacht werden.

2.4.1 Lysatherstellung aus Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von circa 80 % in RIPA Puffer gelöst, mit einem Cell Scratcher mechanisch gelöst und durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff homogenisiert.

2.4.2 Lysatherstellung aus Gewebe

Als Positivkontrolle verwendeten wir Rattenhirn und humanen Nervus Ischiadicus. Ein etwa 1 x 1 cm messendes Gewebestück wurde in einem Gewebehomogenisator (Qiagen Tissue Lyser LT) durch eine Stahlkugel in RIPA Puffer homogenisiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm konnte der proteinhaltige Überstand entnommen werden.

2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um das Gel stets mit der gleichen Proteinmenge beladen zu können, musste die Proteinkonzentration der einzelnen Proteinlysate bestimmt werden. Wir verwendeten hierfür das Pierce BCA Protein Assay Kit mit photometrischer Proteinkonzentrationsbestimmung. In alkalischem Milieu werden die im Kit enthaltenen zweiwertigen Kupferionen durch Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert, die dann mit der ebenfalls enthaltenen Bichinoninsäure zu einem violetten Reaktionsprodukt reagieren. Dessen Absorption wurde photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm bestimmt. Die Proteinmenge konnte durch Vergleich mit der Absorptionskurve mituntersuchter Standards mit bekannter Konzentration an humanem Rinderserumalbumin errechnet werden. In einer 96-well Platte wurden jeweils 5 µl der Probe beziehungsweise des Standards zugegeben und mit 200 µl des Kit-Reagens vermischt und für 30 Minuten lichtgeschützt bei 37 °C inkubiert, bevor die photometrische Messung mittels eines UV-Spektrometers erfolgte. Mit Hilfe der linearen Standardkurve wurde aus den Absorptionswerten die Proteinkonzentration errechnet. Um Kontaminationen auszuschließen, verwendeten wir jeweils doppelte Versuchsansätze.

2.4.4 Probenherstellung für Westernblot

Die pro Probe verwendete Proteinmenge betrug 30 µg. Die dafür benötigte Menge an Lysat wurde jeweils mit 6 x LSB versetzt und bis zu einem Zielvolumen von 42 µl mit Wasser aufgefüllt. Zur Denaturierung wurden die Proben 5 Minuten in einem Heizblock bei 95 °C erhitzt und anschließend bis zur Beladung des Gels auf Eis gestellt.

2.4.5 Westernblot

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. In einem diskontinuierlichen Gel auf Polyacrylamidbasis werden die Proteine zunächst in einem großmaschigen, taschenhaltigen Sammelgel konzentriert, um dann im engmaschigeren, basischen Trenngel aufgetrennt zu werden. Das im Laufpuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Tensid, denaturiert die Proteine. Zudem überdeckt es mit seiner negativen Ladung die Eigenladung der Proteine, sodass die Trennung rein nach Molekülgröße erfolgt.

Zur Gelherstellung mischten wir die im Material- und Methodenteil aufgelisteten Reagenzien in einem Falcon-Tube und nach Zugabe von TEMED, das zur Polymerisation des Gels führt, wurde das Gemisch des Trenngels luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegeben und mit 5 ml Isopropanolol bedeckt, um eine glatte Oberfläche zu schaffen. Nach 15 min war das Gel erhärtet, nach Abschütten des Isopropanols erfolgte das Auftragen des Sammelgels, in das man den Kamm für die Geltaschen steckte. Nach Auspolymerisation wurde die Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer befüllt und die Beladung des Gels mit den Proteinproben sowie 10 µl eines Markers mit bekannten Molekülgrößen erfolgte. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel aufgetrennt. Um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen, mussten sie in einem Semi-Dry-Blotter vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Dabei wird das Gel auf ein gleich großes PVDF-Membranstück gelegt. Nach unten aufgeführtem Aufbau wurden Gel und Membran von in Anodenbeziehungsweise Kathodenpuffer getränkten Whatmanfiltern umgeben. Das feste Zuschrauben der Kammer erzeugte Druck, ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld führte zur Übertragung der Proteine in Richtung der Anode. Die Proteine bleiben durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran hängen. Mit einer Stromstärke von 60 mA wurde 1 Stunde geplottet.

6 x Whatmanfilter in Anodenpuffer

3 x Whatmanfilter in Anodenpuffer 2

PVDF Membran

Gel

6 x Whatmanfilter in Kathodenpuffer

Nach dem Blottingvorgang wurde die Membran für 1 Stunde in 7,5 %iger Milch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren.

Die Antikörperbehandlung erfolgte nach folgendem Schema:

- 1) Primärantikörper, über Nacht, 4 °C
- 2) 3 x Waschen mit 7,5 %iger Milch, je 10 min, Raumtemperatur
- 3) Sekundärantikörper, 1 h, Raumtemperatur
- 4) 3 x Waschen mit 7,5 %iger Milch, Raumtemperatur
- 5) 1 x Waschen in PBS/Tween 0,1 %

Die Visualisierung des Zielproteins erzielten wir durch Verwendung einer Enhanced Chemoluminescence Lösung (ECL-Lösung) nach Herstellerangaben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP katalysiert dabei Umsetzung von Luminol, wobei Chemolumineszenz entsteht. Diese kann durch Belichtung des Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. In der Dunkelkammer wurde der Film exponiert und entwickelt.

2.4.6 Membranstripping und Ladekontrolle mit GAPDH

Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Es besitzt eine Molekülgröße von 37 kDa. Im Nachweis von N-Cadherin mit einer Molekülgröße von 135 kDa konnte die Membran geschnitten werden und beide Membranteile mit den jeweiligen Antikörpern gleichzeitig inkubiert werden. Beim Nachweis von PMP22 mit einer Molekülgröße von 22 kDa war dies nicht möglich. Wir entfernten den Primär- und Sekundärantikörper deshalb durch Stripping nach folgendem Schema:

2 x 7,5 min 15 ml Stripping Buffer bei RT

2 x 10 min Waschen mit PBS bei RT

2 x 5 min Waschen mit TBST bei RT

Anschließend erfolgte erneutes Blocken und die GAPDH Färbung wie oben beschrieben.

2.4.7 Auswertung Westernblot

Die Auswertung der Westernblots erfolgte mittels ImageJ-Software, wobei die Banden densitometrisch miteinander verglichen wurden. Die Banden wurden stets ins Verhältnis zur GAPDH-Bande der entsprechenden Probe gesetzt.

2.5 RNA Untersuchungen

2.5.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Zur RNA-Gewinnung aus zu circa 80 % konfluenten Zellen verwendeten wir das Rneasy Plus Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Der Zellrasen wird dabei mit einem Cell Scratcher abgekratzt. In verschiedenen Wasch- und Filterschritten wird zunächst vorhandene DNA eliminiert, RNA gebunden, Kontaminationen gewegewaschen und die RNA anschließend in RNase freiem Wasser gelöst. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mittels Nanodrop photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei Reinheit der RNA sollte das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.5.2 cDNA-Herstellung

Vor der Durchführung der quantitativen PCR musste die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Um möglicherweise noch vorhandene DNA zu eliminieren, führten wir zunächst einen DNase-Verdau durch. Pro 2 µl RNA fügte man 2 µl DNase, 1 µl Puffer und 10 µl H₂O hinzu. Die DNA wurde im Lightcycler bei 37 °C für 30 min verdaut, die Reaktion durch Zugabe von 1 µl Stopp Puffer und 10-minütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

Die Umschreibung in cDNA erfolgte nach Herstellerangaben durch das High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit von Applied Biosystems. Zu jedem Ansatz mit 2 µl umzuschreibender RNA wurden 10 µl Mastermix zugegeben. Dieser setzte sich zusammen aus:

10 x RT Buffer	2 µl
15 x dNTP Mix	0,8 µl
10 x RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	3,2 µl

Im Mastercycler verlief die reverse Transkription nach folgendem Schema:

10 min bei 25 °C

2 h bei 37 °C

Die Reaktion wurde durch Kühlen auf 4 °C gestoppt. Die cDNA konnte bei - 20 °C gelagert werden. Als Kontrolle ließen wir eine Probe ohne Zufügen der reversen Transkriptase und eine Probe mit H₂O mitlaufen.

2.5.3 PCR zur Primertesting

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer und der Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur führten wir eine PCR mit Temperaturgradienten durch. Durch Kenntnis der zur erwartenden DNA-Fragmentlänge kann das Reaktionsprodukt auf seine Spezifität überprüft werden. Pro 1 µl der umgeschriebenen cDNA wurde 49,5 µl des zuvor wie folgt hergestellten Mastermix zugegeben.

Nuclease-free water	34,25 µl
GoTaq Flexi Buffer	10 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs, 10 mM	1 µl
Forward Primer, 10 µM	1 µl
Reverse Primer, 10 µM	1 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,25 µl

Aufgrund ihrer geringen Stabilität wurde die DNA-Polymerase als letztes zugegeben. Unmittelbar wurde die PCR im Thermocycler nach folgendem Schema gestartet:

Initiale Denaturierung	95°C	1 min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 s	38 Zyklen
Annealing	Primerabhängig	45 sec	38 Zyklen
Elongation	72°C	45 sec	38 Zyklen
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

Bei der Wahl der Annealing-Temperatur orientierten wir uns an der durchschnittlichen Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaares. Wir testeten verschiedene Annealingtemperaturen in Abständen von 0,5 °C.

N-Cadherin: T_m Forward Primer: 63,9 °C, T_m Reverse Primer: 63,2 °C

Annealing Temperatur N-Cadherin PCR: 57,5 °C

PMP22: T_m Forward Primer: 68,2 °C, T_m Reverse Primer: 65,7 °C

Annealing Temperatur PMP22 PCR: 61°C

Nach Beendigung der Vervielfältigung wurde das Reaktionsprodukt auf 4 °C gekühlt.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte in einem 2 %igem Agarosegel. Dazu wurde 200 ml TBE mit 4 g Agarose zweimalig aufgekocht, anschließend 10 µl Ethidiumbromid zugegeben und in die Elektrophoresekammer gegossen. Ethidiumbromid bindet sich reversibel an DNA und fluoresziert bei UV-Bestrahlung mit 300 nm Wellenlänge, wodurch die DNA sichtbar gemacht werden kann. Das Gel wurde nach 30-

minütiger Auspolymerisation mit jeweils 15 µl DNA Ladder-Marker beziehungsweise 15 µl der DNA Probe, die davor mit 6 x DNA Loading Dye gemischt wurde, beladen. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung für circa 30 min bei 120 mA. Anschließend wurden die DNA-Banden im Gel unter UV-Licht auf ihre Größe hin beurteilt. Die Annealing-Temperatur der Probe mit der stärksten Bande wurde für die quantitative PCR ausgewählt.

2.5.4 Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR ermöglicht im Gegensatz zur klassischen PCR die relative Quantifizierung der DNA. Wir verwendeten hierzu das Light Cycler System von Roche, das den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 verwendet. Durch Anlagerung des Farbstoffes an die DNA kommt es zur Zunahme der Fluoreszenz, die am Ende der Elongation jedes Zyklus gemessen wird. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur Zunahme der DNA Menge. Durch das Auftragen des Fluoreszenzanstiegs gegen die Anzahl der Reaktionszyklen erhält man die Amplifikationskurve. Es wird der Zyklus ermittelt, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals das Hintergrundfluoreszenzsignal überschreitet (cycle treshold Wert). Dieser gibt Aufschluss über die anfangs enthaltene Menge an cDNA. Um Ungenauigkeiten im Versuchsablauf zu relativieren, wurde der ct-Wert durch den ct-Wert des Housekeeping-Genes Cyclophilin B dividiert.

Da aus dem Fluorezenzanstieg allein nicht auf die Spezifität des entstandenen Reaktionsproduktes geschlossen werden kann, erfolgt zudem eine Schmelzkurvenanalyse. Durch schrittweise Temperaturerhöhung wird die Temperatur ermittelt, an der es durch Dissoziation der entstandenen DNA-Doppelstränge in ihre Einzelstränge zu einer Fluoreszenzänderung kommt. Diese Temperatur ist abhängig von der Länge der DNA-Produkte. Die PCR wurde in 96-well-Platten durchgeführt. Pro Well wurde 25 ng cDNA in einem Volumen von 5 µl gegeben, zugefügt wurde jeweils:

SYBR Green I Mastermix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Nuclease-free water	3 µl

Jede zu analysierende Probe wurde doppelt pipettiert. Zum Ausschluss von Kontamination wurden als Negativkontrollen bei jeder qRT-PCR eine Probe mit Nuklease-freiem Wasser sowie eine Probe, die ohne reverse Transkriptase umgeschrieben wurde, mituntersucht. Die 96-well-Platte wurde mit einer Klebefolie versehen und zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	10 s	50 Zyklen
Annealing	Primerabhängig*	15 s	50 Zyklen
Elongation	72 °C	15 s	50 Zyklen
Schmelzkurve	95 °C 65 °C Heizen bis 97 °C (0,1 °C/s ansteigend)	5 s 1 min	1 Zyklus

Primereffizienzbestimmung

Die Primereffizienzen wurden durch eine qRT-PCR einer Probe mit einer Verdünnungsreihe von 25 ng / µl bis 0,00001 ng / µl bestimmt. Die Effizienz ging in die relative Quantifizierung mit ein.

Primereffizienzen:

Cyclophilin B	2,041
N-Cadherin	1,863
PMP22	2,06
Beta-1-Integrin	1,79
NCAM	1,83

Die Auswertung erfolgte mit Light Cycler 480 Software von Roche.

2.6 Zellbiologische Untersuchungen

2.6.1 Zelllinien und Zellkultivierung

Für das Projekt verwendeten wir die Pankreaskarzinomzelllinien SU86.86, Mia-Pa-Ca-2, murine cherry-transduzierte Panc-2 sowie humane Schwannsche Zellen. Die hSC wurden von der Firma ScienCell bezogen, die primären Zellen stammen aus humanen Nervi ischiadici. Bei den anderen Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Zelllinien, erhalten von der American Type Culture Collection (ATCC). Wir verwendeten die Zelllinien einerseits zur Herstellung der Zelllysate für Westernblot und qPCR, andererseits benötigten wir sie für die funktionalen Analysen. Die Zellkultivierung erfolgte in 75 cm Zellkulturflaschen in einem Brutschrank mit 5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Wir passagierten die Zellen jeweils bei einer Konfluenz von circa 90 %. Dazu saugten wir das Kulturmedium ab, spülten die Zellen zweifach mit PBS und lösten sie mit 1 ml Trypsin-EDTA für circa 5 Minuten bei 37 °C. Nach der Lösung der Zellen wurde das Trypsin mit 9 ml serumhaltigem Zellkulturmedium inaktiviert. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon überführt, 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium

resuspendiert. Je nach Bedarf splitteten wir die Zellen in einem Verhältnis 1:3 bis 1:10. Alle 2 bis 4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen. Eine Besonderheit ergab sich bei der Kultivierung der Schwannschen Zellen. Hierfür beschichteten wir die Zellkulturflaschen nach Empfehlung des Herstellers mit Poly-D-Lysin (1 ml an 0,1 mg / ml pro 75 cm² Fläche). Der Kulturflaschenboden wurde für 15 min mit 1 ml Poly-D-Lysin benetzt, nach Absaugen des überschüssigen Poly-D-Lysins spülten wir einmal mit 10 ml PBS und ließen die Flaschen 30 Minuten unter dem Abzug trocknen.

Kryokonservierung von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte nach deren Lösung mit Trypsin-EDTA, Zellzählung und 5-minütiger Abzentrifugation. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in Gefriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Es wurden jeweils 1 Millionen Zellen in einem Kryoröhrchen mit 1 ml Gefriermedium eingefroren. DMSO verhindert die Entstehung von Eiskristallen und ist so zytoprotektiv. Bei Raumtemperatur wirkt es zytotoxisch, sodass ein schnelles Einfrieren erfolgen musste. Dazu wurden die Kryoröhrchen in einem mit Isopropanolol gefüllten Kryocontainer für 24 Stunden bei - 80 °C gelagert und anschliessend in flüssigem Stickstoff konserviert. Wurden kryokonservierte Zellen benötigt, wurden diese aufgetaut, in ein mit 20 ml Medium befülltes Falcon überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Zellzahlbestimmung

Für unsere funktionalen Analysen benötigten wir stets gleiche Zellzahlen, sodass wir diese in einer Neubauerzellkammer bestimmten. (0,0225 mm² Fläche bei einer Tiefe von 0,1 mm). Die zu untersuchende Zellsuspension wurde in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau vermischt, 10 µl der Mischung wurden in die Zählkammer gegeben. Nicht vitale Zellen nehmen den blauen Farbstoff durch ihre Membranpermeabilität auf und färben sich blau an. Die nicht gefärbten vitalen Zellen konnten lichtmikroskopisch ausgezählt werden. Mäanderförmig zählten wir die Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer und berechneten die absolute Zellzahl nach folgender Formel:

$$2 \times (Z / 4) \times 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

Z: gezählte Zellen in allen Quadranten

2.6.2 Adhäsionsassay

Der verwendete Adhäsionsassay basiert auf einem bereits etablierten Assay, der die Adhäsion von Zellen an einem konfluenten Zellrasen untersucht. Es wird der prozentuale Anteil der dabei anheftenden Zellen bestimmt (Issa, Nummer et al. 2009). In unserer Fragestellung handelte es sich um die Adhäsion von fluoreszenzmarkierten Pankreaskarzinomzellen an einen ausgesäten Schwann-Zellrasen. Durch einen N-Cadherin blockierenden Antikörper wurde das Oberflächenmolekül auf Schwannschen Zellen, Pankreaskarzinomzellen sowie auf beiden Zelltypen gleichzeitig blockiert. Das Adhäsionsverhalten wurde mit dem nicht behandelten Zellen verglichen. Den Adhäsionsassay führten wir in 96-well-Platten durch. Drei Tage vor Durchführung des Versuchs wurden 6000 hSC (gemischt aus zwei unterschiedlichen Passagen) ausgesät, sodass am Versuchstag ein konfluenter Zellrasen vorhanden war. Wir führten den Adhäsionsassay mit zwei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien durch (SU86.86 und MiaPaCa-2). Diese züchteten wir in 75 cm-Flaschen zu einer Konfluenz von circa 80 %. Um die Oberflächenmoleküle nicht zu verdauen, verwendeten wir kein Trypsin, sondern lösten die Tumorzellen mit 5 ml einer nicht enzymatischen Zell-Dissoziationslösung. Nach Zugabe von 10 ml serumhaltigem Medium, Zentrifugation und Resuspension wurden die Zellen gezählt. Der Assay verlief in verschiedenen Teilschritten:

1) Färbung der Tumorzellen

Zur anschließenden Sichtbarmachung der adhärenzenden Tumorzellen färbten wir diese mit einer Lebendzellfärbung mit dem Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit von Invitrogen. Der stark grün fluoreszierende Farbstoff bindet sich kovalent an freie Amine im Zellinneren. Dazu wurden je 1 Millionen Karzinomzellen für 15 min bei 37 °C mit 1 µl des Farbstoffes in 2 ml PBS inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und für 30 min in FBS-haltigem Medium inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und einmaligem Waschen mit PBS standen die gefärbten Zellen für den Versuch zur Verfügung.

2) Antikörperbehandlung der Zellen

Wir verwendeten bei jeder Versuchsdurchführung drei verschiedene Ansätze

- N-Cadherin Blockade auf Schwannschen Zellen
- N-Cadherin Blockade auf Tumorzellen
- N-Cadherin Blockade auf Schwannschen- und Tumorzellen

Jeder Ansatz wurde in Duplikaten durchgeführt. Als Vergleichsgruppe wurde eine nicht behandelte Gruppe verwendet. In der Kontrollgruppe behandelten wir die Zellen mit einem Maus-IgG1-Isotyp-Antikörper. Dadurch wollten wir mögliche Effekte der

Antikörperbehandlung ausschließen.

Die Antikörperbehandlung der Pankreaskarzinomzellen fand in 1,5 ml Eppendorf-Tubes statt. 1 Millionen Tumorzellen wurden aliquotiert, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 400 μ l antikörperhaltigem serumfreiem Medium resuspendiert. Wir verwendeten Antikörperverdünnungen von 1:10 und 1:20. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit PBS und erneutem Zählen waren die Karzinomzellen bereit für das Aufbringen auf die ausgesäten Schwannschen Zellen. Zeitgleich wurde die N-Cadherin-Behandlung der Schwannschen Zellen durchgeführt. Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit 200 μ l PBS wurden pro Well 50 μ l der Antikörpersuspension (1:10 und 1:20 in serumfreiem Medium) hinzugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde abgesaugt, es wurde einmal mit PBS gewaschen.

3) Adhärenz der Zellen

Pro Well wurden 3000 Tumorzellen in 200 μ l FCS-haltigem Medium hinzugegeben. Die Tumorzellen hatten 30 min Zeit, bei 37 °C an den Schwannschen Zellen zu adhären. Danach wurden die Zellsuspension vorsichtig abgesaugt, die Wells zweimal mit 200 μ l PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit 4 % Formalin fixiert.

