



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Untersuchung der Nerv-Sternzell-Interaktion beim Pankreaskarzinom und der chronischen Pankreatitis

Dominic-Pascal Fabian Dischl

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

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan

2. Prof. Dr. Helmut Friess

Die Dissertation wurde am 12.11.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.05.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Pankreaskarzinom.....	8
1.1 Epidemiologie	8
1.2 Risikofaktoren	9
1.3 Pathophysiologie	11
1.4 Klinik	12
1.5 Diagnostik und Staging	13
1.6 Therapie.....	15
1.6.1 Partielle Pankreatikoduodenektomie	15
1.6.2 Pankreas-Linksresektion	17
1.6.3 Totale Pankreatektomie	17
1.6.4 Chemotherapie	17
1.6.5 Radiotherapie	19
1.6.6 Neue Therapieansätze	19
2. Chronische Pankreatitis	20
2.1 Epidemiologie	20
2.2 Risikofaktoren und Ätiologie	20
2.3 Pathophysiologie	21
2.4 Klinik	22
2.5 Diagnose.....	23
2.6 Therapie.....	24
3. Sternzellen	25
3.1 Entdeckung.....	25
3.2 Vorkommen	25
3.3 Bedeutung und Funktion	26
4. Desmoplasie	27
5. Neurale Veränderungen und neuropathischer Schmerz	28
6. Neurotrophe Faktoren.....	29
6.1 GDNF.....	30
6.2 Neurturin	31
6.3 Artemin	32
6.4 Persephin.....	32

6.5 GDNF-Family Rezeptor.....	32
6.6 NGF34	
7. Fragestellung der Dissertation.....	34
8. Material und Methoden	36
8.1 Zellkultur.....	36
8.1.1 Verbrauchsmaterialien	36
8.1.2 Geräte	36
8.1.3 Zellkulturmedium	37
8.1.4 Kultivieren der Zellen	37
8.1.5 Bestimmung der Zellzahl.....	37
8.2 Gewinnung von pankreatischen Sternzellen	37
8.2.1 Gewebegewinnung.....	37
8.2.2 Material	38
8.2.3 Methode	40
8.3 Proteinchemische Untersuchungen	43
8.3.1 Verbrauchsmaterialien	43
8.3.2 Chemikalien	43
8.3.3 Geräte	46
8.3.4 Antikörper	47
8.3.5 Methoden	48
8.3.5.1 Probenextraktion	48
8.3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	48
8.3.5.3 Vorbereitung der Proben.....	48
8.3.5.4 Gelelektrophorese	49
8.3.5.5 Western Blot	49
8.3.5.6 Behandlung mit Antikörpern	50
8.3.5.7 Entwicklung der Membran	51
8.3.5.8 Stripping.....	51
8.4 RNA-Untersuchungen.....	52
8.4.1 Verbrauchsmaterialien	52
8.4.2 Chemikalien und Kits	52
8.4.3 Geräte	53
8.4.4 Primer.....	54
8.4.5 Methode	54
8.4.5.1 Isolation der RNA	54
8.4.5.2 DNase-Verdau	55
8.4.5.3 Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösungen.....	55
8.4.5.4 Reverse Transkription	55
8.4.5.5 Quantitative Real-Time PCR	56
8.4.5.6 Quantifizierung	57
8.5 Immunfluoreszenz-Untersuchungen	57
8.5.1 Verbrauchsmaterialien	57

8.5.2 Chemikalien	57
8.5.3 Geräte	58
8.5.4 Antikörper	58
8.5.5 Methode	58
8.6 Statistik.....	59
9. Ergebnisse.....	60
9.1 Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen	60
9.2 Stimulation der Zellen.....	65
9.2.1 Stimulation mit TGF- β	66
9.2.2 Stimulation durch Hypoxie	68
9.3 Analyse der neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren	69
9.3.1 NGF.....	69
9.3.2 GDNF.....	70
9.3.3 GFR α 1	72
9.3.4 Neurturin	73
9.3.5 GFR α 2.....	77
9.3.6 Artemin	77
9.3.7 GFR α 3.....	79
9.3.8 Persephin.....	80
9.3.9 GFR α 4.....	81
9.4 Behandlung von Sternzellen mit Calcipotriol.....	81
10. Diskussion	83
10.1 Notwendigkeit der Untersuchung von Sternzellen	83
10.2 Isolation der Sternzellen.....	85
10.3 Limitationen in den Untersuchungen	85
10.4 Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen	87
10.5 Stimulation der Zellen.....	87
10.6 Expression neurotropher Faktoren	88
10.6.1 NGF.....	89
10.6.2 GDNF und GFR α 1	89
10.6.3 Neurturin und GFR α 2	90
10.6.4 Artemin und GFR α 3	92
10.6.5 Persephin und GFR α 4	93
10.7 Ausblick	94
11. Zusammenfassung	96
Lebenslauf	97
Danksagungen	99
Literaturverzeichnis	100

Abkürzungsverzeichnis

ART	Artemin
DRG	dorsal root ganglion (Spinalganglion)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFL	GDNF-family Ligand
HIF	hypoxia inducible factor
hPSC	humane pankreatische Sternzellen
IPMN	intraduktal papilläre muzinöse Neoplasie
MCN	muzinös zystische Neoplasie
NTN	Neurturin
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PDA	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PNI	perineurale Invasion
PSC	pankreatische Sternzellen
PSP	Persephin
rPSC	pankreatische Sternzellen aus Ratten
hPSC	pankreatische Sternzellen aus humanem Gewebe
TGF	transforming growth factor
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C25 nach „Krebs in Deutschland 2009/2010“ 9. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013, S. 48.....	9
Tabelle 2 Überblick über genetische Ursachen des Pankreaskarzinoms aus „Erkrankungen des Pankreas“ Seite 341 (Langer and Bartsch 2013).....	11
Tabelle 3 Erstsymptome maligner Erkrankungen des Pankreas nach Häufigkeit geordnet. Nach (Porta, Fabregat et al. 2005, Krug and Gress 2013)	12
Tabelle 4 stellt die Eigenschaften ruhender und aktivierter Sternzellen gegenüber (“General features of quiescent (inactive) and activated PaSCs“) aus (Omary, Lugea et al. 2007).....	27
Tabelle 5 Zusammensetzung einer GBSS-Lösung.....	41
Tabelle 6 Zusammensetzung der Lösungen für Western Blot	46
Tabelle 7 Verdünnungen der Antikörper für Western Blot.....	51
Tabelle 8 Primer für qRT-PCR.....	54
Tabelle 9 Zusammensetzung des Master Mixes für die reverse Transkription.....	55
Tabelle 10 Thermocycler-Protokoll	56
Tabelle 11 Reaktionsansatz für qRT-PCR.....	56
Tabelle 12 LightCycler 480 Protokoll	57
Tabelle 13 Expressionsprofil von Faktoren der glial cell line–derived neurotrophic factor Gruppe und ihren Rezeptoren nach (Ito, Okada et al. 2005)	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Risikofaktoren und protektive Faktoren zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms nach (Maisonneuve and Lowenfels 2014)	10
Abbildung 2 aus „Der pankreasoperierte Patient“ Deutsches Ärzteblatt Jg. 106 Heft 48 27. November 2009 S. 790. Die Abbildung zeigt den Zustand nach einer pyloruserhaltenden Pankreatikoduodenektomie.	16
Abbildung 3 Portait Karl Wilhelm von Kupffer aus www.wikipedia.org/wiki/Karl_Wilhelm_von_Kupffer	25
Abbildung 4 GDNF-Familie: Liganden und Rezeptorinteraktionen aus (Airaksinen and Saarma 2002)	30
Abbildung 5 aus (Wells and Santoro 2009) Die Struktur des RET und weiterführende Signalwege.	33
Abbildung 6 Phasenkontrast-Mikroskopie frisch isolierter (A) und aktivierter (B) pankreatischer Sternzellen	60
Abbildung 7 Genereller zeitlicher Verlauf der Gewinnung der Proben nach Isolation der Zellen.....	61
Abbildung 8 Untersuchung der Expression von α -SMA bei rPSC mittels Western Blot	61
Abbildung 9 Untersuchung der Expression von GFAP bei rPSC	62
Abbildung 10 Auswertung der qRT-PCR zur Analyse der Expression von Vimentin bei rPSC	63
Abbildung 11 Immunfluoreszenz von rPSC 1 Tag nach Isolation.....	64
Abbildung 12 Immunfluoreszenzfärbung von ruhenden und aktivierten rPSC	65
Abbildung 13 Vergleich des Einflusses von TGF- β auf Sternzellen aus unterschiedlichen Isolationsmethoden	67
Abbildung 14 Auswertung einer qRT-PCR und Western Blot zum Vergleich der Expression von α -SMA bei nicht-stimulierten und stimulierten Sternzellen.	68
Abbildung 15 qRT-PCR zur Analyse der Expression von HIF-1- α bei rPSC bei unterschiedlich langer Kultivierung in der Hypoxiekammer.	69
Abbildung 16 Untersuchung des Faktors NGF mittels qRT-PCR mit rPSC.....	70
Abbildung 17 Untersuchung des Faktors GDNF mittels qRT-PCR.	71
Abbildung 18 Untersuchung des Faktors GDNF mittels qRT-PCR mit rPSC nach Behandlung mit TGF- β	71
Abbildung 19 Western Blot mit anti-GFR α 1 Antikörper.....	72
Abbildung 20 Untersuchung des Rezeptors GFR α 1 mit rPSC nach Behandlung mit TGF- β	73
Abbildung 21 Untersuchung des Faktors Neurturin bei rPSC nach dreimaliger Stimulation durch TGF- β , Western Blot mit anti-Neurturin-Antikörper.....	74
Abbildung 22 zeitliches Schema der Stimulation von rPSC	74

Abbildung 23 Auswertung der verschiedenen Banden bei Western Blot mit anti-Neurturin-Antikörper	75
Abbildung 24 Expression von Neurturin bei rPSC nach Stimulation mit TGF- β Expressionsniveaus von Neurturin bei unbehandelten, und dreimal stimulierten rPSC	76
Abbildung 25 Expressionsanalyse von Neurturin bei Hypoxie	77
Abbildung 26 Western Blot mit GFR α 2.....	77
Abbildung 27 Western Blot von rPSC nach TGF β -Behandlung.....	78
Abbildung 28 Proteinchemische Untersuchung von Artemin mit rPSC	78
Abbildung 29 Untersuchung des neurotrophen Faktors Artemin mit qRT-PCR	79
Abbildung 30 Western Blot mit anti-GFR α 3 von rPSC nach Behandlung mit TGF- β und Hypoxie	80
Abbildung 31 Expressionsanalyse von Persephin mit rPSC	81
Abbildung 32 Behandlung von pankreatischen Sternzellen mit 100nM Calcipotriol....	82
Abbildung 33 aus (Demir, Wang et al. 2012)	91
Abbildung 34 aus (Wang, Demir et al. 2014).....	92

1. Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein sehr aggressiver Tumor mit einer ausgesprochen hohen Mortalitätsrate. Da der Primärtumor durch seine Symptomarmut zunächst lange Zeit unentdeckt bleibt, und lokal meist schon fortgeschritten ist und/ oder sogar Metastasen gebildet hat, ist bei Diagnosestellung eine kurative Therapie bei den meisten Patienten nicht mehr möglich. Ein weiteres therapeutisches Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass der Tumor sehr resistent gegenüber Chemo- oder Strahlentherapieregime ist. So ist es in den vergangenen Jahren trotz intensiver Forschung nicht gelungen, das Überleben mit einem kurativen oder palliativen Therapieansatz relevant zu verbessern (Herold 2012, Seufferlein 2013).

1.1 Epidemiologie

Den mit Abstand größten Anteil der Tumorentitäten des Pankreas machen mit über 80% die duktaalen Adenokarzinome aus (Ghaneh, Costello et al. 2007, Bond-Smith, Banga et al. 2012, Bernards, Creemers et al. 2015). Unter einem Adenokarzinom versteht man im Allgemeinen eine maligne Entartung, die von Drüsengewebe oder Schleimhautepithelien ausgeht (Pschyrembel 2007). Duktale Adenokarzinome des Pankreas (PDA) sind zu ca. 60-70 % im Pankreaskopf (einschließlich Processus uncinatus) lokalisiert (Wittekind 2013).

Neben den Adenokarzinomen gibt es noch zystische Tumoren, die sich von den azinären Zellen ableiten, und selten auch endokrine Tumoren, die aus den Zellen der Langerhans-Inseln hervorgehen, wie z.B. das Insulinom, das Zollinger-Ellison-Syndrom, oder das Verner-Morrison-Syndrom (Herold 2012).

Das PDA kommt fast ausschließlich bei Erwachsenen zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr vor (Wittekind 2013).

Laut Veröffentlichung des deutschen Krebsregisters erkranken in Deutschland jährlich circa 15000 Menschen am PDA, wobei Frauen und Männer in etwa gleich häufig hiervon betroffen sind. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 7-8 % hat es die schlechteste Prognose unter allen Krebserkrankungen in Deutschland (Kaatsch, Spix et al. 2013, Seufferlein 2013).