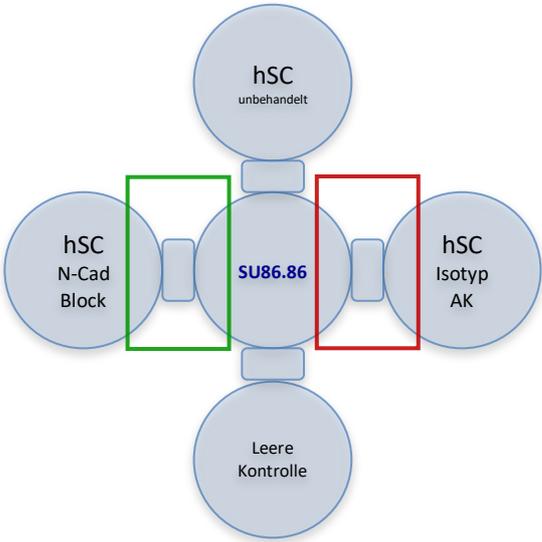
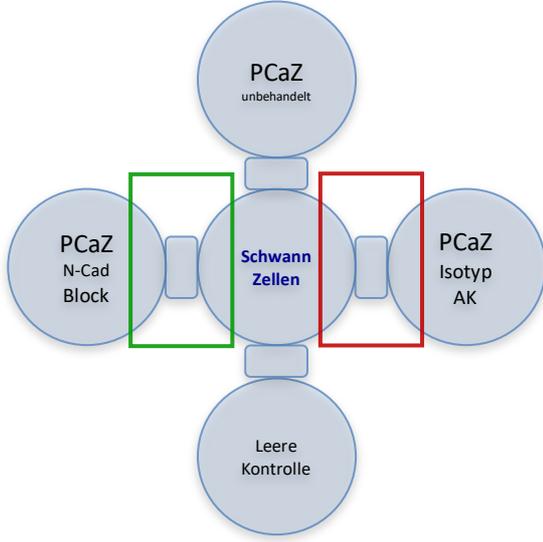
Jedes Well wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop in einer Übersichtsaufnahme bei 10-facher Vergrößerung abfotografiert. Die Auswertung erfolgte mit der Image J-Software. Die Aufnahme eines gesamten Wells wurde betrachtet. Eine Randzone von circa 1 cm wurde wegen vermehrter, unspezifischer Tumorzelladhäsion für die Auswertung ausgeschlossen. Über die Funktion „find Maxima“ konnte nach manueller Einstellung der „noise tolerance“ die Anzahl der adhärenen Tumorzellen bestimmt werden. Die „noise tolerance“ wurde so gewählt, dass die einzelnen Zellen differenziert erkannt wurden. Verglichen wurden Werte der behandelten Gruppe mit den Werten der nicht behandelten Gruppe. Beide Gruppen wurden auf die Isotypkontrolle bezogen.

2.6.3 Migrationassay

Zur Überprüfung der tumorzellgerichteten Migration der Schwannschen Zellen verwendeten wir einen bereits etablierten 3D-Migrationsassay (Ceyhan, Demir et al. 2008).

Die zu untersuchenden Zellen wurden hierbei in Extrazellulärmatrixgel ausgesät. Die zueinander migrierenden Zellen wurden über Gelbrücken verbunden, und die gerichtete Migration nach 12 bis 24 Stunden konnte via time-lapse Mikroskopie beobachtet und quantifiziert werden.

Zunächst wurden die verwendeten Zellen (hSC und SU86.86) mit PBS gewaschen, mit Nicht-enzymatischer Zell-Dissoziationslösung gelöst und gezählt. Es erfolgte die Antikörperbehandlung der Zellen in analoger Weise zur Behandlung im Adhäsionsassay. Nach der Behandlung wurden die Zellen erneut gezählt. Pro ECM-Gelkreis wurden 75 000 Schwannsche Zellen beziehungsweise 100 000 SU86.86-Zellen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aliquotiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen, das Zellpellet in flüssiges ECM-Gel (25 µl pro Gelkreis) aufgenommen. Die Anordnung der Zellen erfolgte nach folgendem Schema:

Anordnung der Migrationassays:	
	
<p>Blockade von N-Cadherin auf Schwannschen Zellen (links). Die tumorzell-gerichtete Migration wurde verglichen mit der Migration von unbehandelten hSC (oben) sowie mit der Migration von mit Isotyp behandelten hSC (rechts). AK: Antikörper. hSC: humane Schwannsche Zellen.</p>	<p>Blockade von N-Cadherin auf Pankreaskarzinomzellen (SU86.86 und Mia-Pa-Ca-2) (links). Die tumorzell-gerichtete Migration der hSC (mittig) wurde verglichen mit der Migration der hSC zu unbehandelten PCaZ (oben) sowie mit der Migration von hSC zu mit Isotyp behandelten PCaZ (rechts).</p>

Der Assay wurde in Petrischalen durchgeführt. Zuerst wurden die sich mittig befindenden Zellen in ECM-Gel aufgenommen und platziert. Es folgten die darum herumliegenden Gelkreise wie abgebildet in jeweils 1 mm Abstand. Die Petrischale wurde zur Polymerisation des ECM-Gels 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um eine Migration zu ermöglichen, wurden die erhärteten Gelkreise durch eine 1 mm lange Gelbrücke verbunden, die man mit einer 10 µl-Pipette mit flüssigem ECM-Gel herstellte. Um auch diese zu polymerisieren, wurden die Petrischalen weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nun wurde vorsichtig jeweils 1 ml Schwann-Zell-Kulturmedium und 1 ml DMEM-Kulturmedium hinzugegeben. Bis zum Beginn der Zellmigration inkubierten wir die Ansätze für 12 bis 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Lichtmikroskopisch war zu beurteilen, ob die Zellen bereits über die Brücken zu migrieren begonnen hatten, da dies den geeigneten Zeitpunkt zum Start der Time-Lapse-Mikroskopie darstellte. Die Zugabe von 50 µl HEPES-Puffer zum Versuchsansatz garantierte stabile pH-Verhältnisse. Die Zeitrafferaufnahmen erfolgten in einer Inkubationskammer, die konstante 37 °C und eine 5 % CO₂-Atmosphäre herstellte. Das Mikroskop konnte durch seinen automatisch fahrbaren Tisch verschiedene Positionen einstellen, sodass alle Fronten aufgenommen werden konnten. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden die Migrationsfronten alle 15 Minuten fotografiert, sodass die Migrationsbewegungen der Zellen auf insgesamt 96 Bildern festgehalten wurden.

Die Auswertung der Migrationsassays erfolgte mit Hilfe des für Image J entwickelten Chemotaxis and Migration Plug-In von ibidi. Pro Front wurde dabei die Migration von 15-30 einzelner Zellen ausgewertet. Die Bildersequenz im TIFF-Format wurde in Image J importiert. Das Cell-Tracking erfolgte durch das Plug-In „Manual Tracking“ durch manuelles Anklicken der Zellen auf den 96 Bildern. Dadurch wurde der zurückgelegte Weg einer Zelle vollständig erfasst. Das zeitliche Intervall zwischen den Aufnahmen und die Koordinaten mussten im Programm angegeben werden. Die Daten konnten in einem zvi-Format abgespeichert werden. Über das Chemotaxis-Tool konnten aus diesen Daten die Parameter Direktionalität, Geschwindigkeit, akkumulierte und euklidische Distanz sowie den Forward Migration Index errechnet werden.

2.6.4 Stimulation der Zellen zur Myelinbildung

In der Literatur war die abnehmende Myelinisierung der Schwannschen Zellen *in vitro* bereits beschrieben. Es gibt einige *in vitro* Co-Kultur-Ansätze, in denen Schwannsche Zellen in Kontakt mit Neuronen und deren axonalen Strukturen kommen und dadurch ihre Fähigkeit zur Myelinbildung erhalten bleibt (Hyung, Yoon Lee et al. 2015). Eine andere Möglichkeit stellt die *in vitro* Stimulation der Schwannschen Zellen dar. Eine erfolgreiche Stimulation von kultivierten Schwannschen Zellen zur Myelinbildung mit dbcAMP und NRG1 wurde beschrieben (Arthur-Farraj, Wanek et al. 2011), andere Autoren verwendeten Ascorbinsäure (Eldridge, Bunge et al. 1987).

Wir stimulierten die Schwannschen Zellen, indem wir 100 000 Zellen aussäten, diese 2 Tage bis zu einer Konfluenz von circa 80 % inkubierten, sie daraufhin für 24 h serumfrei stellten um sie anschließend für 72 Stunden mit 1 mM dbcAMP und Ascorbinsäure (Konzentration: 50 µg / ml Medium) in Schwann-Zell-Medium mit 0,5 % BSA zu stimulieren.

2.6.5 Ex vivo Invasions-Assay

Da es uns nicht gelang PMP22 auf Proteinebene eindeutig nachzuweisen, war die funktionale Analyse dieses Moleküls im Adhäsions- und Migrationassay fragwürdig. Um dennoch der Frage nachzugehen, ob PMP22 als ein spezifisches Myelin-assoziiertes Molekül eine Rolle in der neuralen Invasion spielt, verfolgten wir einen alternativen Ansatz. In unserem eigens etablierten Invasionsassay injizierten wir fluoreszierende Tumorzellen (murine Panc-2-Cherry-Zellen) in murinen Nervus Ischiadicus. Als somatomotorischer Nerv zeigt der Nervus Ischiadicus eine starke Myelinisierung. Wir verglichen die Tumorzellmigration im unbehandelten Nerv mit der Migration in einem Nerv, den wir mittels Lysophosphatidylcholin demyelinisierten (Wallace, Cottrell et al. 2003). Die Injektion von Pankreaskarzinomzellen im murinen Nervus Ischiadicus im Rahmen eines *in vivo* Projektes war bereits etabliert (Gil, Cavel et al. 2010, Cavel, Shomron et al. 2012).

Für dieses Versuchsvorhaben verwendeten wir Wildtyp-(C57BL/6) Mäuse, die wir zunächst mittels zervikaler Dislokation euthanasierten. In Bauchlage wurde vor Inzision das Fell der Tiere desinfiziert, nach Inzision der Haut erfolgte entlang der Sitzbeinmuskulatur die Präparation des Musculus gluteus maximus. Nach dessen Spaltung wurde der auf dem Musculus biceps femoris und dem Musculus femorococcygeus verlaufende Nervus Ischiadicus vorsichtig freipräpariert. Mit einem chirurgischen Faden (Ethilon® 3-0) wurde der Nerv umschlungen und mit einer Klemme fixiert, sodass der aufgespannte Nerv ein Widerlager für die Injektion bot. Unter mikroskopischer Sicht erfolgte mit Hilfe einer Hamilton Pipette die Injektion der Tumorzellen. Wir injizierten dabei 2 µl einer davor

vorbereiteten Zellsuspension mit einer Konzentration von 10 000 Zellen / μl in PBS. Die Injektion erfolgte langsam, und nach Beendigung der Injektion beließen wir die Kanüle kurz im Nerv, um einen Wiederaustritt der Zellsuspension zu vermeiden. Nach schneller Entfernung der Kanüle wurde der Nerv zweimal vorsichtig durchtrennt und in ein 35 mm-Well gelegt. Nun erfolgte die Behandlung der Nerven zur Demyelinisierung. Dazu wurde der Nerv 10 min mit 10 μl Lysophosphatidylcholin-Suspension (15 mg / ml in NaCl 0,9 %) benetzt, anschließend einmal vorsichtig mit PBS gewaschen.

Zur Fixierung wurde der Nerv 20 min bei 37 °C inkubiert, sodass er leicht an den Boden antrocknete, anschließend wurde jeweils 1 ml Schwann-Zell-Kulturmedium und 1 ml DMEM-Medium hinzugegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte über einen Zeitraum von 24 h die Aufnahme mittels Time-Lapse-Mikroskopie mit einer Aufnahme alle 15 min. Zur Sichtbarmachung der Tumorzellen im Nerv wurde zusätzlich zur Aufnahme des Durchlichtmikroskops eine Fluoreszenzaufnahme angefertigt. Durch Übereinanderlegen beider Aufnahmen ist die Bewegung der Zellen innerhalb des Nervs sichtbar. Die Zellmigrationen wurden analog zum Migrationsassay mit Hilfe des Celltracking- und Chemotaxis-PlugIn von ibidi für ImageJ ausgewertet. Da wir gerichtete Bewegung in diesem Versuchsaufbau in beide Richtungen entlang des Nervens definierten, wurden alle Migrationsindizes positiviert. Pro Nerv wurden mindestens 10 Zellen getrackt, anschließend die Migrationsparameter (Migrationsindex, Direktionalität, akkumulierte und euklidische Distanz, Geschwindigkeit) in unbehandelten versus behandelten Nerven verglichen.

IV Ergebnisse

1. Expressionsanalyse

Um einen möglichen Einfluss von N-Cadherin und PMP22 auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom und im Speziellen auf die Adhäsion zwischen Schwann-Zellen und Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, führten wir zunächst eine ausführliche Expressionsanalyse der Adhäsionsmoleküle durch. Untersucht wurde die Immunreaktivität von N-Cadherin und PMP22 in Nerven des Normalpankreas und des Pankreaskarzinoms. Es folgten Expressionsanalysen auf Protein- sowie RNA-Ebene in Schwannschen Zellen und in PCa-Zellen. Außerdem verglichen wir durch quantitative RT-PCR die Expression aller im Projekt untersuchten Adhäsionsmoleküle (Beta-1-Integrin, N-Cadherin, NCAM, NrCAM, L1CAM und PMP22) auf Schwannschen Zellen und PCa-Zellen.

1.1 IHC von N-Cadherin und PMP22 in intrapankreatischen Nerven

1.1.1 Immunhistochemie von N-Cadherin im NP und im Pankreaskarzinom

Die immunhistochemische Untersuchung von N-Cadherin in Normalpankreas zeigte eine spezifische Färbung in intrapankreatischen Nerven. Auch färbten sich einige Langerhans'sche Inseln leicht an. Interessant dabei war die Beobachtung, dass nicht alle Nerven eine gleich starke Immunreaktivität zeigten. Im Pankreaskarzinom zeigte sich ein ähnliches Färbemuster von N-Cadherin wie im Normalpankreas. Auffällig war außerdem die starke Immunreaktivität der Pankreaskarzinomzellen.

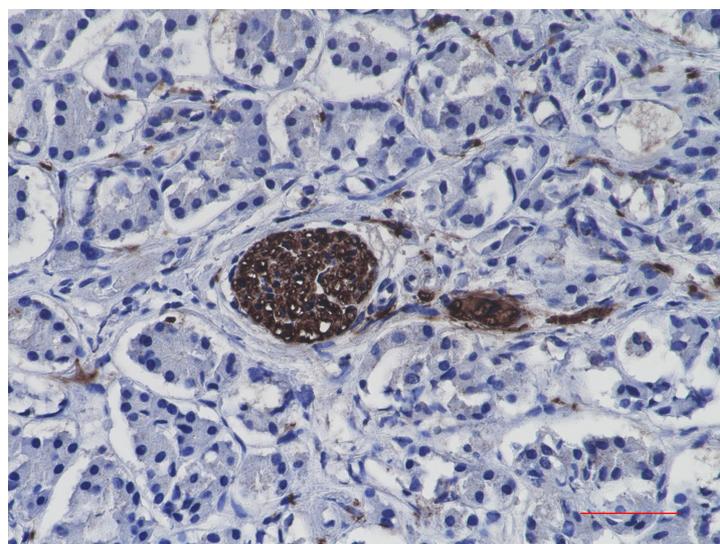


Abbildung 1a:

Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin in NP.

Nerven zeigen eine spezifische Färbung.

Skala 50 μ m

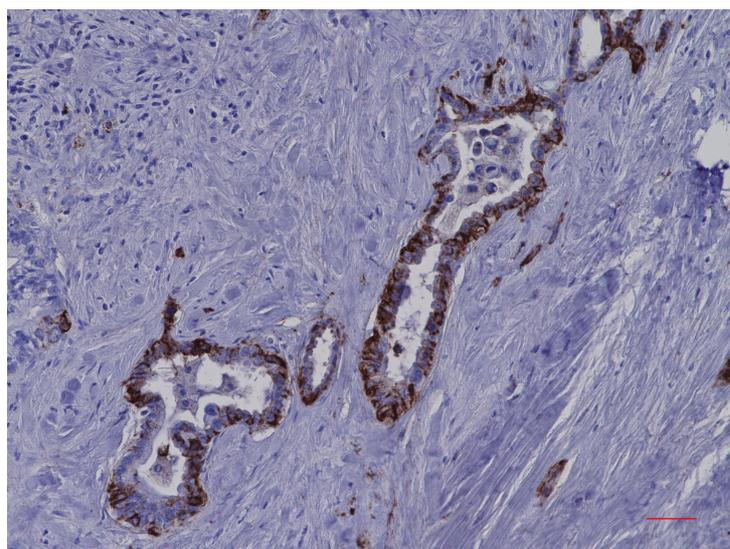
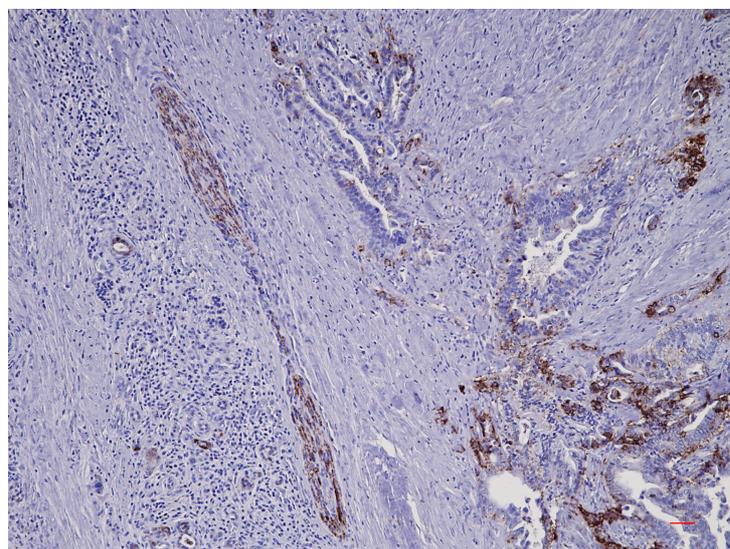


Abbildung 1b:

Immunhistochemische Färbung von N-Cadherin im PCa. Nerven zeigen eine spezifische Färbung (oben).



Auch PCa-Zellen zeigen eine spezifische Immunoreaktivität für N-Cadherin (unten).

Skala 50 μ m

1.1.2 Immunhistochemie von PMP22 im Normalpankreas und im Pankreaskarzinom

Immunhistochemisch zeigte sich eine spezifische Immunreaktivität in intrapankreatischen Nerven. Auch PMP22 konnte in Pankreaskarzinomzellen detektiert werden, die Karzinomzellen färbten sich im apikalen Zellkompartiment stark an.

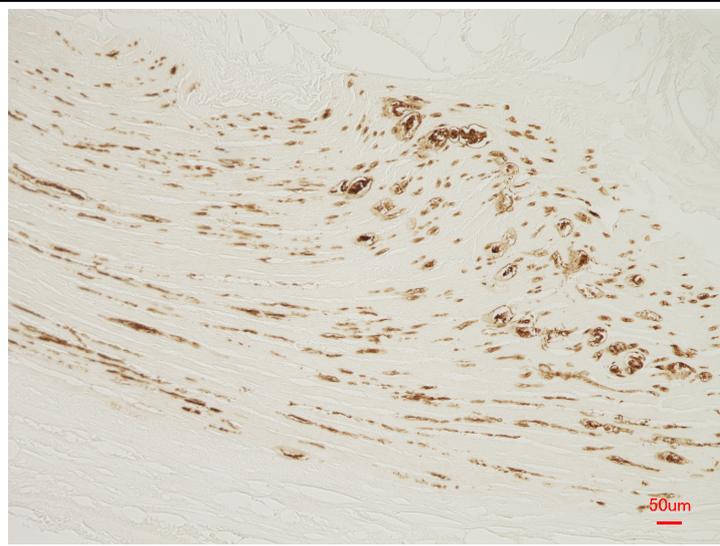


Abbildung 2a:

Immunhistochemische Färbung von PMP22 im Normalpankreas

Nerven zeigen eine spezifische Färbung.

Ohne Gegenfärbung mit Hämatoxylin zeigt sich durch fehlende Farbinterferenz die Myelin spezifische Färbung besonders deutlich.