	2009		2010		Prognose für 2014	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	7.790	7.840	8.020	8.060	8.500	8.900
rohe Erkrankungsrate ¹	19,4	18,8	20,0	19,4	21,4	21,6
standardisierte Erkrankungsrate ^{1,2}	13,7	9,9	13,8	10,0	13,5	10,5
mittleres Erkrankungsalter ³	70	74	71	75		
Sterbefälle	7.410	7.748	7.537	7.950		
rohe Sterberate ¹	18,5	18,6	18,8	19,1		
standardisierte Sterberate ^{1,2}	12,9	9,4	12,8	9,5		
5-Jahres-Prävalenz	7.100	7.200	7.300	7.400		
absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) ⁴			7 (3-9)	7 (4-11)		
relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) ⁴			8 (4-11)	8 (5-12)		

¹ je 100.000 Personen, ² altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung, ³ Median, ⁴ in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Tabelle 1 Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C25 nach „Krebs in Deutschland 2009/2010“ 9. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013, S. 48

Die Prognose für die Überlebensrate eines Pankreaskarzinoms ist äußerst ungünstig. In der Literatur wird eine globale Mortalitätsrate von 98 % angegeben (Raimondi, Maisonneuve et al. 2009).

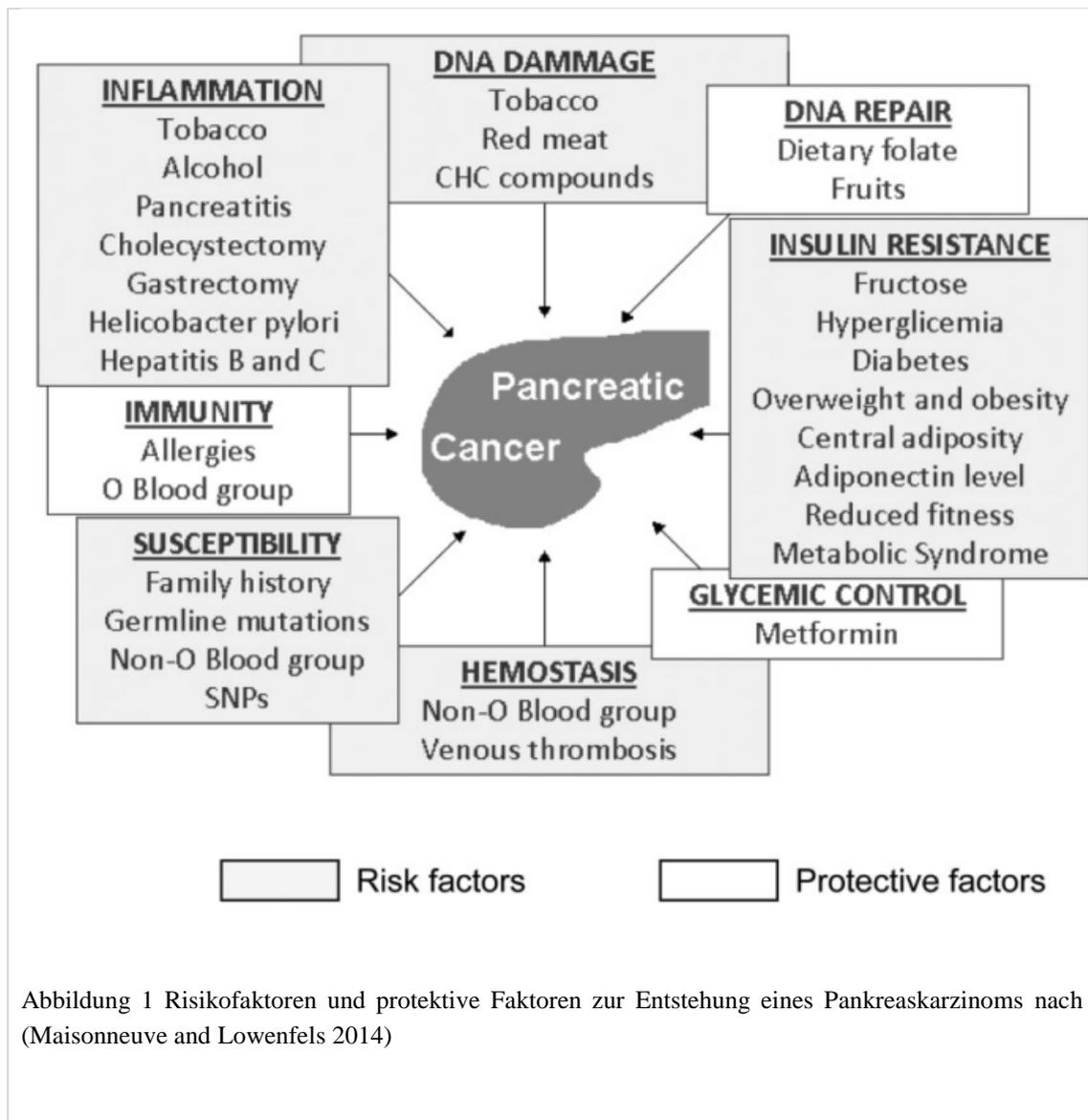
1.2 Risikofaktoren

Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist wie bei vielen Krebsarten der Konsum von Tabak. Raucher haben ein doppelt so hohes Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms im Vergleich zur Normalbevölkerung (Schulte 2013, Maisonneuve and Lowenfels 2014).

Bis vor einiger Zeit galt ein moderater bis erhöhter Alkoholkonsum per se nicht unbedingt als Risikofaktor. Allerdings kann sich durch den Alkoholkonsum eine chronische Pankreatitis entwickeln. Bei diesen Patienten ist nach einer 5 jährigen Erkrankungsdauer mit einem etwa 14fach höheren Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms zu rechnen (Lowenfels, Maisonneuve et al. 1993). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass ein Konsum von mehr als 3 Gläsern Alkohol pro Tag das Entstehungsrisiko des Pankreaskarzinoms um 20 % erhöht (Maisonneuve and Lowenfels 2014).

Als weitere Risikofaktoren gelten langjähriger Diabetes mellitus, Adipositas, eine Infektion mit *Helicobacter pylori*, sowie eine faserarme, aber fettreiche Ernährung (Schulte 2013).

Des Weiteren gibt es mittlerweile vermehrt Hinweise darauf, dass zwischen der Inzidenz des Pankreaskarzinoms, dem Betrag an UV-B Strahlung und dem Vitamin D-Wert im Blut eine inverse Korrelation besteht (Mohr, Garland et al. 2010).



Neben Umweltfaktoren spielen bekanntermaßen auch genetische, beziehungsweise familiäre Faktoren eine Rolle. Durch große Meta-Analysen konnte gezeigt werden, dass das relative Risiko für Personen, bei denen bereits ein Fall von Pankreaskarzinom in der Familie aufgetreten ist, auf 1,8 erhöht ist. Letztendlich machen diese Erkrankungsfälle aber nur ca. 1% aller Pankreaskarzinome aus (Permuth-Wey and Egan 2009).