Skala 50 µm

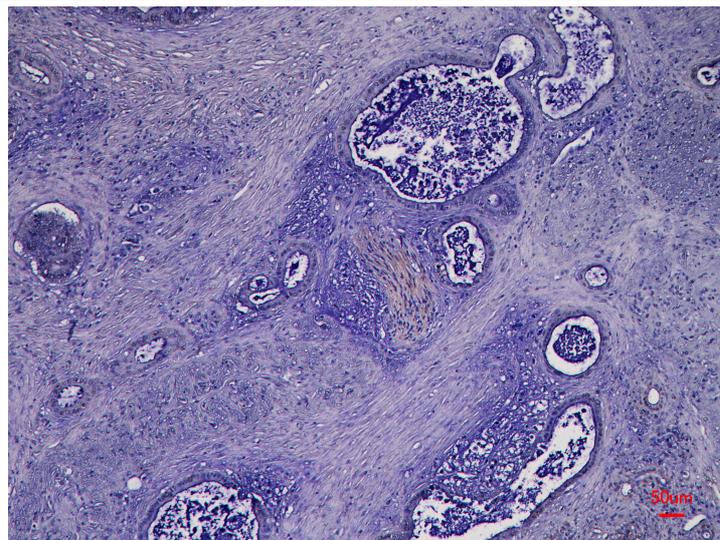


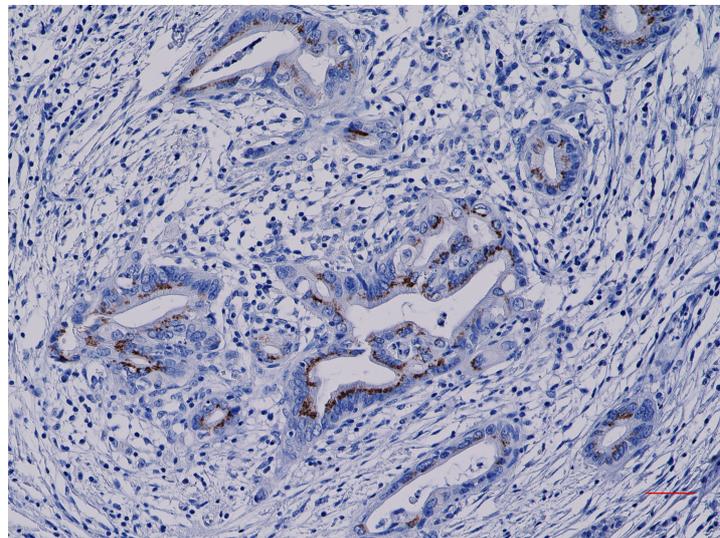
Abbildung 2b:

Immunhistochemische Färbung von PMP22 im Pankreaskarzinom.

Nerven zeigen eine spezifische Färbung (oben).

Auch PCa-Zellen zeigen eine spezifische Immunreaktivität für PMP22 (unten).

Skala 50 µm



1.1.3 Vergleich der Immunoreaktivität von N-Cadherin und PMP22 in Normalpankreas und im Pankreaskarzinom

Wir verglichen den jeweils durchschnittlichen immunoreaktiven Anteil der Nerven in normalem Pankreas mit dem im Pankreaskarzinom. Die Immunoreaktivität von N-Cadherin unterschied sich dabei nicht signifikant zwischen den beiden Gewebetypen.

Die Färbung von PMP22 hingegen zeigte eine signifikant reduzierte Immunoreaktivität von Nerven im Pankreaskarzinom verglichen mit Nerven des Normalpankreas. PMP22 ist ein spezifisches Myelin-assoziiertes Adhäsionsmolekül. Somit zeigt die verminderte Immunoreaktivität dieses Moleküls eine Abnahme des durchschnittlichen Myelinisierungsgrades der Nerven im Pankreaskarzinom.

Abbildung 3: Expressionsvergleich von PMP22 im Normalpankreas versus Pankreaskarzinom

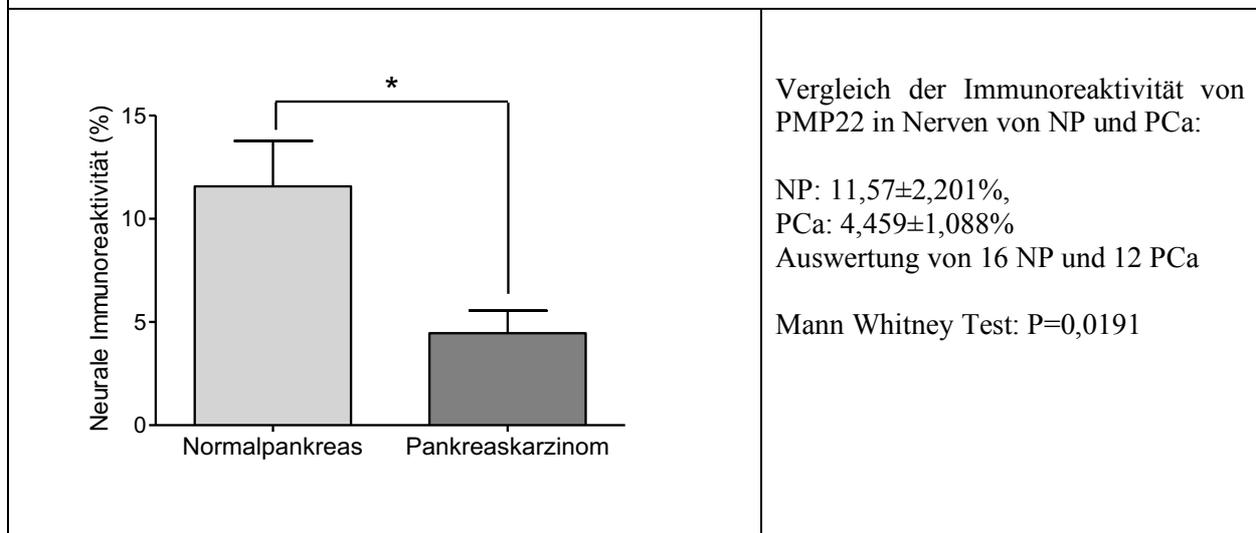
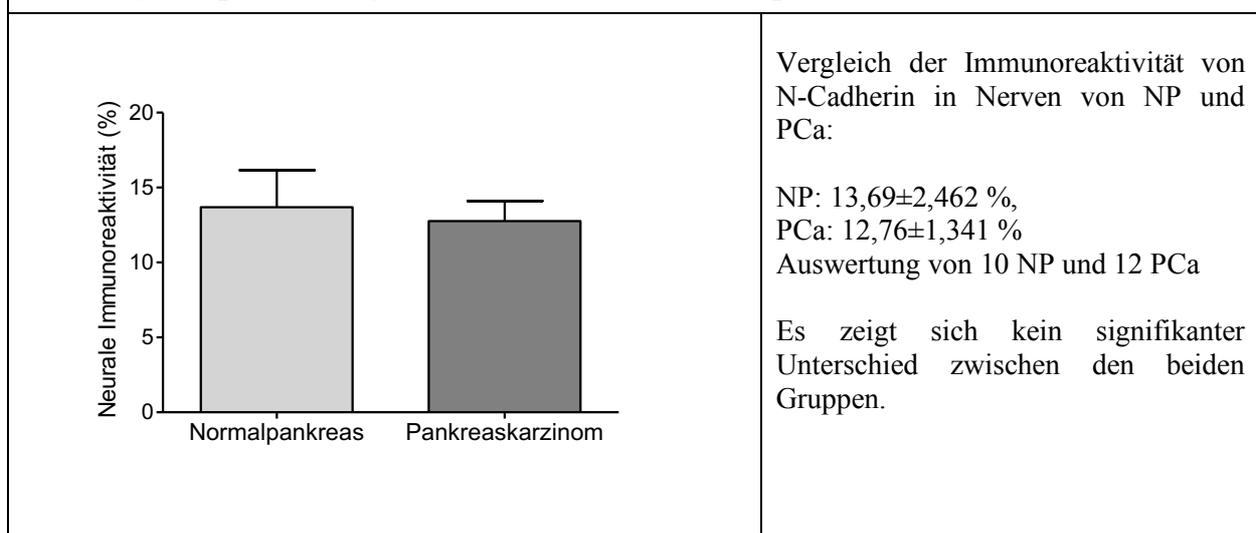


Abbildung 4: Expressionsvergleich von N-Cadherin im Normalpankreas versus Pankreaskarzinom

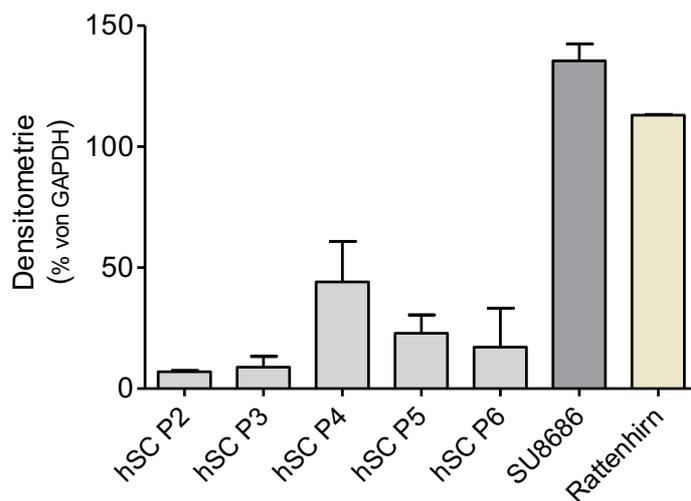


1.2 Proteinchemische Untersuchungen von N-Cadherin auf Schwannschen Zellen und Pankreaskarzinomzellen

Die funktionalen Analysen setzten eine Expression der zu untersuchenden Moleküle in den kultivierten Schwannschen Zellen sowie den Pankreaskarzinomzellen voraus. Die Expression von N-Cadherin konnte auf Protein-Ebene mittels Westernblot bestätigt werden. Wir detektierten einheitliche Banden von N-Cadherin bei 135 kDa in Lysaten von Schwannschen Zellen, SU86.86-Zellen sowie Lysaten von Rattenhirn. Die densitometrische Quantifizierung der Banden zeigte eine unterschiedlich starke Expression von N-Cadherin in den unterschiedlichen Schwann-Zell-Lysaten. Die unterschiedliche Expression war nicht gekoppelt an die Zahl der Passagierungen der primären Zellen.

Abbildung 5:

Western-Blot Analyse von N-Cadherin in Schwannschen Zellen und PCa-Zellen

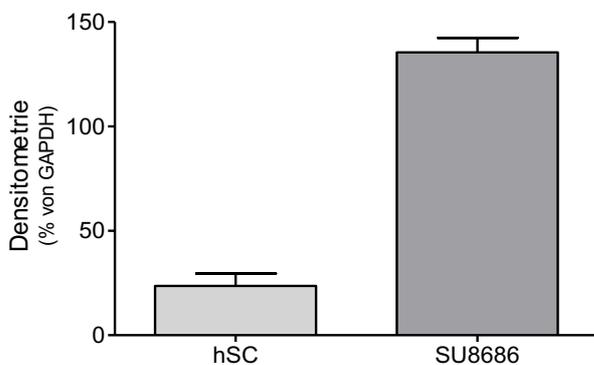


hSC verschiedener Passagen und SU86.86 exprimieren N-Cadherin auf Proteinebene, Rattenhirn diente als Positivkontrolle:

hSC P3: 8,910±4,413 %,
hSC P4: 44,13± 16,69 %,
hSC P5: 22,88± 7,616 %,
hSC P6: 17,12± 16,08 %,
SU86.86: 135,5± 6,92 %,
Rattenhirn: 113,0±0,02537 %

Abbildung 6:

Vergleich der N-Cadherin Expression auf Schwannschen Zellen und PCa-Zellen



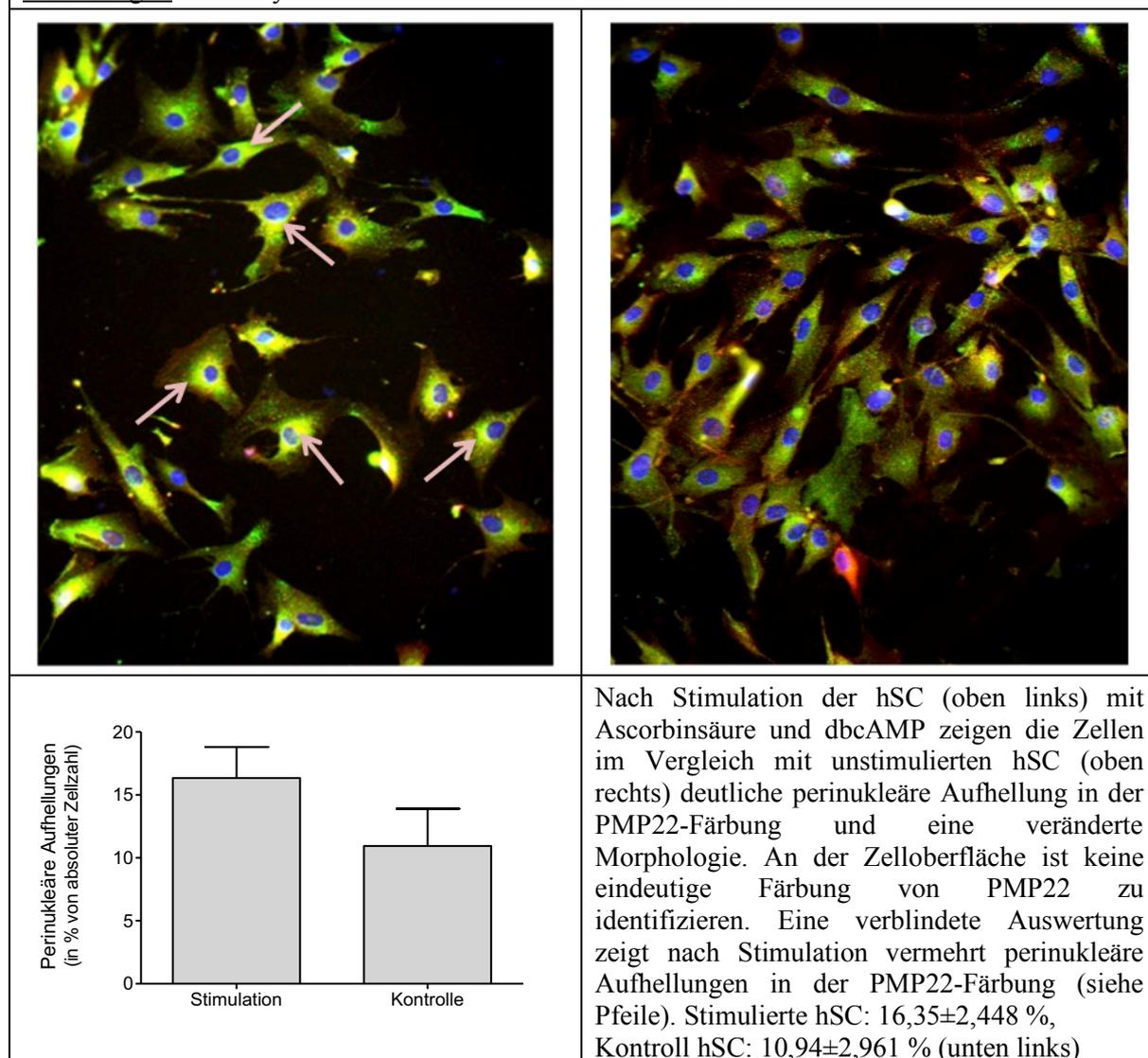
Durchschnittlich ist die N-Cadherin Expression auf Proteinebene in SU86.86-PCa-Zellen 5,7-fach höher als in hSC.

hSC: 23,67±5,918 %,
SU86.86: 135,5±6,920 %

1.3 Immunzytofluoreszenz von PMP22 auf Schwannschen Zellen

Im Westernblot war PMP22 in den Schwann-Zell-Lysaten nicht eindeutig identifizierbar. Es war schwierig zu differenzieren, ob der Grund die fehlende Expression von PMP22 in kultivierten Schwannschen Zellen war oder ob es technisch nicht funktionierte. Auch in verschiedenen Positivkontrollen wie Rattenhirn, dorsalen Wurzelganglien und humanem Nervus Ischiadicus gelang uns keine Detektion einer spezifischen Bande bei 22 kDa. In der Literatur war das abnehmende Potenzial zur Myelinbildung in kultivierten Schwannschen Zellen beschrieben. Wir stimulierten die Schwannschen Zellen mit dbcAMP und Ascorbinsäure. Eine Immunfluoreszenzfärbung von PMP22 auf fixierten Schwannschen Zellen zeigte eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz im perinukleären Kompartiment der stimulierten Schwannschen Zellen. Die Auswertung dabei erfolgte verblindet. Trotz der Annahme der erfolgreichen Stimulation erforderte die fehlende Detektion von PMP22 auf Proteinebene einen Alternativansatz für die funktionale Analyse.

Abbildung 7: Immunzytofluoreszenz von PMP22 auf Schwannschen Zellen



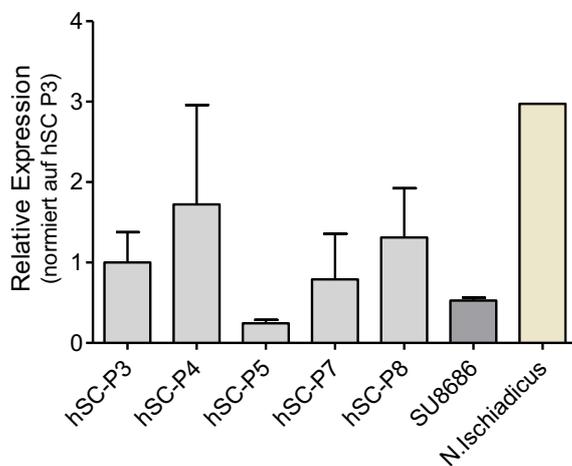
1.4 RNA-Untersuchungen von N-Cadherin und PMP22

Zur Komplementierung der Expressionsanalyse und der Quantifizierung der Expression untersuchten wir die Expression von N-Cadherin und PMP22 auf mRNA-Ebene. Schwannsche Zellen in unterschiedlichen Passagen sowie die untersuchten Karzinomzellen zeigten eine spezifische Expression der Adhäsionsmoleküle.

Als Positivkontrolle diente ein Lysat aus humanem Nervus Ischiadicus. Die Expression von N-Cadherin in der Positivkontrolle war 2,926fach höher als die Expression in den Schwannschen Zellen, während PMP22 im Nerv 411,162fach stärker exprimiert wird.

Abbildung 8:

Relative Expression von N-Cadherin in Schwannschen Zellen und PCa-Zellen

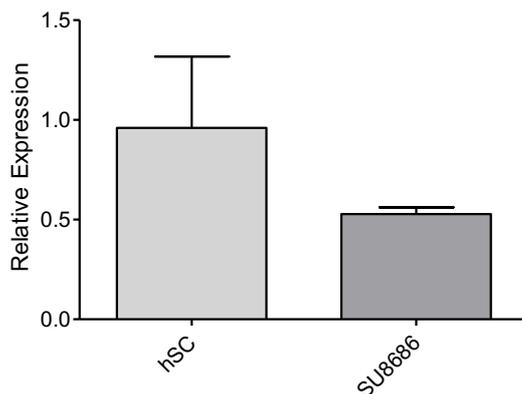


Mittels qRT-PCR wurde die Expression von N-Cadherin in den hSC und den PCa-Zellen bestätigt. Die Target/Ref-Werte wurden auf den der niedrigsten Schwanzzellpassage bezogen (hSC P3).

Humaner Nervus Ischiadicus diente dabei als Positivkontrolle.

hSC P3: $1 \pm 0,377$, hSC P4: $5,984 \pm 4,280$,
hSC P5: $0,325 \pm 0,171$, hSC P7: $0,519 \pm 0,354$,
hSC P8: $0,169 \pm 0,029$, SU86.86:
 $0,528 \pm 0,034$

Rechts: Vergleich N-Cadherin Expression in
hSC: $0,960 \pm 0,358$,
SU86.86: $0,528 \pm 0,034$

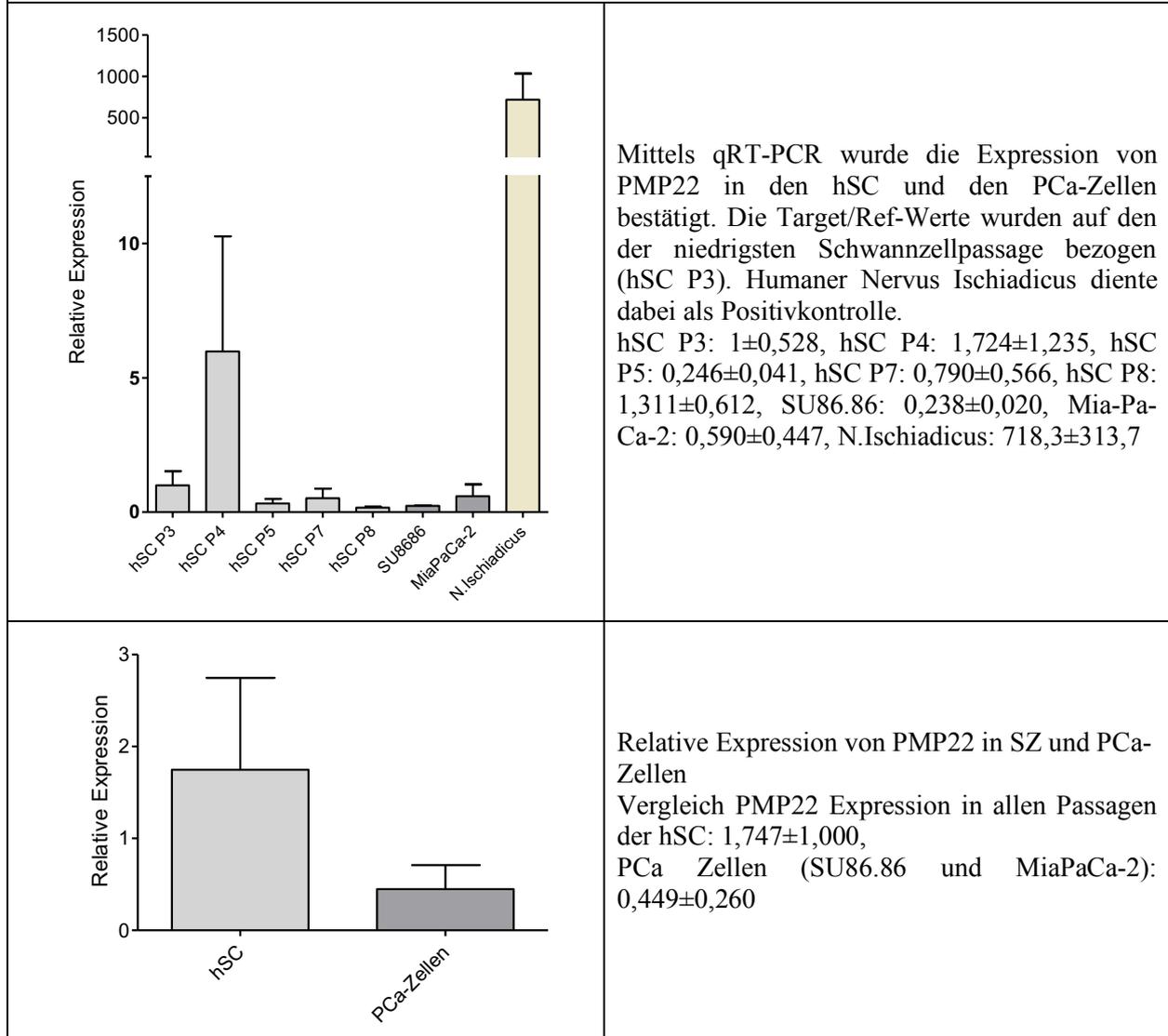


Vergleich N-Cadherin Expression in hSC:
 $0,960 \pm 0,358$,
SU86.86: $0,528 \pm 0,034$

Bekannt ist die abnehmende Fähigkeit zur Myelinisierung der Schwannschen Zellen in Kultur, die eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise niedrige PMP22 Expression sein könnte.

Abbildung 9:

Relative Expression von PMP22 in Schwannschen Zellen und PCa-Zellen

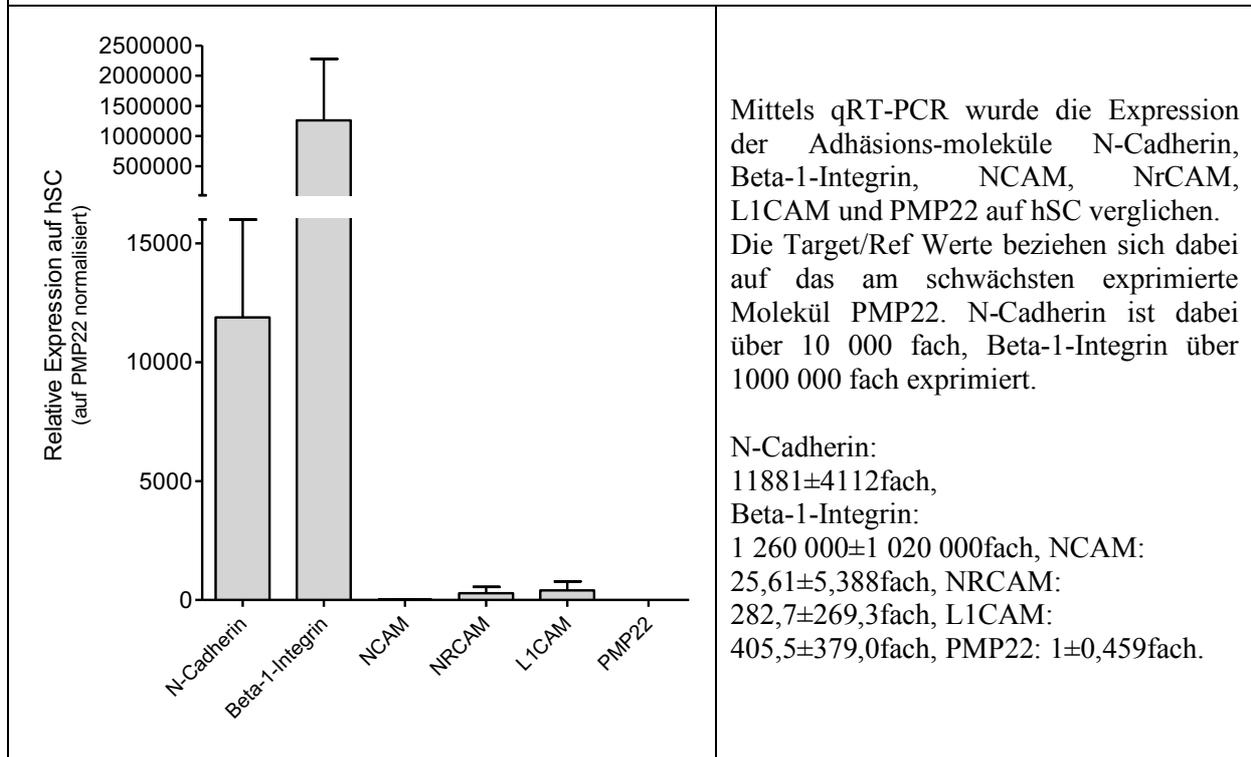


1.5 Expressionsvergleich N-Cadherin, Beta-1-Integrin, NCAM, NrCAM, L1CAM und PMP22

Der quantitative Vergleich aller in diesem Projekt untersuchten Adhäsionsmoleküle auf Schwannschen Zellen wurde mittels qRT-PCR durchgeführt.

Abbildung 10:

Expressionsvergleich aller untersuchter Adhäsionsmoleküle auf hSC



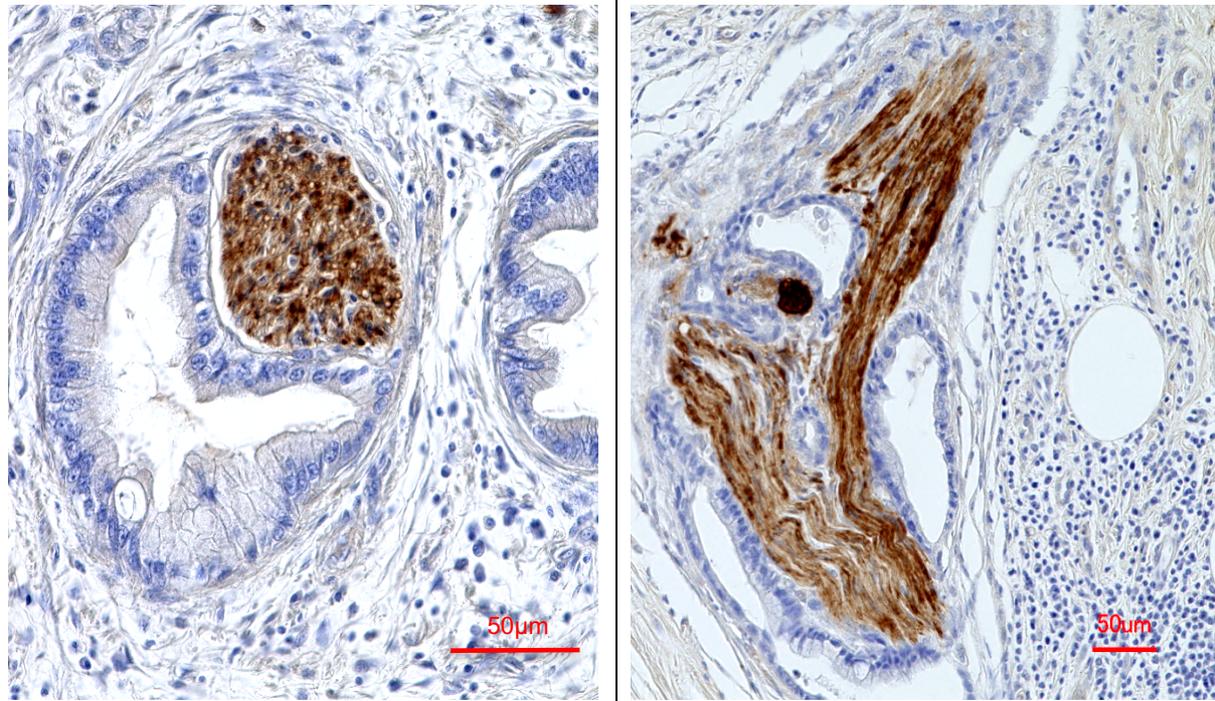
Es zeigte sich, dass Beta-1-Integrin das am stärksten exprimierte Moleküle darstellte. Auch N-Cadherin wurde im Vergleich zu den anderen Molekülen stark exprimiert. Auch auf Karzinomzellen bestätigte sich diese Tendenz.

2. Korrelation der Immunoreaktivität N-Cadherin und PMP22 mit NI im Pankreaskarzinom

Wir korrelierten die Stärke der Immunoreaktivität von N-Cadherin und PMP22 mit dem Grad der neuralen Invasion (Grad 1: perineurale Invasion, Grad 2: endoneurale Invasion).

Abbildung 11:

Perineurale und endoneurale Invasion im Pankreaskarzinom

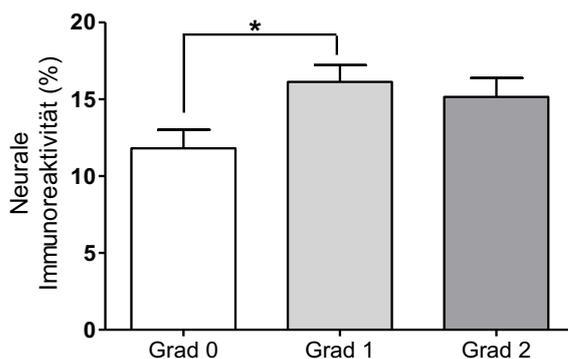


Ein Befall von Nerven, bei dem die Tumorzellen auf den Perineuralraum beschränkt blieben, erhielten den Invasionsgrad 1 (links), Nerven mit endoneuraler Invasion den Grad 2 (rechts). Skala 50 µm

2.1 N-Cadherin

Es zeigte sich, dass Nerven mit neuraler Invasion eine stärkere Immunoreaktivität für N-Cadherin aufwiesen als nicht befallene Nerven. Die durchschnittliche Färbung in Nerven mit perineuralem Befall war dabei im Vergleich zum Normalnerv signifikant erhöht.

Abbildung 12: Vergleich der Immunoreaktivität von N-Cadherin in unterschiedlich stark von Pankreaskarzinomzellen befallenen Nerven



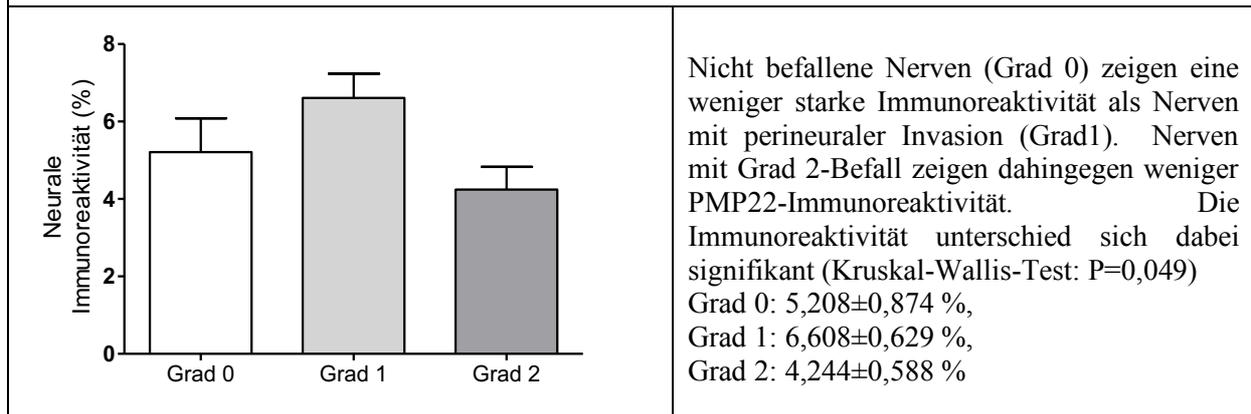
Nicht befallene Nerven (Score 0) zeigen eine weniger starke Immunoreaktivität für N-Cadherin als Nerven mit perineuralem (Score 1) und endoneuralem Befall (Score 2). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Nerven mit Grad 0 und Nerven mit Grad 1. (Bonferroni-Test: P=0,0303)

Grad 0: 11,8±1,209 %,
 Grad 1: 16,14±1,087 %,
 Grad 2: 15,15±1,229 %

2.2 PMP22

Auch für PMP22 zeigte sich eine unterschiedlich ausgeprägte Immunoreaktivität in Abhängigkeit vom Grad der Invasion. Nerven mit perineuraler Invasion wiesen eine stärkere Färbung als nicht befallene Nerven auf, während Nerven mit endoneuraler Invasion weniger stark gefärbt waren.

Abbildung 13: Vergleich der Immunoreaktivität von PMP22 in unterschiedlich stark von Pankreaskarzinomzellen befallenen Nerven



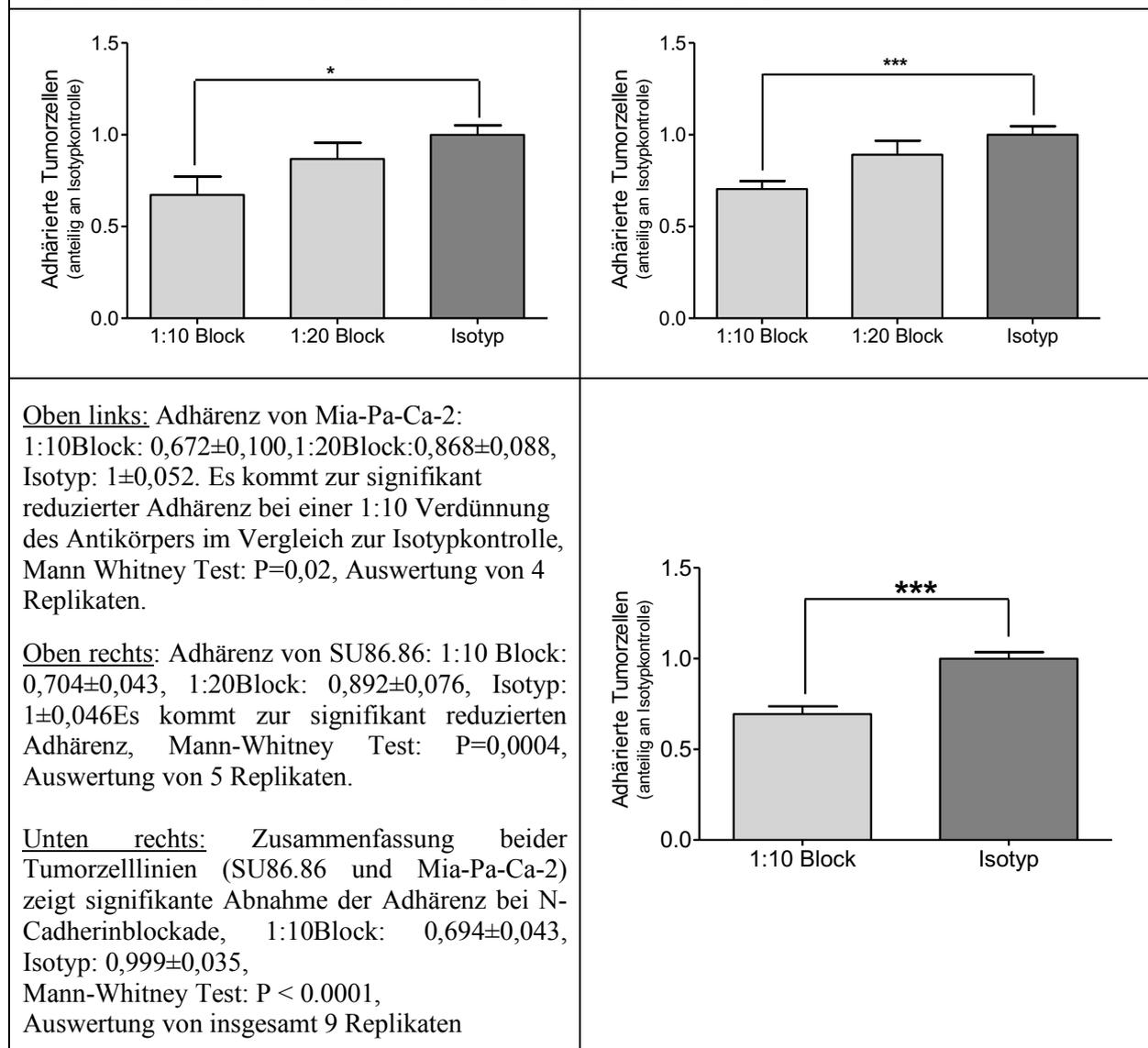
3. Funktionale Analysen von N-Cadherin und PMP22 in der SZ-PCa-Zell-Adhäsion

3.1 Rolle von N-Cadherin für die Schwann-Zell-Tumorzell-Adhäsion

Im Adhäsionsassay wurde die Rolle von N-Cadherin für die Adhäsion zwischen Schwannschen Zellen und Tumorzellen untersucht. Dabei verwendeten wir drei Ansätze; antikörpervermittelt blockierten wir N-Cadherin 1) auf Schwannschen Zellen, 2) auf Pankreaskarzinomzellen, 3) auf beiden Zelltypen. Wir blockierten die Zellen jeweils mit verschiedenen Antikörperverdünnungen. Der prozentuale Anteil der adhärennten Tumorzellen wurde miteinander verglichen. Die Blockade von N-Cadherin auf Schwann-Zellen führte zu einer signifikant niedrigeren Adhäsion der Tumorzellen an die hSC. Die Reduktion der Adhäsion war dabei umso stärker, je höher die Antikörperkonzentration der Blockade war.