Ferner prädisponieren auch verschiedene Tumorsyndrome für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms. So zum Beispiel das Peutz-Jeghers-Syndrom (betroffene Genmutation: STK11/LKB1) (Herold 2012) oder das familiäre atypische multiple Muttermal und Melanom (FAMMM)-Syndrom (betroffenes Gen: CDKN2A) (Langer and Bartsch 2013).

Erkrankungen wie die zystische Fibrose oder die autosomal-dominant vererbte hereditäre Pankreatitis, führen zu einer chronischen Entzündung der Bauchspeicheldrüse und einer Fibrosierung des Gewebes. Diese Reaktionen erhöhen ebenfalls das Risiko der Entstehung eines Pankreaskarzinoms (Langer and Bartsch 2013).

Tumorsyndrom	Gen	PC-Risiko bis zum 70. Lj. in %
Peutz-Jeghers	LKB1	36
FAMMM	CDKN2a	17
HBOC	BRCA1, BRCA2	3-8
Li-Fraumeni	TP53	< 5
HNPCC	MLH1, MSH2	< 5
FAP	APC	< 5
Ataxia telangiectasia	ATM	< 5
Hereditäre Pankreatitis	PRSS1, SPINK1	40
Zystische Fibrose	CFTR	< 5
FPC	BRCA2, PALB2, ...?	~ 40
PC = Pankreaskarzinom, FAMMM = familiäres atypisches Multiple-Mole-Melanome-Syndrom, HBOC = hereditärer Brust- und Eierstockkrebs, HNPCC = hereditäres nicht Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom, FAP = familiäre adenomatöse Polyposis, FPC = familiäres Pankreaskarzinom		

Tabelle 2 Überblick über genetische Ursachen des Pankreaskarzinoms aus „Erkrankungen des Pankreas“ Seite 341 (Langer and Bartsch 2013)

1.3 Pathophysiologie

Als Vorstufen des Adenokarzinoms oder Präkanzerosen gelten vor allem die sogenannten Pankreatischen intraepithelialen Neoplasien/ PanINs. Man unterscheidet hier weiter in PANin-1A, -1B, 2 und 3 Läsionen. Diese Vorstufen können allerdings nur mikroskopisch differenziert werden (Schulte 2013).

Als makroskopische Vorstufen zystischer Erkrankungen kann man IPMN (intraduktal papilläre muzinöse Neoplasien) oder auch muzinös zystische Neoplasien (MCN) finden (Singh and Maitra 2007).

1.4 Klinik

Da die frühen Stadien der Erkrankung meist klinisch inapparent verlaufen, befinden sich Patienten, die die folgenden Symptome aufweisen, meist schon in einem fortgeschrittenen Erkrankungszustand (Li, Xie et al. 2004).

Die häufigsten Symptome bei Patienten mit Pankreaskarzinom sind abdominelle Schmerzen, Ikterus und Gewichtsverlust (Ghaneh, Costello et al. 2007, Krug and Gress 2013).

Der Gewichtsverlust kommt wie bei der chronischen Pankreatitis auch aufgrund der Maldigestion durch die exokrine Insuffizienz zustande. Zusätzlich tritt wie bei vielen Karzinomen im späteren Verlauf auch noch die Tumorkachexie hinzu (Ghaneh, Costello et al. 2007).

Im weiteren Verlauf machen sich dann die Folgen der endokrinen und exokrinen Pankreasinsuffizienz, wie zum Beispiel Glukoseintoleranz, bemerkbar (Krug and Gress 2013).

Symptome	% der Patienten
Asthenie	86
Gewichtsverlust	85
Inappetenz	83
Schmerz	79
Dunkler Urin	59
Ikterus	56
Übelkeit	51
Rückenschmerz	49
Diarrhöen	44
Erbrechen	33
Pruritus	32
Steatorrhö	25
Thrombophlebitis	3

Tabelle 3 Erstsymptome maligner Erkrankungen des Pankreas nach Häufigkeit geordnet. Nach (Porta, Fabregat et al. 2005, Krug and Gress 2013)

1.5 Diagnostik und Staging

Wie erwähnt ist eine frühe Diagnosestellung in einem noch potenziell kurativen Stadium zumeist nicht mehr möglich. Wichtig sind natürlich an erster Stelle eine genaue Anamneseerhebung und eine ausführliche klinische körperliche Untersuchung (Krug and Gress 2013). Hinweise darauf, dass der Tumor bereits symptomatisch geworden ist, können ein Ikterus, Schmerzen oder ein neu aufgetretener Diabetes mellitus sein (Mihaljevic and Friess 2011). Die Schwierigkeit der Diagnosestellung spiegelt sich auch in der aktuellen Leitlinie wider. Demnach „existiert keine Literatur, die beantwortet, welche Symptome alleine und in welcher Kombination und ab welchem Alter an ein Pankreaskarzinom denken lassen sollten“ (Seufferlein 2013).

Folgende Empfehlungen zur Initiierung weiterführender Diagnostik wurden aber in der aktuellen S3-Leitlinie herausgegeben und sind hier wörtlich zitiert (Seufferlein 2013):

- Neu aufgetretene Oberbauch- und Rückenschmerzen sollten diagnostische Untersuchungen auslösen, die die Diagnose eines Pankreaskarzinoms erlauben.
- Ein neu aufgetretener oder bestehender Typ-2-Diabetes bei fehlenden weiteren Symptomen im Sinne eines Pankreaskarzinoms sollte keine diagnostischen Untersuchungen für ein Pankreaskarzinom auslösen.
- Ein neu aufgetretener schmerzloser Ikterus sollte diagnostische Untersuchungen für ein Pankreaskarzinom auslösen.
- Eine akute Pankreatitis unklarer Ätiologie sollte in bestimmten Fällen (Patienten > 50 Jahre mit erstmaliger „idiopathischer“ Pankreatitis) zusätzliche Maßnahmen zur Diagnose eines Pankreaskarzinoms auslösen.

Wenn anhand der genannten Punkte der Verdacht auf einen Tumor des Pankreas besteht, erfolgt eine weitere Abklärung. Zu diesem Zweck haben sich besonders die Oberbauchsonographie, die Endosonographie, die Bildgebung mit CT oder MRT, sowie die ERCP beziehungsweise MRCP etabliert (Michl, Pauls et al. 2006). Die MRCP ist mittlerweile so sensitiv wie die ERCP, und ist der ERCP vorzuziehen (Adamek, Albert et al.), da durch die Prozedur der ERCP eine akute Pankreatitis ausgelöst werden kann (Arata, Takada et al. 2010).