Abbildung 14:

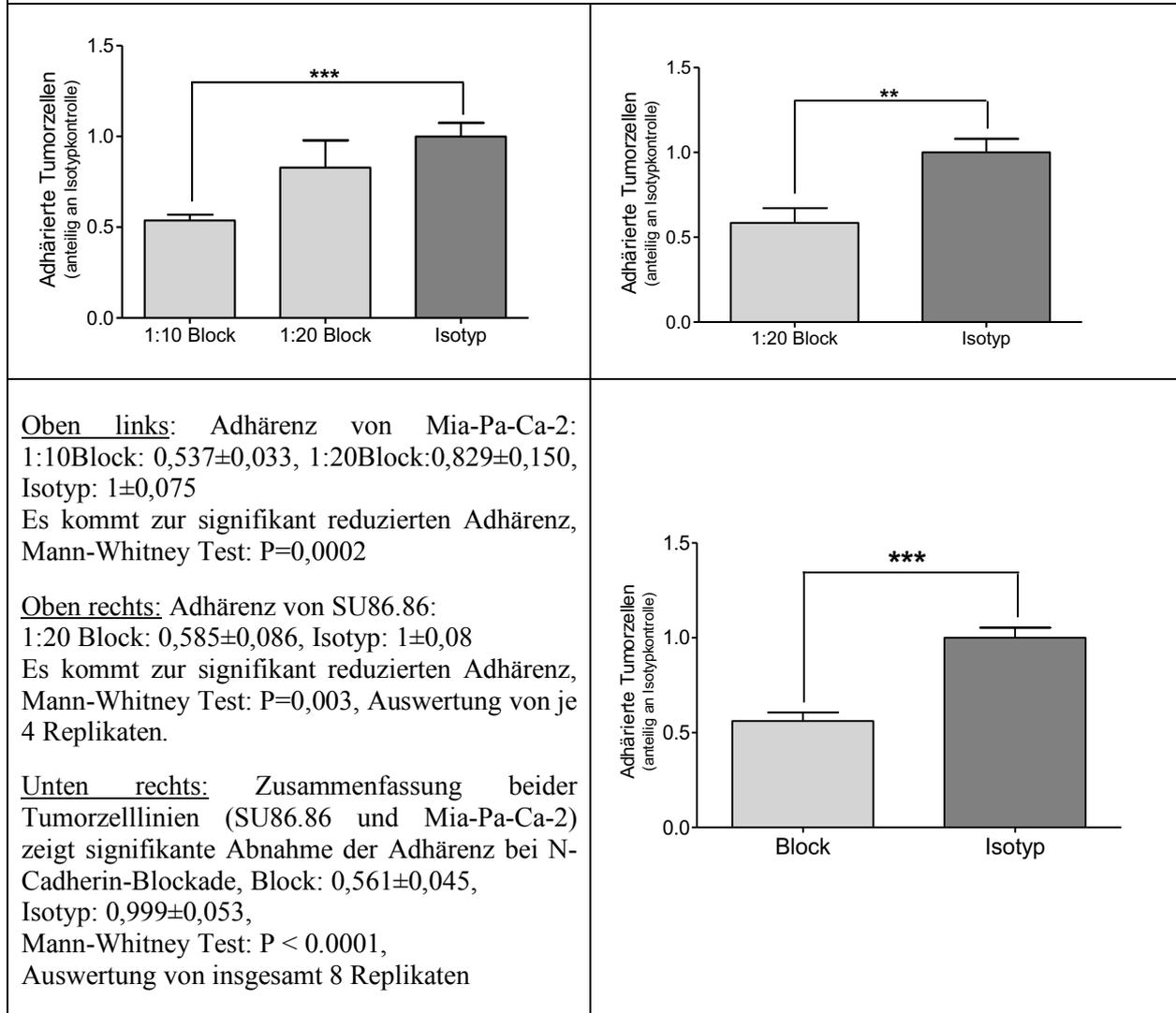
Tumorzelladhäsion bei Blockade von N-Cadherin auf Schwann-Zellen



Nach N-Cadherin-Blockade auf Pankreaskarzinomzellen (auf Mia-Pa-Ca-2 und SU86.86) kam es ebenfalls zu einer verminderten Anheftung.

Abbildung 15:

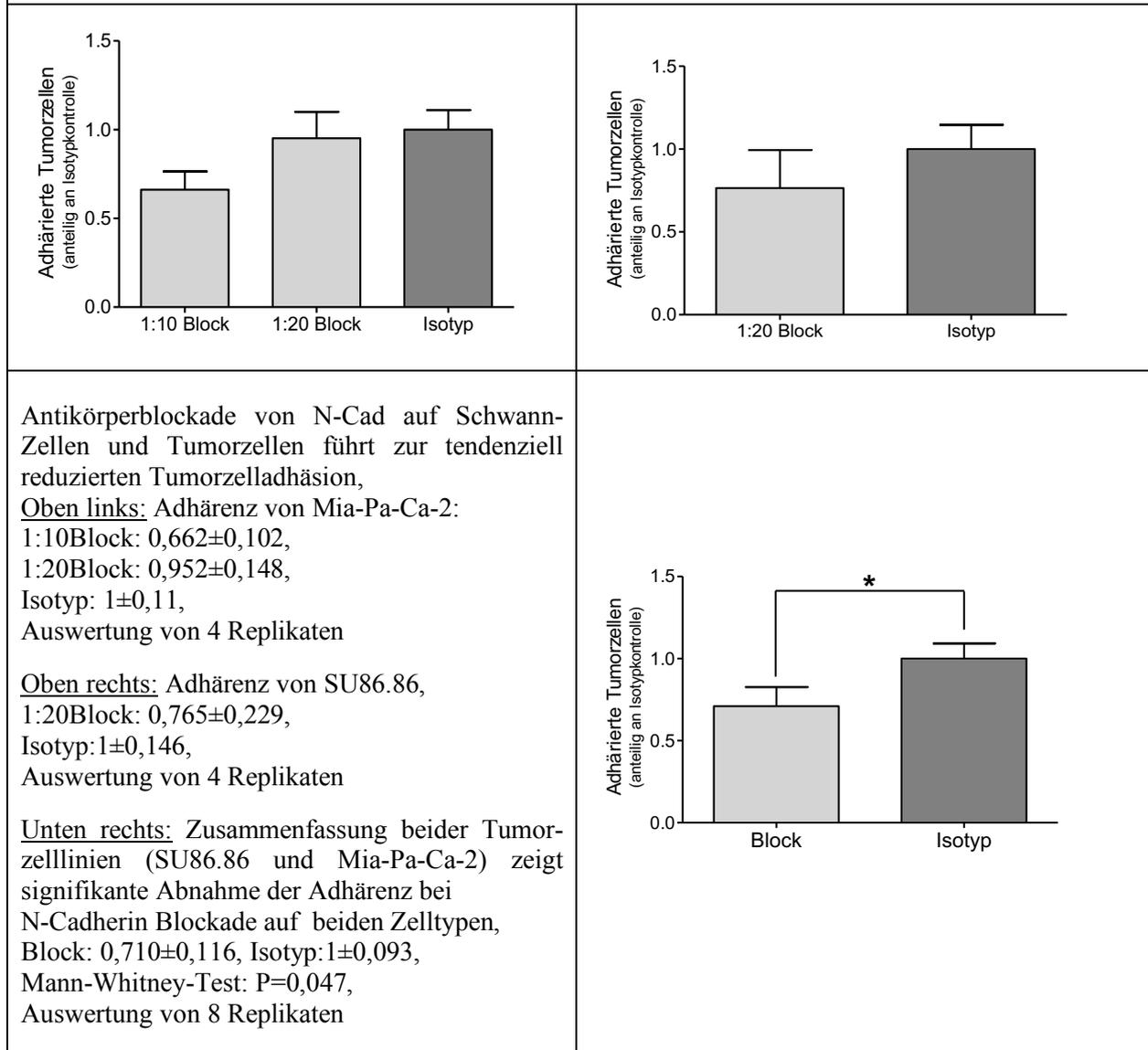
Tumorzelladhäsion bei Blockade von N-Cadherin auf Tumorzellen



Blockierten wir hSC und PCa-Zellen deutete sich bei einer hohen Antikörperkonzentration der gleiche Effekt an. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass N-Cadherin die spezifische Adhäsion von PCa-Zellen an hSC sowohl auf hSC als auch auf Tumorzellen mit zu vermitteln scheint.

Abbildung 16:

Tumorzelladhäsion bei Blockade von N-Cadherin auf Schwann-Zellen und Tumorzellen

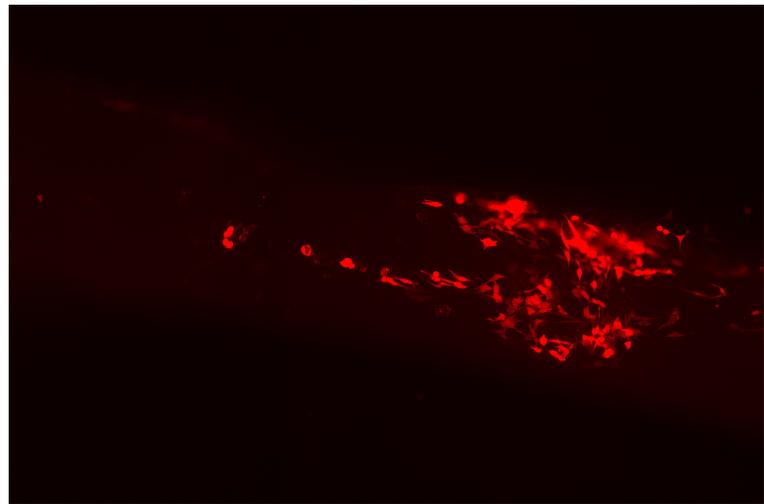


3.2 Rolle der Myelinisierung für die neurale Invasion im Pankreaskarzinom

Die Fragestellung, ob die Myelinscheide eine potentielle Adhäsionsstruktur für Pankreaskarzinomzellen darstellt, versuchten wir durch einen eigens etablierten ex vivo Invasions-Assay zu beantworten.

Indirekt sollte dabei die Relevanz des analysierten Myelin-spezifischen Moleküls PMP22 für die neurale Invasion überprüft werden. Eine funktionale Analyse mittels Adhäsions-Assays hielten wir für fraglich, da wir PMP22 nur perinukleär in hSC nachweisen konnten, und im Westernblot und vor allem aber an der Zelloberfläche nicht detektieren konnten. Die in den Nervus Ischiadicus injizierten fluoreszierenden Tumorzellen wurden über einen Zeitraum von 24 h bei ihrer Migration innerhalb des Nervens verfolgt.

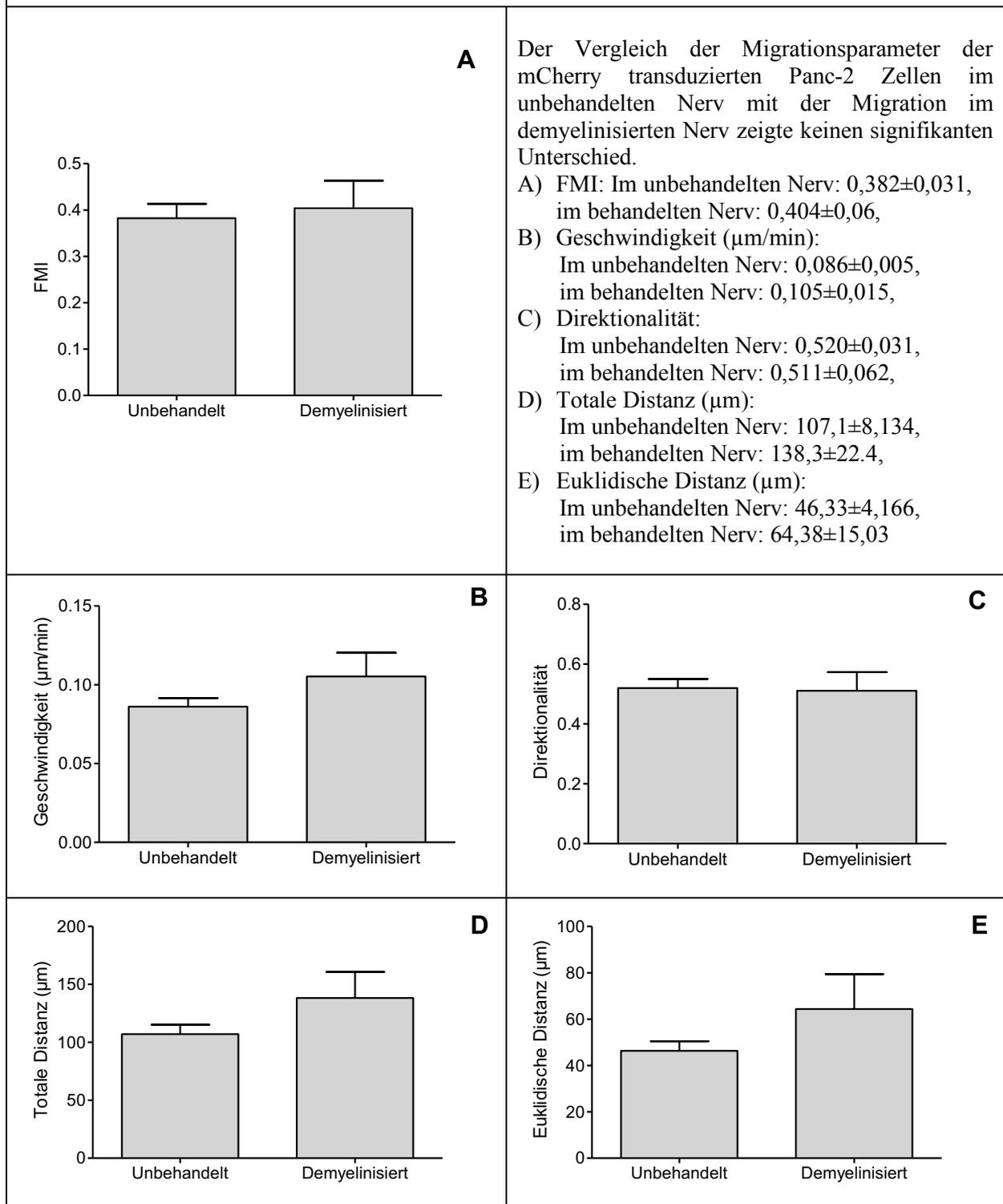
Abbildung 17: Eigens etablierter ex vivo Nerveninvasionsassay



Der Nervus Ischiadicus von euthanasierten Ratten wurde freipräpariert und angeschlungen, sodass die fluoreszierenden mCherry transduzierten Panc-2-Zellen injiziert werden konnten (links). Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte die Bewegung der Tumorzellen beobachtet werden (rechts).

Es wurde der Migrationindex, die Geschwindigkeit und die zurückgelegten Distanzen im demyelinisierten und im gut myelinisierten, unbehandelten Nerven erfasst und miteinander verglichen. Es konnte bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Abbildung 18: Ergebnisse des ex vivo Nerveninvasionassay



4. Die Rolle von N-Cadherin für die tumorzell-gerichtete Migration der Schwannschen Zellen

4.1 Überprüfung der Spezifität der Schwann-Zell-Migration

In unserem 3D-in-vitro-Migrationsassay wurden die Schwann-Zell-gerichtete Migration der Pankreaskarzinomzellen analysiert. Verglichen mit den Tumorzellen zeigten die Schwannschen Zellen in vitro eine gerichtete und früher einsetzende Migrationsbewegung.

In Voruntersuchungen wurde die spezifische Migration der Schwannschen Zellen zu Pankreaskarzinomzellen bestätigt. Dabei wurde die Schwann-Zell-Migration zu T3M4-Pankreaskarzinomzellen mit der Migration zu nicht malignen BJ-Fibroblasten und zu leerem ECM-Gel verglichen. Die Migrationsgeschwindigkeit (hSC-T3M4: $0,070 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-BJ: $0,060 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LEER: $0,050 \pm 0,003 \mu\text{m}/\text{min}$), die euklidische Strecke (hSC-T3M4: $69,80 \pm 2,347 \mu\text{m}$, hSC-BJ: $52,57 \pm 2,423 \mu\text{m}$, hSC-LEER: $45,35 \pm 2,705 \mu\text{m}$) sowie der Forward Migration Index (FMI) (hSC-T3M4: $0,595 \pm 0,021$, hSC-BJ: $0,422 \pm 0,027$, hSC-LEER: $0,363 \pm 0,024$) zeigten sich bei der tumorzellgerichteten Migration signifikant höher. Daraufhin sollte untersucht werden, inwieweit die Migration spezifisch zu Karzinomzellen des Pankreas stattfindet im Vergleich zu anderen malignen Zellen. Die Migration der Schwann-Zellen zu T3M4-Pankreaskarzinomzellen wurde mit der zu DLD-1-Kolonkarzinomzellen verglichen. Auch hier bestätigte sich eine signifikant erhöhte Migrationsgeschwindigkeit (Geschwindigkeit: hSC-T3M4: $0,056 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-DLD-1: $0,0465 \pm 0,001 \mu\text{m}/\text{min}$, hSC-LEER: $0,048 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$) und euklidische Strecke (Strecke: hSC-T3M4: $49,37 \pm 1,860 \mu\text{m}$, hSC-DLD-1: $36,61 \pm 1,309 \mu\text{m}$, hSC-LEER: $0,048 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{min}$) in Richtung der T3M4-Zellen. Der FMI zu beiden malignen Zelllinien war im Vergleich zur Migration zu leerem ECM erhöht. Der Vergleich des FMI der beiden Karzinomzellen zeigte keine statistische Signifikanz (FMI: hSC-T3M4: $0,592 \pm 0,021$, hSC-DLD-1: $0,537 \pm 0,024$, hSC-LEER: $0,372 \pm 0,026$). Zusammenfassend zeigten die Voruntersuchungen eine spezifische Schwann-Zell-Migration zu Pankreaskarzinomzellen verglichen mit der Migration zu nicht malignen Zellen sowie zu anderen gastrointestinalen Tumorzellen.

4.2 Einfluss von N-Cadherin auf die Schwann-Zell-Migration

Im Adhäsionsassay hatten wir die Relevanz von N-Cadherin auf die spezifische Adhäsion zwischen Schwannschen Zellen und Pankreaskarzinomzellen festgestellt. Dies veranlasste uns zur Analyse der Rolle von N-Cadherin für die Migration der Schwannschen Zellen.

4.2.1 Einfluss von N-Cadherin auf Schwannschen Zellen auf die SZ- Migration

Wir blockierten N-Cadherin antikörpervermittelt auf Schwannschen Zellen und verglichen die tumorzellgerichtete Migration blockierter Schwann-Zellen mit der in Richtung einer unbehandelten und einer Isotypkontrolle. Es zeigte sich, dass die N-Cadherin-blockierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Schwann-Zellen einen signifikant erniedrigten FMI aufwiesen. Der FMI gilt als der sensitivste Parameter für die Erfassung der Migration.

Abbildung 19: Einfluss der N-Cadherin-Blockade auf den Forward Migration Index der tumorzellgerichteten Schwann-Zell-Migration

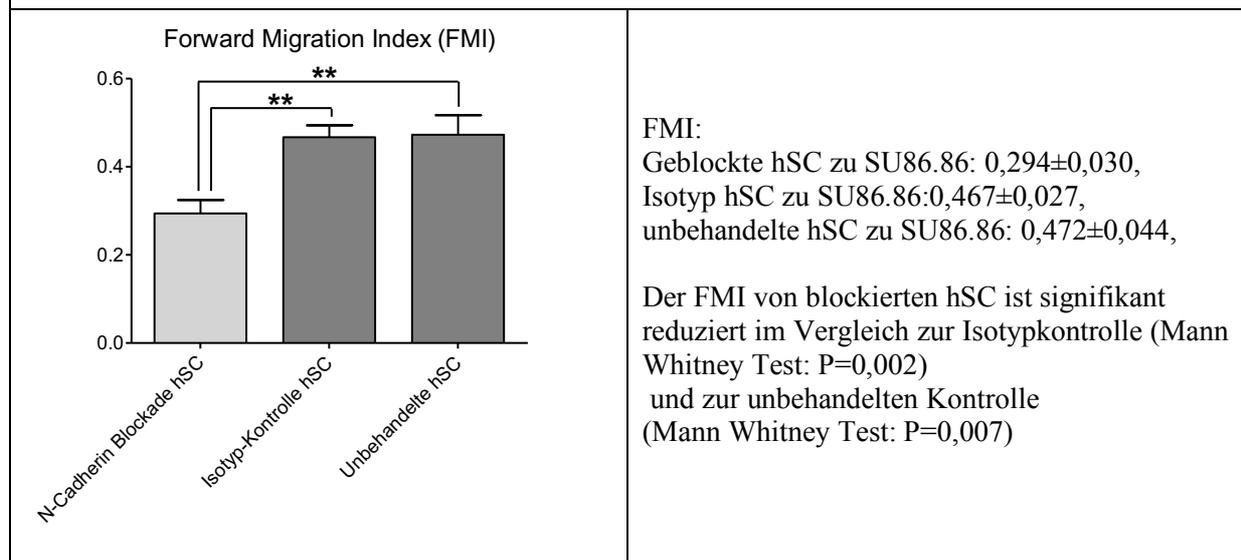
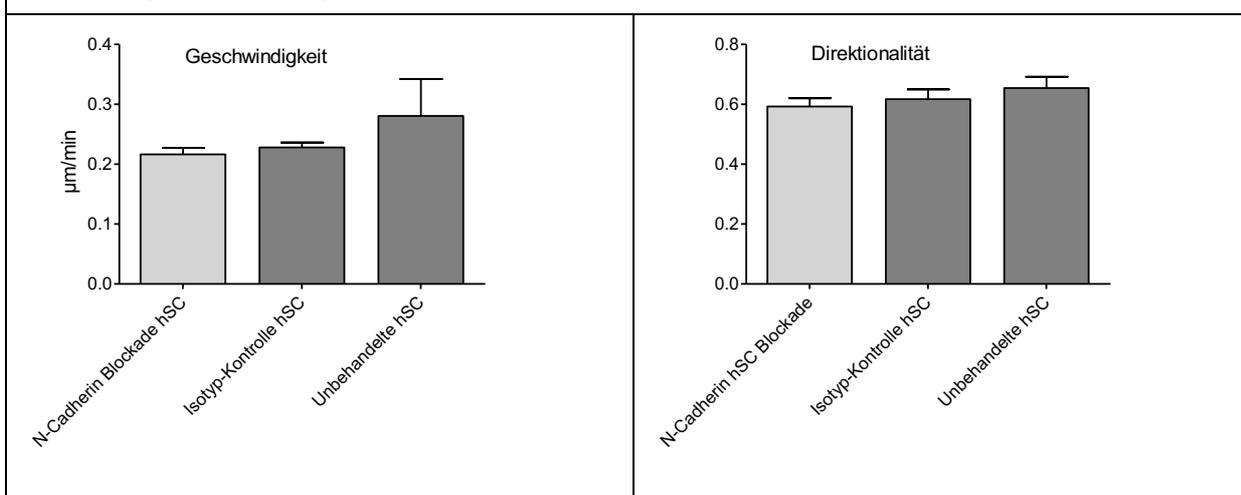


Abbildung 20a: Einfluss der N-Cadherin-Blockade auf Geschwindigkeit und Direktionalität der tumorzellgerichteten Migration der Schwannschen Zellen

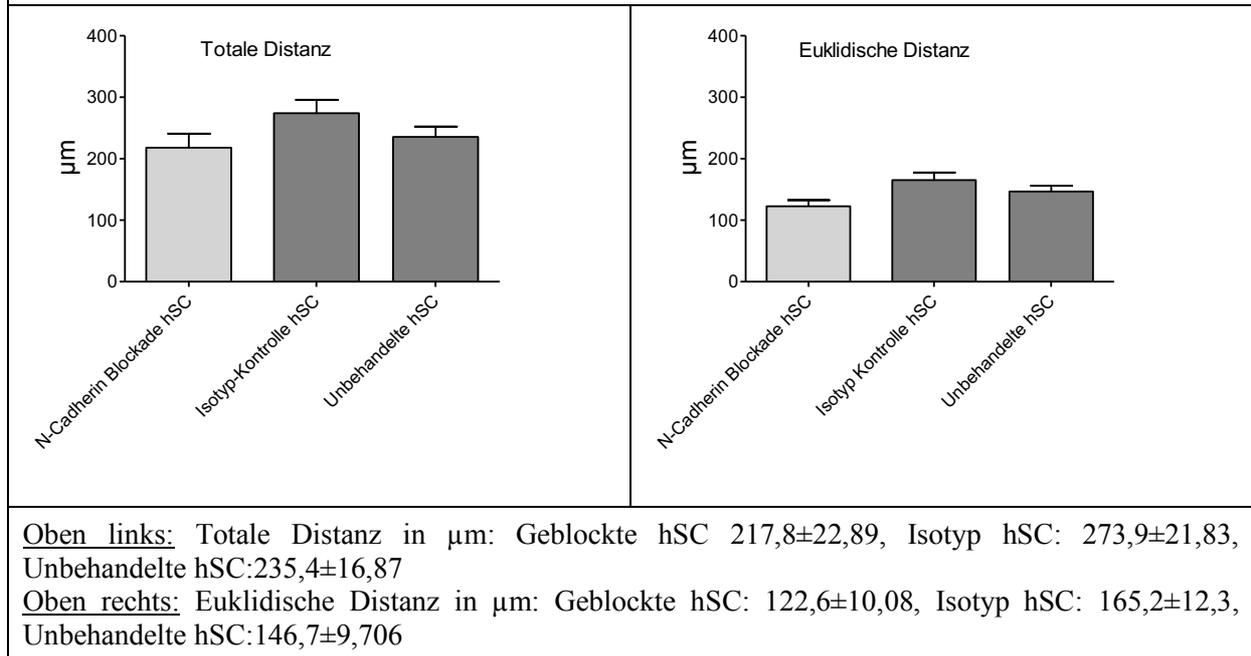


Oben links: Geschwindigkeit in µm/min: Geblockte hSC: 0,216±0,011, Isotyp hSC: 0,228±0,008, Unbehandelte hSC: 0,281±0,062.

Die unbehandelten Zellen zeigen dabei die größte Migrationsgeschwindigkeit.

Oben rechts: Direktionalität: geblockte hSC: 0,593±0,027, Isotyp hSC: 0,618±0,033, Unbehandelte hSC: 0,654±0,038

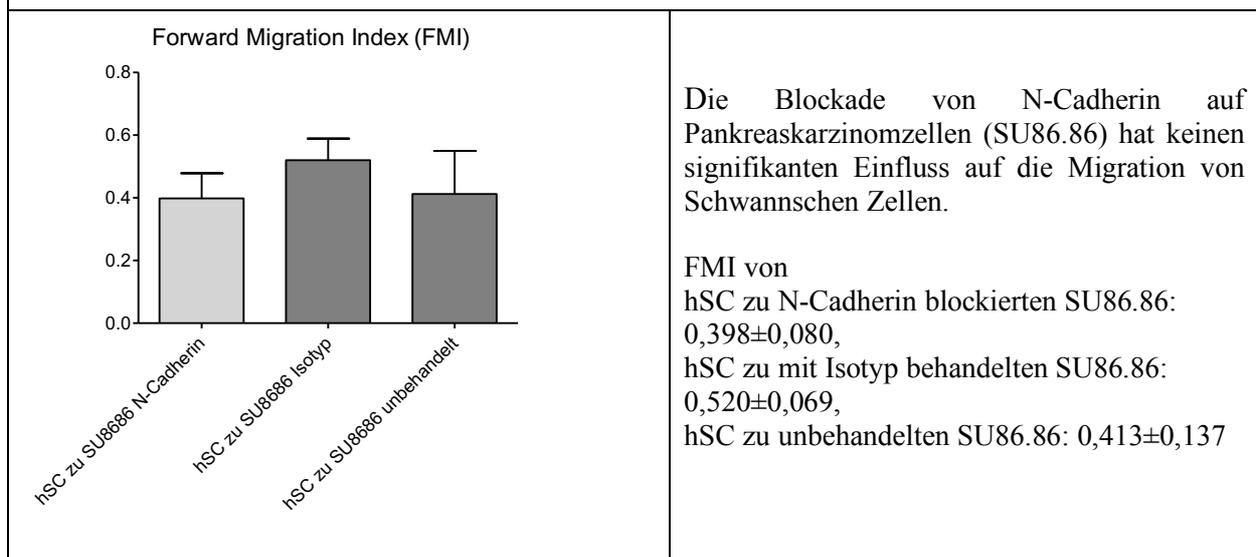
Abbildung 20b: Einfluss der N-Cadherin-Blockade auf totale- und euklidische Distanz der tumorzell-gerichteten Migration der Schwannschen Zellen



4.2.2 Einfluss von N-Cadherin auf Pankreaskarzinomzellen auf die SZ- Migration

Um einen möglichen parakrinen Effekt von N-Cadherin auf die Schwann-Zell-Migration zu erfassen, blockierten wir dieses auf SU86.86-Pankreaskarzinomzellen und verglichen die Migration der Schwann-Zell zu blockierten versus nicht blockierter Tumorzellen. Es zeigte sich dabei eine Tendenz zu verminderter Migration, diese war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 21: Einfluss der N-Cadherin-Blockade auf Pca auf die tumorzell-gerichtete SZ-Migration



V. Diskussion

In fast 100 % der Pankreaskarzinome kommt es zur neuralen Invasion (Liu and Lu 2002, Liebl, Demir et al. 2014). Ein Befall der Nerven durch Tumorzellen kann ohne eine unmittelbare Adhärenz dieser an neurale Strukturen nicht stattfinden. Als einen möglichen Schritt dabei erachten wir die Adhäsion zwischen den Schwannschen Zellen als Gliazellen des peripheren Nervensystems und den Pankreaskarzinomzellen. In einem größeren Forschungsprojekt sollte diese Interaktion im Rahmen der neuralen Invasion untersucht und vermittelnde Moleküle identifiziert werden.

Den Schwannschen Zellen wurde bei der Erforschung des Mechanismus der neuralen Invasion bislang nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei sind die Schwannschen Zellen die Zellen, mit denen die Tumorzellen bei der im Pankreaskarzinom typischen endoneuralen Invasion (Bockman, Buchler et al. 1994) vor Erreichen der Axone in Kontakt kommen. Swanson et al. untersuchten erstmals diesen Aspekt und zeigten eine spezifische Anheftung von Pankreaskarzinomzellen an Schwannsche Zellen. Sie zeigten, dass diese über das transmembranöse Mucin MUC1 auf Karzinomzellen und MAG auf Schwann-Zellen vermittelt wird und beide Moleküle immunhistochemisch in intrapankreatischen Nerven mit Tumorzellinvasion nachweisbar sind (Swanson, McDermott et al. 2007). In unseren noch nicht publizierten Voruntersuchungen identifizierten wir Beta-1-Integrin und L1CAM als zwei weitere, diese Adhäsion vermittelnde Moleküle auf Pankreaskarzinomzellen. Aus der nicht vollständig aufgehobenen Adhäsion zwischen Schwann- und Tumorzellen nach antikörpervermittelter Blockade von MAG (Swanson, McDermott et al. 2007) kann man von noch anderen relevanten Adhäsionsmolekülen auf Schwannschen Zellen ausgehen, die es zu identifizieren gilt.

Die in der Arbeit untersuchte Adhäsion zwischen Schwann-Zellen und Pankreaskarzinomzellen war unter zwei Gesichtspunkten interessant: Zum einen unter Annahme der Adhäsion der Tumorzellen an die Gliazellen im Rahmen der endoneuralen Invasion, zum anderen betrachteten wir die Zell-Zell-Interaktion auch unter Annahme der von uns vermuteten primär aktiven Rolle der Schwann-Zellen in der neuralen Invasion. Schwannsche Zellen wurden unabhängig von neuralen Strukturen in PanIN Läsionen und Tumorzellklustern gefunden (Demir, Boldis et al. 2014). Auch hier kann es zu einer Adhäsion zwischen Schwann- und Tumorzellen kommen, wofür die gleichen Moleküle verantwortlich sein können wie die der endoneuralen Invasion. Unter diesem Aspekt der primären Migration

der Zellen war es interessant vor allem die tumorzellgerichtete Migration der Schwannschen Zellen näher zu charakterisieren und die potentiell vermittelnden Moleküle zu identifizieren. Um mögliche Moleküle zu untersuchen, war es hilfreich zu wissen, welche Art von Nerven bevorzugt neurale Invasion aufweist. In immunhistochemischen Voruntersuchungen von Neurofilament H, einem Marker für myelinisierte Nervenfasern (Magnussen, Hung et al. 2015) stellten wir in myelinisierten Nerven einen signifikant häufigeren Tumorzellbefall fest als in nicht myelinisierten Nerven. Diese Feststellung sowie die Tatsache, dass MAG ebenfalls ein myelinassoziertes Molekül ist, bewog uns zur Untersuchung von Adhäsionsmolekülen auf myelinisierenden Schwann-Zellen. MAG wurde bereits untersucht. P0, das bis 50 % der Myelinproteine ausmacht, war in verschiedenen Methoden durch technische Probleme nicht detektierbar, sodass wir uns auf die Untersuchung von PMP22 als myelinspezifisches Adhäsionsmolekül fokussierten (Snipes and Suter 1995). Auf der anderen Seite zeigte die immunhistochemische Voruntersuchung von Neurofilament H eine Abnahme myelinisierter Nervenfasern im Pankreaskarzinom verglichen mit Nerven des Normalpankreas. Zwar scheinen Pankreaskarzinomzellen häufiger myelinisierte Nerven zu befallen, dagegen überwiegen quantitativ die nicht myelinisierten Nerven. Dies veranlasste uns zur gleichzeitigen Überprüfung von nicht myelinspezifischen Adhäsionsmolekülen. In Voruntersuchungen wurden bereits L1CAM, Beta-1-Integrin, NCAM und NrCAM analysiert, welche alle als mögliche Adhäsionsstellen in intrapankreatischen Nerven und in kultivierten Schwann-Zellen vorhanden waren. Keines der Moleküle spielte auf den Gliazellen eine Rolle für deren Anheftung an Pankreaskarzinomzellen. Es sollte nun die Relevanz von N-Cadherin überprüft werden.

Die Expression von N-Cadherin steigert die Motilität und Migration von Zellen (Derycke and Bracke 2004). Pankreaskarzinomzellen zeigen häufig eine Expression von N-Cadherin, und interessanterweise zeigt sich diese häufiger in Pankreaskarzinomzellen von Lebermetastasen als in Zellen des Primärtumors. Dies verdeutlicht die Rolle von N-Cadherin für die epithelial-mesenchymale Transition und die Erlangung eines invasiveren Verhaltens (Nakajima, Doi et al. 2004). Cadherine gehen hauptsächlich homophile Bindungen ein (Gumbiner 2005), sodass N-Cadherin auf Schwannschen Zellen einen potentiellen Bindungspartner für Tumorzellen darstellen könnte. Ausnahmefälle der normalen homophilen Bindungen der Cadherine wie beispielsweise die Bindung zwischen E-Cadherin und $\alpha E\beta 7$ -Integrin (Higgins, Mandlebrot et al. 1998) lassen N-Cadherin auf Schwannschen Zellen auch als Bindungspartner von MUC1, Beta-1-Integrin und L1CAM möglich erscheinen.

Die deutliche Immunoreaktivität von N-Cadherin und PMP22 in intrapancreatischen Nerven zeigte, dass diese Moleküle eine potentielle Adhäsionsstruktur für Karzinomzellen darstellen. Interessant war die deutliche Immunoreaktivität beider Moleküle auch in Karzinomzellen.

Die immunhistochemische Färbung von PMP22 bestätigte die Beobachtung der signifikanten Abnahme der myelinisierten Fasern im Pankreaskarzinom. Es kommt bei der neuralen Invasion zur Infiltration endoneuraler Strukturen, sodass eine teilweise Zerstörung der Schwann-Zellen und der Myelinscheide die Abnahme des myelinspezifischen Moleküls erklären könnte. Das für das Pankreaskarzinom charakteristische "neuronal remodelling" beinhaltet eine erhöhte neuronale Dichte sowie eine neurale Hypertrophie (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Einer erhöhten neuronalen Dichte muss zwangsläufig eine Neubildung von Nervenfasern vorausgehen. Die abnehmende Immunoreaktivität von PMP22 in intrapancreatischen Nerven könnte auch von einer noch nicht abgeschlossenen Myelinisierung neugebildeter Nervenfasern herrühren.

Interessant ist der mögliche Zusammenhang mit der neuralen Hypertrophie und der erhöhten neuronalen Dichte; eine Überexpression von PMP22 zeigte in Mausversuchen einen proapoptischen Effekt auf Motoneurone (Nattkamper, Halfter et al. 2009). Kommt es zu einer verminderten Expression von PMP22 in intrapancreatischen Nerven des Pankreaskarzinoms, fällt möglicherweise ein auf Neurone hemmender Einfluss weg, sodass das neurale Remodelling begünstigt werden könnte. Für N-Cadherin konnte kein Unterschied in der Neuroimmunoreaktivität im Normalpankreas versus der im Pankreaskarzinom festgestellt werden. Die Verwendung konsekutiver Schnitte gleicher Patienten erlaubte uns einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Myelinisierungsgrad von Nerven und der Expression von N-Cadherin zu ziehen. Die vergleichsweise niedrige Expression von N-Cadherin in myelinisierten im Vergleich zu nicht myelinisierten Nervenfasern sowie eine Abnahme der Expression bei Einsetzen der Myelinisierung in in vitro kultivierten Schwann-Zellen war vorbeschrieben (Corell, Wicher et al. 2010). Die abnehmende neurale Immunoreaktivität von PMP22 sowie die gleichbleibende neurale Immunoreaktivität von N-Cadherin im Pankreaskarzinom bestätigten diesen Zusammenhang nicht.

Der Nachweis von N-Cadherin auf Protein- sowie RNA-Ebene gelang uns in Schwannschen Zellen unterschiedlicher Passagen und Pankreaskarzinomzellen. Die Expression des Moleküls in diesen Zellen war Voraussetzung für die Durchführbarkeit der funktionalen Analysen. Im Expressionsvergleich aller untersuchter Adhäsionsmoleküle mittels quantitativer PCR konnten wir bezogen auf die Expression von PMP22 eine über 10 000-fache Expression von N-Cadherin sowie eine über 150 000-fache Expression von Beta-1-Integrin in Schwannschen

Zellen feststellen. N-Cadherin stellt also durchaus eine potente Adhäsionsstruktur für Tumorzellen dar. Die Annahme der potentiellen Vermittlung der Adhäsion mittels Beta-1-Integrin auf Schwannschen Zellen bestätigte sich trotz der starken Expression nicht.

Die Korrelation der neuralen Immunoreaktivität von N-Cadherin mit dem Grad der neuralen Invasion zeigte eine stärkere Färbung in Nerven mit perineuralem Befall. Nerven mit viel N-Cadherin als potentieller Adhäsionsstruktur scheinen ein bevorzugtes Target für Pankreaskarzinomzellen darzustellen. Eine andere Erklärung wäre die Hochregulation der Expression von N-Cadherin in neuralen Strukturen inklusive der Schwannschen Zellen durch den Kontakt mit Tumorzellen. Die leichte Abnahme der neuralen Immunoreaktivität in Nerven mit endoneuralem Befall im Vergleich zu nur perineural befallenen Nerven könnte durch die endoneurale Schädigung verursacht werden. Daraus ist nicht unmittelbar auf eine weniger starke Expression von N-Cadherin in diesen Nerven zu schließen.

Die Relevanz von N-Cadherin für die heterotype Schwann-Tumor-Zell-Adhäsion wurde in unserem 3D-Adhäsionsassay bestimmt. Dabei war N-Cadherin als mögliches vermittelndes Molekül nicht nur auf Schwannschen Zellen, sondern auch auf Pankreaskarzinomzellen äußerst interessant. Für die Erlangung eines invasiven und metastasierenden Phänotyps von Karzinomzellen sind Adhäsionsmoleküle von außerordentlicher Wichtigkeit. Der Cadherin-Switch mit einer abnehmenden Expression von E-Cadherin und einer zunehmenden oder de-novo-Expression von N-Cadherin spielt eine wichtige Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition, die vielen Tumorzellen zu einem motileren und aggressiveren Verhalten verhilft (Wheelock, Shintani et al. 2008). Pankreaskarzinome mit neuraler Invasion zeigten eine stärkere Immunoreaktivität für N-Cadherin als Tumore mit fehlender neuraler Invasion (Nakajima, Doi et al. 2004). In unserem Adhäsionsassay kam es nach antikörpervermittelter Blockade von N-Cadherin auf zwei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien zu einer jeweils signifikanten Abnahme der Adhärenz an Schwannsche Zellen. Gleichen Effekt erreichten wir durch die Blockade von N-Cadherin auf den Gliazellen. Der von Nakajima et al. beobachtete Effekt der häufigeren neuralen Invasion bei höherem Expressionsgrad von N-Cadherin auf Tumorzellen sowie unsere Beobachtung der stärkeren Immunoreaktivität von N-Cadherin in befallenen Nerven könnte durch eine homophile N-Cadherin-Bindung zwischen Pankreaskarzinomzellen und Schwannschen Zellen zu erklären sein.

Neben der Förderung der Zellmotilität und der Migration wird N-Cadherin über die Aktivierung des antiapoptotischen Akt/PKB Signalwegs ein positiver Effekt auf das Zellwachstum und das Zellüberleben zugeschrieben (Li, Satyamoorthy et al. 2001). Die

homophile Interaktion über N-Cadherin zwischen Schwann- und Pankreaskarzinomzellen könnte im Rahmen der neuralen Invasion einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen mit sich bringen. Es gilt die Signalkaskade in dieser Zellverbindung zu überprüfen.

Aus der ermittelten Relevanz von N-Cadherin für die Vermittlung der Schwann-Tumor-Zell-Adhäsion ergab sich die Frage nach seiner Funktion in der Migration der Zellen. In unserem eigens etablierten 3D-Migrationsassay wurde die tumorzellgerichtete Migration der Schwannschen Zellen analysiert. Die Migrationsbewegung der Schwannschen Zellen setzt in diesem Versuchsaufbau deutlich früher ein als die Migrationsbewegung der entgegengesetzten Pankreaskarzinomzellen und ist im Gegensatz zu dieser gerichtet und auswertbar. Jede Migrationsbewegung von Zellen setzt kurzfristige Adhäsionen dieser entweder an Extrazellulärmatrix-Bestandteile oder an andere Zellen voraus. Damit gibt die Migrationsbewegung auch Aufschluss über das Adhäsionsverhalten von Zellen.