Momentan gilt es noch als umstritten das FDG-PET zur frühen Diagnosefindung heranzuziehen. Auch muss von Fall zu Fall abgewogen werden, ob es dem Patienten einen

relevanten Vorteil bringt, einzelne Metastasen durch ein PET/CT aufdecken zu wollen. Bei unklarer Diagnose kann das PET allerdings entscheidende Hinweise dafür liefern, ob eine Läsion benigne oder maligne ist. Für die sonstige Diagnostik und Staging sind momentan das CT und die EUS noch überlegen (Pakzad, Groves et al. 2006).

Zur weiteren Diagnostik, und vor allem für das Follow-Up, kann man beim Patienten die Werte der Tumormarker bestimmen. Für das Pankreaskarzinom gibt es einige Moleküle, die dafür in Frage kommen, wie zum Beispiel CEA (carcinomembryonic antigen), CA 242, CA 50, Span-1, M2-Pyruvatkinase, oder Dupan-2 (Goonetilleke and Siriwardena 2007). Trotz intensiver Suche nach neuen und akkurateren Parametern gilt nach wie vor das CA 19-9 (carbohydrate antigen) als Standard für das Pankreaskarzinom (Haas, Albiin et al. 2013). Haas et al. geben eine mittlere Sensitivität von 81 % bei einer mittleren Spezifität von 90 % für CA 19-9 als Tumormarker beim PDA an, wodurch es den übrigen Parametern überlegen ist und damit als Standard fungiert (Haas, Albiin et al. 2013). CA 19-9, das primär als Tumormarker für das Kolorektale Karzinom untersucht wurde (Koprowski, Steplewski et al. 1979), ist aber kein exklusiver Marker für das Pankreaskarzinom. Der CA 19-9-Wert ist ebenfalls erhöht bei Karzinomen des Magens, der Leber, der Gallenblase, des Urothels, und anderen mehr. Auch benigne Erkrankungen wie Pankreatitis, Leberzirrhose, Cholangitis und obstruktiver Ikterus können deutlich erhöhte Werte für CA 19-9 zeigen (Duffy, Sturgeon et al. 2010). Ein weiteres Manko dieses Tumormarkers ist, dass Patienten, denen das Blutgruppenmerkmal Lewis a/b fehlt, CA 19-9 nicht exprimieren können. Davon sind insgesamt ca. 5 % der Bevölkerung betroffen (Itzkowitz and Kim 1986, Duffy, Sturgeon et al. 2010).

Generell lässt sich sagen, dass sich die Tumormarker beim Pankreaskarzinom nicht zum Screening oder der Früherkennung eignen, wie es beispielsweise beim Prostatakarzinom eher der Fall ist. Der beim Prostatakarzinom zu bestimmende Tumormarker ist das Prostataspezifische Antigen (PSA) (Lacher and Hughes 2015), das nur von natürlichen oder malignen Zellen der Prostata gebildet wird (Wang, Papsidero et al. 1981). Allerdings haben Tumormarker beim Pankreaskarzinom durchaus ihre Berechtigung zur Rezidivkontrolle nach Tumorresektion und zur Überprüfung des Ansprechens auf eine Chemotherapie (Haas, Albiin et al. 2013). Laut neueren Studien lässt sich anhand der Höhe des Parameters CA 19-9 sogar eine Prognose für den Krankheitsverlauf voraussagen. So sprechen Werte > 100 U/ml für einen nicht mehr resektablen Tumor, der wahrscheinlich auch schon Metastasen gebildet hat. Werte < 37 U/ml lassen den Patienten

hingegen auf eine verlängerte Überlebensprognose von 32-36 Monaten hoffen (Ballehaninna and Chamberlain 2012).

1.6 Therapie

Laut aktueller S3-Leitlinie ist „[d]ie chirurgische Therapie [...] das einzige potentiell kurative Therapieverfahren beim Pankreaskarzinom“ (Seufferlein 2013). Doi et al. konnten zeigen, dass nach einer chirurgischen Resektion die Überlebensrate bei Patienten mit lokal invasivem Pankreaskarzinom signifikant gegenüber einer Radiochemotherapie überlegen war (Doi, Imamura et al. 2008).

Eine chirurgische Resektion ist meist nur dann sinnvoll durchführbar, wenn das Karzinom noch lokal begrenzt ist und keine Fernmetastasen gebildet hat (Hackert and Hartwig 2013). Jedoch zeigen auch Patienten, bei denen nur eine R1-Resektion möglich ist, eine höhere Überlebensrate, als nicht resezierte Patienten (5-Jahres Überlebensrate bei R1-Resektionen 7%, bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen 0.4%) (Konstantinidis, Warshaw et al. 2013). Letztendlich ist die Entscheidung für eine Resektion individuell zu treffen und abhängig von verschiedenen anderen Faktoren, wie Komorbiditäten und Alter des Patienten. Allerdings sollte man Patienten in hohem Alter (> 80 Jahre) per se die OP nicht vorenthalten, da auch bei dieser Gruppe die Prozedur gut und sicher durchführbar ist (Makary, Winter et al. 2006).

1.6.1 Partielle Pankreatikoduodenektomie

Für die Resektion des Tumors stehen verschiedene Operationstechniken und Vorgehensweisen zur Verfügung. Bei Tumoren im Bereich des Pankreaskopfes stellt die partielle Pankreatikoduodenektomie das derzeitige Standardvorgehen dar (Hackert and Hartwig 2013). Dabei gibt es zwei wichtige Verfahren, die laut Studienlage als etwa gleichwertig angesehen werden können (Tran, Smeenk et al. 2004).

Bei der Operation nach Walther Kausch (Kausch 1912) und Allen O. Whipple (Whipple, Parsons et al. 1935) wird nach einer initialen Explorationsphase und Darstellung relevanter Strukturen im Wesentlichen die Gallenblasen reseziert, der Magen im distalen Drittel abgesetzt, das Pankreas im Bereich des Korpus durchtrennt (je nach Ausbreitung des Tumors) und schließlich zusammen mit dem Duodenum reseziert. Die letzte Etappe der Operation ist die Rekonstruktionsphase. Das Pankreas wird mit einer Jejunalschlinge

End-zu-Seit anastomosiert (Pankreatikojejunostomie). Anschließend wird bei der Hepatikojejunostomie aboral der Pankreatikojejunostomie die Jejunalschlinge mit dem Gallengang verbunden. Im letzten Schritt wird der Magen ca. 40 cm nach der Hepatikojejunostomie mit der Jejunalschlinge anastomosiert (Gastrojejunostomie) (Weitz, Koch et al. 2004).

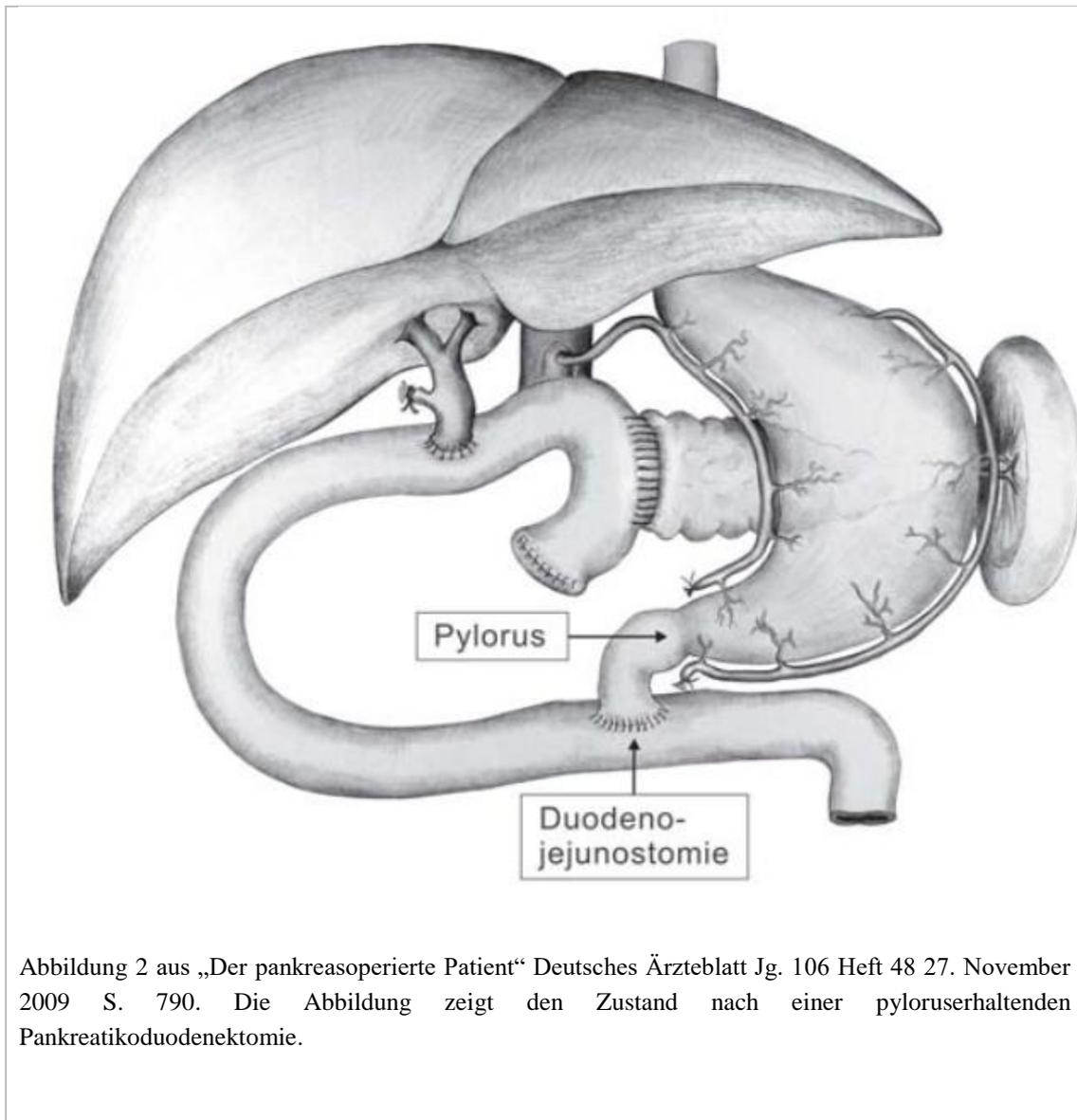


Abbildung 2 aus „Der pankreasoperierte Patient“ Deutsches Ärzteblatt Jg. 106 Heft 48 27. November 2009 S. 790. Die Abbildung zeigt den Zustand nach einer pyloruserhaltenden Pankreatikoduodenektomie.

Bei der pyloruserhaltenden Pankreatikoduodenektomie nach L. William Traverso und William P. Longmire wird der Magen nicht im unteren Drittel abgesetzt, sondern das Duodenum nach dem Pylorus abgesetzt (Traverso and Longmire 1978). Heutzutage wird im klinischen Alltag die pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie nach Traverso-Longmire der klassischen Operation nach Kausch-Whipple gegenüber bevorzugt (Schmied, Schmitz-Winnenthal et al. 2004, Glanemann, Bahra et al. 2008).

1.6.2 Pankreas-Linksresektion

Die Pankreas-Linksresektion ist eine Operationsvariante für Karzinome, die im Korpus oder Kauda des Pankreas lokalisiert sind. Der entsprechende Abschnitt kann mit oder ohne gleichzeitiger Splenektomie reseziert werden. Zusätzlich werden wie bei allen anderen Operationen auch, die betroffenen Blut- und Lymphgefäße entfernt. Der Milzerhalt birgt ein geringeres postoperatives Risiko, als die Splenektomie. Eine sehr seltene Komplikation wäre die sogenannte OPSI (overwhelming postsplenectomy infection) (Mihaljevic and Friess 2011).

1.6.3 Totale Pankreatektomie

Bereits 1954 beschrieb Donald Ross (Ross 1954), und 4 Jahre später Milton Porter (Porter 1958) die totale Pankreatektomie. Die vollständige Entfernung des Pankreas hat den Vorteil, dass es nicht wie bei den anderen Prozeduren zu der gefürchteten Pankreas-Anastomosensuffizienz kommen kann, wodurch dem Patienten wiederum weitreichende Komplikationen entstehen können. Lange Zeit galt diese Operationsvariante jedoch als nicht praktikabel für den Patienten, da vor allem der Glukosestoffwechsel und die Verdauung nicht zufriedenstellend medikamentös eingestellt werden konnten. Heutzutage sollte die totale Pankreatektomie durchaus wieder als eine Möglichkeit der Therapie in Betracht gezogen werden, da das perioperative Management große Fortschritte gezeigt hat, und sowohl die Mortalitätsrate, als auch die Morbiditätsrate sich nicht signifikant von der Whipple'schen-OP unterscheiden (Muller, Friess et al. 2007).