Melanomzellen zeigten eine durch N-Cadherin vermittelte Migration über Fibroblasten. Eine N-Cadherin-Blockade führte zu einer abnehmenden Migrationsbewegung. Diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, dass Tumorzellen über N-Cadherin labile Zell-Zell-Kontakte mit Fibroblasten eingehen können und N-Cadherin darüber zu deren invasivem Verhalten beiträgt (Li, Satyamoorthy et al. 2001). Demir et al. zeigten eine zielgerichtete Migration Schwannscher Zellen zu Pankreaskarzinomzellen. Die Gliazellen verließen ihre anfängliche vertikale Migrationsrichtung, um über einen U-Turn in Richtung Pankreaskarzinomzellen zu wandern. Eine gerichtete Migration konnte auch zu Karzinomzellen anderer gastrointestinaler Tumorentitäten beobachtet werden, allerdings in weniger starkem Ausmaß. Die spezifische Chemoattraktion zu Pankreaskarzinomzellen zeigte sich durch die nicht zielgerichtete Migration in Richtung benignen Zellen wie Fibroblasten (Demir, Boldis et al. 2014). Unter Annahme der primär aktiven Rolle der Schwannschen Zellen mit Migration zu PanIn-Läsionen und Tumorzellen in der Pathogenese der neuralen Invasion überprüften wir die mögliche Vermittlung der Migration der Schwannschen Zellen durch N-Cadherin. In unserem 3D-Migrationsassay haben die Zellen die Möglichkeit in einem Extrazellulärmatrix-Gel zu migrieren, welches hauptsächlich aus Laminin besteht und unter anderem Kollagen Typ IV, Heparansulfat-Proteoglykane sowie Entactin enthält. Cadherine sind vor allem bekannt für ihre interzelluläre Vermittlung (Vleminckx and Kemler 1999). Während ihrer Migration in vivo haben Schwannsche Zellen die Möglichkeit, sich kurzfristig an andere Zellen wie beispielsweise an Fibroblasten zu binden. Charakteristisches Merkmal des Pankreaskarzinoms ist die ausgeprägte desmoplastische Reaktion, die vor allem durch aktivierte pankreatische Stellatumzellen im peritumorösem Bindegewebe verursacht wird (Apte, Park et al. 2004). Die

Stellatumzellen könnten eine weitere Adhäsionsstelle darstellen. Interessanterweise ist die Ausprägung der Desmoplasie mit dem Grad der neuralen Invasion gekoppelt, wobei eine starke desmoplastische Reaktion mit einem ausgeprägten Nervenbefall einhergeht (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Eine Limitation unseres Versuchsaufbaus ist das Fehlen anderer Zelltypen als potentielle Adhäsionsstruktur für die migrierenden Zellen. Trotzdem kommt es zu einer verminderten Migration der Schwannschen Zellen nach Blockade von N-Cadherin. Es stellt sich die Frage, woran N-Cadherin auf den Gliazellen in unserem 3D-Migrationassay bei bloßem Vorhandensein von Extrazellulärmatrixbestandteilen bindet. Auffällig war, dass die Zellen oft in kleinen Zellklustern zusammenhängend migrierten. Eine mögliche Erklärung ist die kurzfristige homophile Interaktion mit den benachbarten Zellen und darüber eine über N-Cadherin vermittelte Migration. Ein anderer potentieller Mechanismus ist die Interaktion oder Komplexbildung von N-Cadherin mit anderen Transmembranproteinen. Denkbar ist auch eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die über andere Wege als die direkte N-Cadherin vermittelte Adhäsion zu einer Migrationsförderung führt. In Neuronen führt eine N-Cadherin vermittelte Stabilisierung des FGFR zu dessen Aktivierung mit der Folge eines gesteigerten Neuritenwachstums (Doherty, Williams et al. 2000). Man geht von einer N-Cadherin vermittelten Verhinderung der FGFR-Internalisierung aus, wodurch es zu einer gesteigerten Motilität und Sekretion von extrazellulären Proteasen wie der MMP-9 kommt (Cavallaro and Christofori 2004). In Mammakarzinomzellen förderte N-Cadherin FGFR-abhängig die Invasion der Zellen, und es kam zu einer N-Cadherin/FGFR vermittelten Epithelial-mesenchymalen Transition mit verminderter epithelialer sowie verstärkter mesenchymaler Genexpression (Qian, Anzovino et al. 2014). Die Ergebnisse sprechen für eine Invasivitätssteigerung von Zellen durch die N-Cadherin vermittelte Aktivierung des FGFR. FGFR1 und FGFR2 werden von Schwannschen Zellen exprimiert (Furusho, Dupree et al. 2009). Eine homophile N-Cadherin Bindung zwischen Schwannschen Zellen, die zu Beginn des Migrationassays auf jeden Fall stattfinden kann, könnte über die FGFR-Aktivierung zu deren Migration beitragen. N-Cadherin wurde in retinalen Pigmentepithelzellen auch in einer Assoziation mit c-MET gefunden. Diese Interaktion erhöhte die durch HFG induzierte Invasivität der Zellen (Van Aken, De Wever et al. 2003). Der genaue Mechanismus, über den N-Cadherin die Migration im Extrazellulärmatrixgel vermittelt, bleibt noch zu überprüfen.

Immunhistochemisch hatten wir im Pankreaskarzinom im Vergleich zum Normalpankreas keine gesteigerte neurale Immunoreaktivität detektieren können, sodass wir nicht von einer Hochregulation von N-Cadherin in Schwannschen Zellen ausgehen. Zusammenfassend lässt

sich sagen, dass die Adhäsion zwischen Schwannschen Zellen und Tumorzellen N-Cadherin vermittelt ist. Auch die Migration von Schwannschen Zellen zu Pankreaskarzinomzellen wird durch N-Cadherin mitvermittelt.

Die Korrelation der Immunoreaktivität von PMP22 mit dem Grad der neuralen Invasion ergab eine starke Färbung von PMP22 in Nerven mit perineuralem Befall. Dies spricht für die mögliche Vermittlung dieser über PMP22. Die niedrigere Immunoreaktivität von PMP22 von Nerven mit endoneuralem Befall kann durch die Zerstörung der intraneuralen Strukturen inklusive der myelinbildenden Schwann-Zellen erklärt werden.

Die Erforschung der Relevanz vom PMP22 als potentielle Adhäsionsstelle für Tumorzellen wurde von der fehlenden Detektion des Moleküls auf proteinchemischer Ebene in Schwannschen Zellen limitiert. Da sich die Fähigkeit Schwannscher Zellen zur Myelinbildung durch fehlenden neuronalen Kontakt *in vitro* reduziert, stimulierten wir sie mit dbcAMP und Ascorbinsäure. Die deutliche Änderung der Zellmorphologie sprach für einen Effekt der Stimulation, und die Immunfluoreszenzfärbung mit PMP22 zeigte eine Expressionssteigerung durch starke Fluoreszenz im perinukleären Bereich. Die hohe Degradierungsrate während der Produktion von PMP22, die in Schwann-Zellen von Ratten bis zu 70 % beträgt, könnte die perinukleäre Lokalisation erklären (Li, Parker et al. 2013). Zwar detektierten wir PMP22 mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene von Schwannschen Zellen und nach Stimulation auch mittels Immunzytofluoreszenz, doch das Fehlen einer eindeutigen Membranlokalisation des Moleküls als Voraussetzung für die Durchführbarkeit des Adhäsionsassays bewog uns zu einem anderen Ansatz. Es sollte alternativ die gesamte von den Schwann-Zellen gebildete und PMP22 enthaltende Myelinscheide als potentielle Adhäsionsstruktur für Tumorzellen untersucht werden. Es wurden mit mCherry transfizierte fluoreszierende Pankreaskarzinomzellen in murinen Nervus Ischiadicus injiziert. Die intraneurale Migration der injizierten Zellen in einem myelinisierten Nerven wurde mit der Migration in durch Lysophosphatidylcholin-Behandlung demyelinisierten Nerven verglichen. Dieser Versuchsansatz wurde von uns neu etabliert. Der "neurale *ex vivo* Invasionassay" orientierte sich an der bereits von Gil et al. und Cavel et al. im Rahmen von *in vivo* Projekten vorbeschriebenen Methode der Injektion von Karzinomzellen in murinen Nervus Ischiadicus (Gil, Cavel et al. 2010). Die Time-lapse-Mikroskopie startete 24 Stunden nach Entnahme des Nervens, sodass wir von einer noch erhaltenen Myelinscheide ausgehen konnten. Die Migrationsbewegungen der Pankreaskarzinomzellen konnten mittels Time-Lapse-Fluoreszenz-Mikroskopie beobachtet werden. Der Vergleich der verschiedenen Parameter wie Forward Migration Index, Geschwindigkeit, Direktionalität, euklidische und total

zurückgelegte Strecke ergaben keinen signifikanten Unterschied im demyelinisierten versus myelinisierten Nerv. Die Annahme, die Myelinscheide stelle eine bevorzugte Targetstruktur für die Migrationsbewegung der Pankreaskarzinomzellen entlang des Nervens dar, konnte in diesem Versuch nicht gezeigt werden. Limitationen der Übertragbarkeit dieses Versuches auf den Vorgang der neuralen Invasion *in vivo* ergibt sich durch den unterschiedlichen Pathomechanismus. Während die Tumorzellen *in vivo* von außen in den Nerven eindringen müssen und es dabei zwangsläufig zu einer teilweisen Zerstörung der neuralen Hüllstrukturen kommt, werden die Tumorzellen in unserem Assay direkt ins Innere des Nervens injiziert. Es ist dabei, abgesehen von der Einstichstelle, nicht von einer Zerstörung der Hüllstrukturen auszugehen. Man kann sich *in vivo* einen invasionsbedingt aufgelockerten Raum vorstellen. Das *in vitro* Setting könnte durch einen vergleichsweise engen Raum die Tumorzellmigration erschweren und eventuell beeinträchtigen. Eine Untersuchung der Pankreaskarzinomzellmigration entlang von Nerven mittels Co-Kultur von DRGs und Tumorzellen zeigte ein unidirektionales und polarisiertes Wachstum der Karzinomzellen in Richtung Ganglion. Tumorzellen ohne Kontakt zum Nerv zeigten dahingegen eine nicht gerichtete Migration (Gil, Cavel et al. 2010). Die von uns beobachtete Migration der Tumorzellen innerhalb des Nervens zeigte ebenfalls keine bevorzugte orthograde oder retrograde Migrationsrichtung. Im Gegensatz zum DRG haben die Axone in unserem Assay kein zugehöriges Soma mehr, wodurch eine gerichtete Migration der Tumorzellen erschwert werden könnte.

Letztlich bleibt die genaue Rolle von PMP22 vor allem hinsichtlich der Schwann-Zell-Migration unklar. PMP22 kann über eine Komplexbildung mit $\alpha 6\beta 4$ -Integrin an Laminin anheften und wäre damit ein potentieller, die Migration vermittelnder Kandidat (Amici, Dunn et al. 2006). PMP22 wird im Pankreaskarzinom vermehrt exprimiert. Während duktale und azinäre Zellen des Normalpankreas keine Immunoreaktivität zeigen, färben sich 60 % der Pankreaskarzinomkomplexe an, auch PanIN-Läsionen scheinen PMP22 zu exprimieren. Die Beobachtung konnte durch Nachweis von mRNA in einigen kultivierten Pankreaskarzinomzellen erhärtet werden. Interessanterweise zeigten auch einige Histozyten im Pankreaskarzinom eine Färbung von PMP22 (Li, Kleff et al. 2005). PMP22 kann homophile Bindung eingehen (Li, Parker et al. 2013). Eine Vermittlung der Adhäsion zwischen Pankreaskarzinomzellen und Schwannschen Zellen über eine homophile PMP22 vermittelte Interaktion ist weiterhin denkbar.

Unsere neuen Erkenntnisse über die Vermittlung der Adhäsion zwischen Schwannschen Zellen und Pankreaskarzinomzellen werden in naher Zukunft *in vivo* überprüft und verifiziert.

Der erste Teil des Versuches untersucht die Adhäsionsmoleküle auf Karzinomzellen in einem etablierten und standardisierten in vivo Model der neuralen Invasion. Hierbei werden Mäusen murine Pankreaskarzinomzellen (Panc2) in ihren Nervus ischiadicus injiziert, um anschließend das Ausmaß und den Schweregrad der neuralen Invasion zu bestimmen. Der Versuchsgruppe werden Tumorzellen mit einem shRNA-Knockdown gegen eines der relevanten Moleküle (Beta- 1-Integrin, L1CAM oder N-Cadherin) injiziert. Der Kontrollgruppe injizieren wir mit Kontroll/scrambled-shRNA transfizierte Tumorzellen oder Tumorzellen, die während des Transduktionsprozesses keine shRNA in ihr Genom integriert haben.

Im zweiten Teil des Versuchs wird der Einfluss der Glia-spezifischen Ausschaltung des N-Cadherin-Gens auf die neurale Invasion untersucht. Hierzu injizieren wir murine Pankreaskarzinomzellen in den Nervus ischiadicus von Mäusen, in denen das N-Cadherin-Gen gliaspezifisch ausgeschaltet wurde (GFAP-CreERT2; N-Cadherin lox/lox; Versuchsgruppe) beziehungsweise in die einer entsprechenden Kontrollgruppe (N-Cadherin lox/lox; Vergleichsgruppe). Um die Rolle der myelinassoziierten Adhäsionsmoleküle zu untersuchen, verwenden wir im dritten Teil des Versuches kommerziell erwerbliche transgene Mäuse, die als Modell für die demyelinisierende Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie dienen. Diese Mäuse haben eine zu verzögerter und verminderter Myelinisierung führende heterozygote Mutation im PMP22-Gen. Histologisch werden die Tumorzell-Eindringtiefe und die Invasionsstrecke verglichen sowie der Erhalt der Funktionalität der betroffenen Gliedmaße beurteilt.

Die neurale Invasion gilt als einer der Gründe für die hohe Rate an Lokalrezidiven im Pankreaskarzinom (Pour, Bell et al. 2003). Sie hat damit große klinische Bedeutung. Relevante Adhäsionsmoleküle, die die Bindung der Tumorzellen an neurale Strukturen vermitteln, könnten ein potentiell therapeutisches Target darstellen. Eine therapeutische Blockade der Adhäsionsmoleküle wäre durch intraoperative Verabreichung solcher Substanzen zur Minimierung von extrapancreatischem Nervenbefall und eventueller Minimierung der Lokalrezidivrate denkbar. Die neurale Invasion ist auch mit Schmerzen verbunden. Patienten mit endoneuraler Invasion haben ein stärkeres Schmerzempfinden als Patienten mit perineuraler Invasion (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die Verzögerung der neuralen Invasion wäre in der palliativen Therapie ein möglicher Ansatz zur Schmerzkontrolle.

VI. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das Gesamtprojekt konnte einen entscheidenden Schritt im Verständnis des Pathomechanismus der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom beitragen. Die spezifische Anheftung der Pankreaskarzinomzellen an Schwannsche Zellen konnte gezeigt werden. Mittels unserer funktionalen Analysen sowie der immunhistochemischen Auswertung identifizierten wir auf Tumorzellen Beta-1-Integrin, L1CAM und N-Cadherin als vermittelnde Moleküle dieser Adhäsion. N-Cadherin zeigte sich auch als potentieller Bindungspartner auf Schwannschen Zellen. Eine Relevanz scheint N-Cadherin ebenfalls in der Vermittlung der tumorzellgerichteten Migration der Schwannschen Zellen zu haben. Betrachtet man die von unserer Arbeitsgruppe gezeigte Möglichkeit der primär aktiven Rolle der Schwannschen Zellen mit Migration der Schwann-Zellen zu PanIN-Läsionen und Tumorzellen, ist die genauere Untersuchung dieser Migration ein wichtiger Schritt zum Verständnis des Pathomechanismus der neuralen Invasion. Die erhaltenen Ergebnisse sollen in naher Zukunft wie oben beschrieben *in vivo* überprüft und verifiziert werden.

Die in diesem Projekt identifizierten Adhäsionsmoleküle sind potentielle therapeutische Targetmoleküle in der Behandlung des Pankreaskarzinoms, deren Relevanz *in vivo* weiter erforscht werden muss. Die therapeutische Verzögerung der neuralen Invasion könnte einen wichtigen Schritt in der kurativen und palliativen Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellen.

VII. Literaturverzeichnis

Abiatari, I., T. DeOliveira, V. Kerkadze, C. Schwager, I. Esposito, N. A. Giese, P. Huber, F. Bergman, A. Abdollahi, H. Friess and J. Kleeff (2009). "Consensus transcriptome signature of perineural invasion in pancreatic carcinoma." Mol Cancer Ther 8(6): 1494-1504.

Amici, S. A., W. A. Dunn, Jr., A. J. Murphy, N. C. Adams, N. W. Gale, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos and L. Notterpek (2006). "Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina." J Neurosci 26(4): 1179-1189.

Anastasiadis, P. Z. and A. B. Reynolds (2000). "The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer." J Cell Sci 113 (Pt 8): 1319-1334.

Apte, M. V., S. Park, P. A. Phillips, N. Santucci, D. Goldstein, R. K. Kumar, G. A. Ramm, M. Buchler, H. Friess, J. A. McCarroll, G. Keogh, N. Merrett, R. Pirola and J. S. Wilson (2004). "Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells." Pancreas 29(3): 179-187.

Arthur-Farraj, P., K. Wanek, J. Hantke, C. M. Davis, A. Jayakar, D. B. Parkinson, R. Mirsky and K. R. Jessen (2011). "Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate." Glia 59(5): 720-733.

Blackford, A., G. Parmigiani, T. W. Kensler, C. Wolfgang, S. Jones, X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, J. R. Eshleman, M. Goggins, E. M. Jaffee, C. A. Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, A. Klein, J. L. Cameron, K. Olino, R. Schulick, J. Winter, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler and R. H. Hruban (2009). "Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer." Cancer Res 69(8): 3681-3688.

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

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

Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." Nat Rev Cancer 4(2): 118-132.

Cavallaro, U., B. Schaffhauser and G. Christofori (2002). "Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?" Cancer Lett 176(2): 123-128.

Cavel, O., O. Shomron, A. Shabtay, J. Vital, L. Trejo-Leider, N. Weizman, Y. Krelin, Y. Fong, R. J. Wong, M. Amit and Z. Gil (2012). "Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor." Cancer Res 72(22): 5733-5743.

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 (2009). "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." Gastroenterology 136(1): 177-186 e171.

Ceyhan, G. O., I. E. Demir, B. Altintas, U. Rauch, G. Thiel, M. W. Muller, N. A. Giese, H. Friess and K. H. Schafer (2008). "Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells." Biochem Biophys Res Commun 374(3): 442-447.

- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, U. Rauch, F. Bergmann, M. W. Muller, M. W. Buchler, H. Friess and K. H. Schafer (2009). "Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer." Am J Gastroenterol 104(10): 2555-2565.
- Ceyhan, G. O., N. A. Giese, M. Erkan, A. G. Kerscher, M. N. Wenthe, T. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2006). "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." Ann Surg 244(2): 274-281.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Groupe Tumeurs Digestives of and P. Intergroup (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." N Engl J Med 364(19): 1817-1825.
- Corell, M., G. Wicher, C. Limbach, M. W. Kilimann, D. R. Colman and A. Fex Svenningsen (2010). "Spatiotemporal distribution and function of N-cadherin in postnatal Schwann cells: A matter of adhesion?" J Neurosci Res 88(11): 2338-2349.
- Corfas, G., M. O. Velardez, C. P. Ko, N. Ratner and E. Peles (2004). "Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions." J Neurosci 24(42): 9250-9260.
- Cornell, R. J., D. Rowley, T. Wheeler, N. Ali and G. Ayala (2003). "Neuroepithelial interactions in prostate cancer are enhanced in the presence of prostatic stroma." Urology 61(4): 870-875.
- Couch, F. J., M. R. Johnson, K. G. Rabe, K. Brune, M. de Andrade, M. Goggins, H. Rothenmund, S. Gallinger, A. Klein, G. M. Petersen and R. H. Hruban (2007). "The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(2): 342-346.
- Cubilla, A. and P. J. Fitzgerald (1978). "Pancreas cancer. I. Duct adenocarcinoma. A clinical-pathologic study of 380 patients." Pathol Annu 13 Pt 1: 241-289.
- Dai, H., R. Li, T. Wheeler, M. Ozen, M. Ittmann, M. Anderson, Y. Wang, D. Rowley, M. Younes and G. E. Ayala (2007). "Enhanced survival in perineural invasion of pancreatic cancer: an in vitro approach." Hum Pathol 38(2): 299-307.
- De La Cruz, M. S., A. P. Young and M. T. Ruffin (2014). "Diagnosis and management of pancreatic cancer." Am Fam Physician 89(8): 626-632.
- Deborde, S., T. Omelchenko, A. Lyubchik, Y. Zhou, S. He, W. F. McNamara, N. Chernichenko, S. Y. Lee, F. Barajas, C. H. Chen, R. L. Bakst, E. Vakiani, S. He, A. Hall and R. J. Wong (2016). "Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion." J Clin Invest 126(4): 1538-1554.
- Demir, I. E., A. Boldis, P. L. Pfitzinger, S. Teller, E. Brunner, N. Klose, T. Kehl, M. Maak, M. Lesina, M. Laschinger, K. P. Janssen, H. Algul, H. Friess and G. O. Ceyhan (2014). "Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion." J Natl Cancer Inst 106(8).
- Derycke, L. D. and M. E. Bracke (2004). "N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling." Int J Dev Biol 48(5-6): 463-476.
- DiMagno, E. P. (1999). "Pancreatic cancer: clinical presentation, pitfalls and early clues." Ann Oncol 10 Suppl 4: 140-142.
- Distler, M., D. Aust, J. Weitz, C. Pilarsky and R. Grutzmann (2014). "Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN." Biomed Res Int 2014: 474905.