1.6.4 Chemotherapie

Mehrere große randomisierte Studien konnten zeigen, dass die adjuvante Chemotherapie einen Vorteil im Hinblick auf das krankheitsfreie Überleben für Patienten nach kurativer chirurgischer Versorgung darstellt (Oettle, Post et al. 2007, Ueno, Kosuge et al. 2009, Oettle, Neuhaus et al. 2013, Macarulla, Fernandez et al. 2017). Das erste zugelassene Therapeutikum im adjuvanten Bereich war Gemcitabin, das sich im Hinblick auf Symptomkontrolle und Überlebensvorteil gegenüber 5-Fluoruracil durchsetzte (Burris, Moore et al. 1997). Bis heute gilt Gemcitabin noch als das Mittel der Wahl, da es im Vergleich zu anderen Therapieregimen (zum Beispiel Kombinationen aus 5-Fluoruracil, Folsäure, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX)) ein geringeres

Nebenwirkungsprofil und Toxizität zeigt (Neoptolemos, Stocken et al. 2010, Conroy, Desseigne et al. 2011, Kleeff, Korc et al. 2016). In der letzten Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC-4) konnte gezeigt werden, dass aber eine Kombination aus Gemcitabin und Capecitabin einer Gemcitabin-Monotherapie im Hinblick auf das Gesamt-Überleben signifikant überlegen ist (Neoptolemos, Palmer et al. 2017). Dieses Therapieregime hat bereits Einzug in die Leitlinie der American Society of Clinical Oncology (ASCO) Einzug gehalten.

Meta-Analysen haben gezeigt, dass Patienten mit einem primär resektablen Tumor eine ähnliche Überlebensrate nach neoadjuvanter Therapie, wie solche nach primärer Resektion und anschließender adjuvanter Therapie aufweisen (Gillen, Schuster et al. 2010). Derzeit kommt die neoadjuvante oder perioperative Therapie vor allem bei grenzwertig resektablen oder lokal fortgeschrittenen nicht-resektablen Karzinomen zum Einsatz (Neoptolemos, Kleeff et al. 2018). Hierbei wurde vor allem FOLFIRINOX als Mittel der Wahl etabliert (Ferrone, Marchegiani et al. 2015, Nitsche, Wenzel et al. 2015). Unter neoadjuvanter Therapie mit FOLFIRINOX kommt es seltener zu perineuraler Invasion und einem weniger ausgeprägten Lymphknotenbefall (Schorn, Demir et al. 2018). Da aufgrund der Datenlage in diesem Bereich noch keine eindeutigen Empfehlungen existieren, wurden mehrere Phase-III-Studien initiiert, die sich mit dem Thema der neoadjuvanten Chemotherapie beim Pankreaskarzinom beschäftigen. Die NEOPAC Studie beispielsweise vergleicht die adjuvante Gabe von Gemcitabin mit der neoadjuvanten Gabe von Gemcitabin/Oxaliplatin und zusätzlich adjuvant Gemcitabin (Heinrich, Pestalozzi et al. 2011). In der PREOPANC Studie wird in ähnlicher Weise eine neoadjuvante Radiochemotherapie bei Patienten mit resektablem oder grenzwertig-resektablem Karzinom untersucht (Versteijne, van Eijck et al. 2016).

Im Bereich der palliativen Chemotherapie, die für Patienten mit metastasiertem Karzinom oder nicht-resektablem Tumor vorgesehen ist, war bis 2011 auch Gemcitabin das Standardpräparat (Burris, Moore et al. 1997, Neoptolemos, Kleeff et al. 2018). Aktuell empfehlen die Leitlinien der ASCO bei einem ECOG Wert von 0–1 FOLFIRINOX oder Nabpaclitaxel/Gemcitabin, und Gemcitabin als Monotherapie bei einem ECOG Wert von 2 (Conroy, Desseigne et al. 2011, Von Hoff, Ervin et al. 2013, Neesse, Michl et al. 2014, Sohal, Mangu et al. 2016).

1.6.5 Radiotherapie

Bislang wird bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms postoperativ standardmäßig keine zusätzliche Bestrahlung durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass dies dem Patienten keinen nennenswerten Überlebensvorteil bringt (Neoptolemos, Stocken et al. 2004, Liao, Chien et al. 2013).

Neoadjuvant, also vor der operativen Entfernung des Tumors, wird eine kombinierte Radiochemotherapie hauptsächlich bei Patienten mit „grenzwertig resektablen Karzinomen“ und „mutmaßlich lymphogen, jedoch noch regional begrenzt metastasierten Karzinomen“ durchgeführt. Ebenso ausschlaggebend ist auch der zu erwartende zirkumferentielle Sicherheitsabstand. Falls sich durch die Bildgebung herausstellt, dass dieser zu erwartende Sicherheitsabstand weniger als 1mm misst, können die Patienten ebenfalls präoperativ bestrahlt werden (Hohenberger, Brunner et al. 2013).

1.6.6 Neue Therapieansätze

Nach wie vor wird auf dem Feld der Therapie des Pankreaskarzinoms fieberhaft nach neuen Methoden geforscht. Gegenstand der Forschung sind dabei zum Beispiel der Angiogenese Inhibitor TNP 470 (Hotz, Reber et al. 2001), Antikörper gegen HER2/neu, die bereits erfolgreich in der Behandlung des Mammakarzinoms verwendet werden (Buchler, Reber et al. 2001), oder auch die sogenannte Tumorzellvaksinierung, bei der durch hochgereinigte virusmodifizierte, nicht mehr teilungsfähigen Tumorzellen die zelluläre Immunantwort des Patienten induziert werden soll (Schmied, Schmitz-Winnenthal et al. 2004).

Bislang ist es allerdings bei keinem der Ansatzpunkte zu einem durchschlagenden Erfolg gekommen.

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass das Molekül β III-Tubulin generell eine wichtige Rolle in der Tumorzellbiologie spielt. Besonders beim Adenokarzinom des Pankreas ist β III-Tubulin im Vergleich zu gesunden Zellen deutlich erhöht (Lee, Cao et al. 2007). *In vitro* und *in vivo* Versuche haben gezeigt, dass durch die Unterdrückung der Expression von β III-Tubulin das Tumorwachstum und die Häufigkeit von Metastasen deutlich zurückgegangen ist (McCarroll, Sharbeen et al. 2014). Es bleibt abzuwarten, ob dieser vielversprechende Ansatz auch in der Praxis ähnlichen Erfolg verbuchen kann.

2. Chronische Pankreatitis

2.1 Epidemiologie

Exakte Daten über die Epidemiologie der chronischen Pankreatitis zu gewinnen, ist aufgrund des Patientenguts nicht immer einfach durchzuführen. Laut einer Studie aus Frankreich, bei der Gastroenterologen zu Patienten mit CP befragt wurden, liegt die Prävalenz bei 26,4/100.000 und die Inzidenz bei 7,7/100.000 (Levy, Barthet et al. 2006). Hingegen gibt eine Studie aus den USA, bei der die Patientendaten anhand von Akten aus Versorgungszentren gewonnen wurden, die Prävalenz mit 41,76 /100.000 und die Inzidenz mit 4,05/100.000 an (Yadav, Timmons et al. 2011).