- Doherty, P., G. Williams and E. J. Williams (2000). "CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade." Mol Cell Neurosci 16(4): 283-295.
- Duell, E. J., E. Lucenteforte, S. H. Olson, P. M. Bracci, D. Li, H. A. Risch, D. T. Silverman, B. T. Ji, S. Gallinger, E. A. Holly, E. H. Fontham, P. Maisonneuve, H. B. Bueno-de-Mesquita, P. Ghadirian, R. C. Kurtz, E. Ludwig, H. Yu, A. B. Lowenfels, D. Seminara, G. M. Petersen, C. La Vecchia and P. Boffetta (2012). "Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4)." Ann Oncol 23(11): 2964-2970.
- Edelman, G. M. (1986). "Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern." Annu Rev Cell Biol 2: 81-116.
- Eldridge, C. F., M. B. Bunge, R. P. Bunge and P. M. Wood (1987). "Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation." J Cell Biol 105(2): 1023-1034.
- Esposito, I., B. Konukiewitz, A. M. Schlitter and G. Kloppel (2012). "[New insights into the origin of pancreatic cancer. Role of atypical flat lesions in pancreatic carcinogenesis]." Pathologie 33 Suppl 2: 189-193.
- Everhart, J. and D. Wright (1995). "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis." JAMA 273(20): 1605-1609.
- Furusho, M., J. L. Dupree, M. Bryant and R. Bansal (2009). "Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in nonmyelinating Schwann cells causes sensory axonal neuropathy and impairment of thermal pain sensitivity." J Neurosci 29(6): 1608-1614.
- Gil, Z., O. Cavel, K. Kelly, P. Brader, A. Rein, S. P. Gao, D. L. Carlson, J. P. Shah, Y. Fong and R. J. Wong (2010). "Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves." J Natl Cancer Inst 102(2): 107-118.
- Guerra, C., A. J. Schuhmacher, M. Canamero, P. J. Grippo, L. Verdaguer, L. Perez-Gallego, P. Dubus, E. P. Sandgren and M. Barbacid (2007). "Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice." Cancer Cell 11(3): 291-302.
- Gumbiner, B. M. (2005). "Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol 6(8): 622-634.
- Hahn, S. A., B. Greenhalf, I. Ellis, M. Sina-Frey, H. Rieder, B. Korte, B. Gerdes, R. Kress, A. Ziegler, J. A. Raeburn, D. Campra, R. Grutzmann, H. Rehder, M. Rothmund, W. Schmiegel, J. P. Neoptolemos and D. K. Bartsch (2003). "BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma." J Natl Cancer Inst 95(3): 214-221.
- Hanisch, F. G., T. R. Stadie, F. Deutzmann and J. Peter-Katalinic (1996). "MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation." Eur J Biochem 236(1): 318-327.
- Hassan, M. M., M. L. Bondy, R. A. Wolff, J. L. Abbruzzese, J. N. Vauthey, P. W. Pisters, D. B. Evans, R. Khan, T. H. Chou, R. Lenzi, L. Jiao and D. Li (2007). "Risk factors for pancreatic cancer: case-control study." Am J Gastroenterol 102(12): 2696-2707.
- Higgins, J. M., D. A. Mandlebrot, S. K. Shaw, G. J. Russell, E. A. Murphy, Y. T. Chen, W. J. Nelson, C. M. Parker and M. B. Brenner (1998). "Direct and regulated interaction of integrin alphaEbeta7 with E-cadherin." J Cell Biol 140(1): 197-210.

- Hyung, S., B. Yoon Lee, J. C. Park, J. Kim, E. M. Hur and J. K. Francis Suh (2015). "Coculture of Primary Motor Neurons and Schwann Cells as a Model for In Vitro Myelination." Sci Rep 5: 15122.
- Islam, S., T. E. Carey, G. T. Wolf, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (1996). "Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion." J Cell Biol 135(6 Pt 1): 1643-1654.
- Issa, Y., D. Nummer, T. Seibel, S. S. Muerkoster, M. Koch, F. H. Schmitz-Winnenthal, L. Galindo, J. Weitz, P. Beckhove and P. Altevogt (2009). "Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration." J Mol Med (Berl) 87(1): 99-112.
- Jessen, K. R., L. Morgan, H. J. Stewart and R. Mirsky (1990). "Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions." Development 109(1): 91-103.
- Jiao, L., A. Berrington de Gonzalez, P. Hartge, R. M. Pfeiffer, Y. Park, D. M. Freedman, M. H. Gail, M. C. Alavanja, D. Albanes, L. E. Beane Freeman, W. H. Chow, W. Y. Huang, R. B. Hayes, J. A. Hoppin, B. T. Ji, M. F. Leitzmann, M. S. Linet, C. L. Meinhold, C. Schairer, A. Schatzkin, J. Virtamo, S. J. Weinstein, W. Zheng and R. Z. Stolzenberg-Solomon (2010). "Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts." Cancer Causes Control 21(8): 1305-1314.
- Kanda, M., H. Matthaei, J. Wu, S. M. Hong, J. Yu, M. Borges, R. H. Hruban, A. Maitra, K. Kinzler, B. Vogelstein and M. Goggins (2012). "Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia." Gastroenterology 142(4): 730-733 e739.
- Kayahara, M., H. Nakagawara, H. Kitagawa and T. Ohta (2007). "The nature of neural invasion by pancreatic cancer." Pancreas 35(3): 218-223.
- Kirchgessner, A. L., M. A. Adlersberg and M. D. Gershon (1992). "Colonization of the developing pancreas by neural precursors from the bowel." Dev Dyn 194(2): 142-154.
- Kirchgessner, A. L. and M. D. Gershon (1990). "Innervation of the pancreas by neurons in the gut." J Neurosci 10(5): 1626-1642.
- Kleeff, J., M. Korc, M. Apte, C. La Vecchia, C. D. Johnson, A. V. Biankin, R. E. Neale, M. Tempero, D. A. Tuveson, R. H. Hruban and J. P. Neoptolemos (2016). "Pancreatic cancer." Nat Rev Dis Primers 2: 16022.
- Klein, A. P., K. A. Brune, G. M. Petersen, M. Goggins, A. C. Tersmette, G. J. Offerhaus, C. Griffin, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. Kern and R. H. Hruban (2004). "Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds." Cancer Res 64(7): 2634-2638.
- Koorstra, J. B., S. R. Hustinx, G. J. Offerhaus and A. Maitra (2008). "Pancreatic carcinogenesis." Pancreatology 8(2): 110-125.
- Kuhlbrodt, K., B. Herbarth, E. Sock, I. Hermans-Borgmeyer and M. Wegner (1998). "Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells." J Neurosci 18(1): 237-250.
- Lambert, M., F. Padilla and R. M. Mege (2000). "Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals." J Cell Sci 113 (Pt 12): 2207-2219.
- Li, G., K. Satyamoorthy and M. Herlyn (2001). "N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells." Cancer Res 61(9): 3819-3825.

- Li, J., J. Kleeff, I. Esposito, H. Kayed, K. Felix, T. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2005). "Expression analysis of PMP22/Gas3 in premalignant and malignant pancreatic lesions." J Histochem Cytochem 53(7): 885-893.
- Li, J., B. Parker, C. Martyn, C. Natarajan and J. Guo (2013). "The PMP22 gene and its related diseases." Mol Neurobiol 47(2): 673-698.
- Liebig, C., G. Ayala, J. A. Wilks, D. H. Berger and D. Albo (2009). "Perineural invasion in cancer: a review of the literature." Cancer 115(15): 3379-3391.
- Liebl, F., I. E. Demir, K. Mayer, T. Schuster, J. G. D'Haese, K. Becker, R. Langer, F. Bergmann, K. Wang, R. Rosenberg, A. R. Novotny, M. Feith, D. Reim, H. Friess and G. O. Ceyhan (2014). "The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study." Ann Surg 260(5): 900-907; discussion 907-908.
- Liu, B. and K. Y. Lu (2002). "Neural invasion in pancreatic carcinoma." Hepatobiliary Pancreat Dis Int 1(3): 469-476.
- Magnussen, C., S. P. Hung and A. Ribeiro-da-Silva (2015). "Novel expression pattern of neuropeptide Y immunoreactivity in the peripheral nervous system in a rat model of neuropathic pain." Mol Pain 11: 31.
- Makino, I., H. Kitagawa, T. Ohta, H. Nakagawara, H. Tajima, I. Ohnishi, H. Takamura, T. Tani and M. Kayahara (2008). "Nerve plexus invasion in pancreatic cancer: spread patterns on histopathologic and embryological analyses." Pancreas 37(4): 358-365.
- Marchesi, F., L. Piemonti, G. Fedele, A. Destro, M. Roncalli, L. Albarello, C. Doglioni, A. Anselmo, A. Doni, P. Bianchi, L. Laghi, A. Malesci, L. Cervo, M. Malosio, M. Reni, A. Zerbi, V. Di Carlo, A. Mantovani and P. Allavena (2008). "The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Res 68(21): 9060-9069.
- Marchesi, F., L. Piemonti, A. Mantovani and P. Allavena (2010). "Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis." Cytokine Growth Factor Rev 21(1): 77-82.
- Mariotti, A., A. Perotti, C. Sessa and C. Ruegg (2007). "N-cadherin as a therapeutic target in cancer." Expert Opin Investig Drugs 16(4): 451-465.
- Martini, R. and M. Schachner (1986). "Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve." J Cell Biol 103(6 Pt 1): 2439-2448.
- Murphy, K. M., K. A. Brune, C. Griffin, J. E. Sollenberger, G. M. Petersen, R. Bansal, R. H. Hruban and S. E. Kern (2002). "Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%." Cancer Res 62(13): 3789-3793.
- Naef, R. and U. Suter (1998). "Many facets of the peripheral myelin protein PMP22 in myelination and disease." Microsc Res Tech 41(5): 359-371.
- Nagakawa, T., M. Nagamori, F. Futakami, Y. Tsukioka, M. Kayahara, T. Ohta, K. Ueno and I. Miyazaki (1996). "Results of extensive surgery for pancreatic carcinoma." Cancer 77(4): 640-645.
- Nakajima, S., R. Doi, E. Toyoda, S. Tsuji, M. Wada, M. Koizumi, S. S. Tulachan, D. Ito, K. Kami, T. Mori, Y. Kawaguchi, K. Fujimoto, R. Hosotani and M. Imamura (2004). "N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma." Clin Cancer Res 10(12 Pt 1): 4125-4133.

- Nakao, A., T. Kaneko, S. Takeda, S. Inoue, A. Harada, S. Nomoto, T. Ekmel, K. Yamashita and T. Hatsuno (2001). "The role of extended radical operation for pancreatic cancer." Hepatogastroenterology 48(40): 949-952.
- Nattkamper, H., H. Halfter, M. R. Khazaei, T. Lohmann, B. Gess, M. Eisenacher, E. Willscher and P. Young (2009). "Varying survival of motoneurons and activation of distinct molecular mechanism in response to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage." J Neurochem 110(3): 935-946.
- Neoptolemos, J. P., D. H. Palmer, P. Ghaneh, E. E. Psarelli, J. W. Valle, C. M. Halloran, O. Faluyi, D. A. O'Reilly, D. Cunningham, J. Wadsley, S. Darby, T. Meyer, R. Gillmore, A. Anthony, P. Lind, B. Glimelius, S. Falk, J. R. Izbicki, G. W. Middleton, S. Cummins, P. J. Ross, H. Wasan, A. McDonald, T. Crosby, Y. T. Ma, K. Patel, D. Sherriff, R. Soomal, D. Borg, S. Sothi, P. Hammel, T. Hackert, R. Jackson, M. W. Buchler and C. European Study Group for Pancreatic (2017). "Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial." Lancet 389(10073): 1011-1024.
- Ohsawa, Y., T. Murakami, Y. Miyazaki, T. Shirabe and Y. Sunada (2006). "Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system." J Neurol Sci 247(1): 11-15.
- Okusaka, T., S. Okada, H. Ueno, M. Ikeda, K. Shimada, J. Yamamoto, T. Kosuge, S. Yamasaki, N. Fukushima and M. Sakamoto (2001). "Abdominal pain in patients with resectable pancreatic cancer with reference to clinicopathologic findings." Pancreas 22(3): 279-284.
- Pareek, S., L. Notterpek, G. J. Snipes, R. Naef, W. Sossin, J. Laliberte, S. Iacampo, U. Suter, E. M. Shooter and R. A. Murphy (1997). "Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin." J Neurosci 17(20): 7754-7762.
- Parmantier, E., F. Cabon, C. Braun, D. D'Urso, H. W. Muller and B. Zalc (1995). "Peripheral myelin protein-22 is expressed in rat and mouse brain and spinal cord motoneurons." Eur J Neurosci 7(5): 1080-1088.
- Pour, P. M., R. H. Bell and S. K. Batra (2003). "Neural invasion in the staging of pancreatic cancer." Pancreas 26(4): 322-325.
- Pour, P. M., H. Egami and Y. Takiyama (1991). "Patterns of growth and metastases of induced pancreatic cancer in relation to the prognosis and its clinical implications." Gastroenterology 100(2): 529-536.
- Qian, X., A. Anzovino, S. Kim, K. Suyama, J. Yao, J. Hult, G. Agiostratidou, N. Chandiramani, H. M. McDaid, C. Nagi, H. W. Cohen, G. R. Phillips, L. Norton and R. B. Hazan (2014). "N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties." Oncogene 33(26): 3411-3421.
- Roux, K. J., S. A. Amici and L. Notterpek (2004). "The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers." J Comp Neurol 474(4): 578-588.
- Schachner, M. and U. Bartsch (2000). "Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin." Glia 29(2): 154-165.
- Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia." Nat Neurosci 10(11): 1361-1368.
- Snipes, G. J. and U. Suter (1995). "Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system." J Anat 186 (Pt 3): 483-494.

- Suyama, K., I. Shapiro, M. Guttman and R. B. Hazan (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor." Cancer Cell 2(4): 301-314.
- Swanson, B. J., K. M. McDermott, P. K. Singh, J. P. Eggers, P. R. Crocker and M. A. Hollingsworth (2007). "MUC1 is a counter-receptor for myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion." Cancer Res 67(21): 10222-10229.
- Trapp, B. D., S. B. Andrews, C. Cootauco and R. Quarles (1989). "The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes." J Cell Biol 109(5): 2417-2426.
- Van Aken, E. H., O. De Wever, L. Van Hoorde, E. Bruyneel, J. J. De Laey and M. M. Mareel (2003). "Invasion of retinal pigment epithelial cells: N-cadherin, hepatocyte growth factor, and focal adhesion kinase." Invest Ophthalmol Vis Sci 44(2): 463-472.
- Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban and M. Goggins (2011). "Pancreatic cancer." Lancet 378(9791): 607-620.
- Vleminckx, K. and R. Kemler (1999). "Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling." Bioessays 21(3): 211-220.
- Wallace, V. C., D. F. Cottrell, P. J. Brophy and S. M. Fleetwood-Walker (2003). "Focal lysolecithin-induced demyelination of peripheral afferents results in neuropathic pain behavior that is attenuated by cannabinoids." J Neurosci 23(8): 3221-3233.
- Wanner, I. B. and P. M. Wood (2002). "N-cadherin mediates axon-aligned process growth and cell-cell interaction in rat Schwann cells." J Neurosci 22(10): 4066-4079.
- Wheelock, M. J., Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto and K. R. Johnson (2008). "Cadherin switching." J Cell Sci 121(Pt 6): 727-735.
- Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc and M. W. Buchler (1999). "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." J Clin Oncol 17(8): 2419-2428.
- Zoidl, G., S. Blass-Kampmann, D. D'Urso, C. Schmalenbach and H. W. Muller (1995). "Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth." EMBO J 14(6): 1122-1128.

Danksagung

Danken möchte ich vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan.

Vielen Dank für die Möglichkeit der Durchführung meiner äußerst interessanten und sehr abwechslungsreichen Doktorarbeit in Deinem Labor, die stetige Unterstützung und das Angebot einer exzellenten Betreuung. Ich habe in meinem Forschungsjahr und der studienbegleitenden Arbeit sehr viel über Laborarbeit und experimentelles Arbeiten gelernt und auch die Möglichkeit der Kongressteilnahme war eine sehr wertvolle Erfahrung für mich. Vielen Dank für alles!

Meine tiefste Dankbarkeit gilt außerdem meinem Betreuer PD Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir. Ich habe eine exzellente und sehr außergewöhnliche Betreuung erfahren durch Dich, stets konnte ich meine Ergebnisse mit Dir besprechen, du hattest immer ein offenes Ohr für mich und bei Problemen blieb ein Vorschlag zur Optimierung nie lange aus. Mit deiner Hilfe konnte ich mein Projekt erfolgreich voranbringen und abschließen. Auch im Lernprozess, wissenschaftliche Arbeiten zu verfassen, Poster und Präsentationen zu erstellen, warst du mir eine große Hilfe. Ich danke Dir für alles, auch für deine Erwartungen und Ansprüche an deine Doktoranden, die mich sehr vorangebracht haben.

Ein großer Dank gilt dem Rest des Teams der AG Ceyhan. Ich habe eine sehr gute Einarbeitung erfahren, konnte mich immer auf die Unterstützung meiner Laborkollegen verlassen und habe neben dem Erlernen von wissenschaftlichen Fähigkeiten viele persönliche und schöne zwischenmenschliche Erfahrungen machen dürfen.

Zuletzt danke ich meiner Familie und vor allem meiner Mutter von ganzem Herzen für all die Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation. Es war nicht immer leicht mit mir während dieser Zeit, ich konnte mich stets auf Rückhalt von zuhause verlassen, dafür danke ich Euch!

Lebenslauf

Geburtsdatum: 04.01.1990
Geburtsort: Ulm
Eltern: Claudia Krauß, 63, Ärztin
Dr. Horst Krauß, 63, Internist
Geschwister: Moritz , 30, Arzt
Felix, 31, Pilot

Ausbildung

10/2011-12/2016: Medizinstudium an der TU München
15/12/2016: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1)
10/2015: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1)
10/2009- 10/2011: Medizinstudium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
09/2011: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
2002-2009: Humboldt-Gymnasium Ulm mit Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife (1,1)
2000-2002: St. Hildegard-Gymnasium Ulm
1996-2000: Schönenberg-Grundschule Lehr/ Mähringen (Ulm)

Promotion:

Seit 10/2012: Doktorarbeit im Pankreas-Forschungslabor der TU München im Rahmen des Stipendienprogramms „Translationale Medizin“ der TU München;
Thema: „Die funktionelle Analyse der Rolle der Schwann-Zell-assoziierten Adhäsionsmoleküle in der neuronalen Invasion im Pankreaskarzinom“
06/2015 Präsentation auf 47. European Pancreatic Club Meeting in Toledo, Spanien
01/2015 Posterpräsentation auf 35. Kongress des Deutschen Pankreas Club in Warnemünde, Rostock

Medizinische Praktika und Berufstätigkeit:

Seit 07/2017 Assistenzärztin in der Onkologie und Hämatologie am Zentralklinikum Augsburg

Famulaturen:

03/2015	Neurologie, Herz-Jesu-Krankenhaus Münster
08/2014	Hausarztfamulatur Praxis Dr. Kuczewski, Günzburg
03/2014	„Kardiovaskuläres Praktikum“, Rhön-Klinikum Bad Neustadt an der Saale
04/2012	Viszeral-, Unfall- und Gefäßchirurgie, Kreisklinikum Günzburg

Pflegepraktika:

08/2010	Fachklinik Satteldüne auf Amrum, Rehabilitationseinrichtung für Kinder und Jugendliche
03/2010	Unfallchirurgie Universitätsklinikum Ulm
09/2009:	Herzchirurgie Universitätsklinikum Ulm

Weitere Praktika und medizinische Berufstätigkeit:

09/10 2014	Teilnahme am 14-tägigen humanitärem Einsatz von „Interplast“ in Sumbawanga, Tansania
2014	Nebenjob im Clinical Research Institute München
2013/2014	Nebenjob in internistischen Klinik Dr. Müller München Tätigkeitsbereich: Assistenz im Aufwachraum der Endoskopie, Blutabnahme
09/2013	Teilnahme Ferienakademie der TU München in Südtirol zum Thema „Klinische Fallpräsentation und Innovationen der molekularen Medizin“
07/2013	Teilnahme Trilateralen Summer School der TU München zum Thema „Onkologie“ in Katowice, Polen
2011/2012	Mitarbeit MEDEA Studie, Befragung von Herzinfarktpatienten im Rahmen der Studie

Sprachkenntnisse

Englisch:	C1, sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift, 5-monatiger Auslandsaufenthalt in Neuseeland 2007
Spanisch:	B1, Basiskenntnisse in Wort und Schrift