Patienten mit chronischer Pankreatitis haben eine um das 3,6 fache erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zur Normalbevölkerung. Bei einem betrachteten Zeitraum von 10 Jahren beträgt die Überlebensrate 70 %, bei 20 Jahren nur noch 45 % (Lowenfels, Maisonneuve et al. 1994).

2.2 Risikofaktoren und Ätiologie

Der häufigste Auslöser einer chronischen Pankreatitis ist in 70-85 % ein hoher regelmäßiger Alkoholkonsum (Strobel 2013). Allerdings spielen bei der Entstehung der Krankheit auch genetische Faktoren eine große Rolle, sodass ein Schwellenwert für den Alkoholkonsum nicht angegeben werden kann (Whitcomb 2012). Dieser Umstand spiegelt sich auch darin wider, dass nur etwa 3 % der Alkoholiker eine chronische Pankreatitis entwickeln (Yadav, Eigenbrodt et al. 2007). Ein weiterer Risikofaktor sind akute rezidivierende Pankreatitiden, die ebenfalls meist alkoholbedingt auftreten (Klöppel 2013).

Ob das Rauchen ein eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung einer CP ist, bleibt umstritten. Es ist allerdings bekannt, dass das Rauchen die Krankheitsprogression einer äthyltoxischen chronischen Pankreatitis deutlich beschleunigt. Ebenso zeigen sich bei diesen Patienten mehr Kalzifikationen, als bei den Nichtrauchern (Maisonneuve, Lowenfels et al. 2005).

Wie bereits angesprochen spielen auch genetische Faktoren eine große Rolle in der Ätiologie der chronischen Pankreatitis. Hiervon sind insbesondere Genmutationen im Trypsinogen-Gen, im SPINK1-Gen, im CFTR-Gen und im Chymotrypsin C-Gen betroffen (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012).

Bei der Autoimmunpankreatitis (Typ 1 und 2) kommt es histologisch betrachtet vor allem periduktal zu lymphoplasmazellulären Entzündungsherden (Klöppel, Sipos et al. 2007, Zhang, Chari et al. 2011). Die genaue Pathogenese der autoimmunvermittelten Pankreatitis konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Es wird allerdings angenommen, dass eine immunkomplexvermittelte systemische Erkrankung zugrunde liegt, die vor allem durch IgG4 vermittelt wird. Die AIP stellt sozusagen die organische Manifestation dieser Erkrankung dar (Zhang and Smyrk 2010). Des Weiteren können bei vielen Patienten Autoantikörper z. B. gegen Carboanhydrase II und IV, Trypsinogen und Laktoferrin nachgewiesen werden (Okazaki, Uchida et al. 2000, Bergmann 2013). Die Autoimmunpankreatitis wird vor allem mit einer Steroidtherapie (Prednisolon) sehr erfolgreich behandelt (Haas and Löhr 2013, Hart, Kamisawa et al. 2013). Bisweilen kann auch ein operatives Vorgehen (bei Zweifel an der Diagnose und Verdacht auf ein Pankreaskarzinom), oder eine endoskopische Stenteinlage (bei Verschlussikterus) zur Behandlung nötig werden (Haas and Löhr 2013).

Ob anatomische Besonderheiten, wie z. B. ein Pancreas divisum, prädisponierend für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis ist, kann aktuell nicht abschließend geklärt werden (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012).

Wie bereits erwähnt, ist die chronische Pankreatitis selbst auch ein Risikofaktor für das Pankreaskarzinom (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012).

2.3 Pathophysiologie

Bei der chronischen Pankreatitis kommt es durch die fortwährenden entzündlichen Vorgänge zu einem Umbau des Gewebes in fibrotisches Bindegewebe, und letztendlich zu einem Verfall der exokrinen und endokrinen Funktion des Organs (Strobel 2013). Es kursieren mehrere Hypothesen über den exakten Pathomechanismus, jedoch setzt sich seit einiger Zeit das Konzept der Nekrose-Fibrose-Sequenz durch (Witt 2014). Dabei geht man davon aus, dass enzymatisch inaktive Vorstufen der Verdauungsenzyme (sog. Zymogene), wie Trypsinogen, Chymotrypsin, oder Carboxypeptidasen bereits vorzeitig

im Pankreas aktiviert werden (Rassow, Hauser et al. 2008). Diese und weitere Enzyme wie Lipase, Cholesterin-Esterase, und Amylase gelangen unter anderem in das interstitielle Gewebe und das peripankreatische Fettgewebe. Durch ihre Enzymaktivität bilden sich Fettgewebsnekrosen, wodurch Fettsäuren freigesetzt werden. Diese freien Fettsäuren fördern nun im Sinne eines positiven Feed-back Mechanismus die Aktivierung von Proenzymen im Organ selbst. Dadurch weiten sich die Nekrosefelder immer weiter aus und es kommt damit einhergehend zu einer lokalen Entzündung (Klöppel 2013). Die Nekrosen können resorbiert werden, sich abszedieren, oder aber auch Pseudozysten ausbilden (Klöppel 2013). Dies hat zur Folge, dass sich ruhende pankreatische Sternzellen, auf die im folgenden Kapitel noch ausführlicher eingegangen wird, in ihre aktivierte, myofibroblastenähnliche Form umwandeln (Klöppel, Detlefsen et al. 2004). Als Signalmoleküle, die die Sternzellen zur Aktivierung anregen, kommen vor allem Zytokine wie TGF- β , PDGF, aFGF, bFGF aber auch Ethanol und anderer oxidativer Stress in Betracht (Friess, Yamanaka et al. 1994, Apte, Phillips et al. 2000, Apte, Pirola et al. 2006). Die Aktivierung der Sternzellen hat unter anderem zur Folge, dass sie selbst Komponenten der extrazellulären Matrix bilden (Apte, Haber et al. 1999). Diese sind vor allem Kollagen, Fibronectin und Laminin (Schneider, Schmid-Kotsas et al. 2001). Durch diese Vorgänge kommt es zu einer allmählichen Fibrosierung des Gewebes, wodurch sich auch Unregelmäßigkeiten des Kalibers der Ausführungsgänge ergeben, die zu einer Einschränkung des Sekretflusses führen. Die Stase kann zu einer Aktivierung von Proenzymen führen, sodass die Autodigestion weiter vorangetrieben wird, oder aber auch zu einer Präzipitation von Kalzium führen (Klöppel and Maillet 1992).

Durch die chronische Pankreatitis kommt es aber nicht nur zu einem Funktionsabfall des exokrinen Teils des Pankreas, sondern auch zu Einschränkungen des endokrinen Teils. Als Folge der fortwährenden Entzündung kommt es dabei unter anderem zum Untergang der Langerhansschen Inseln. Die Folge ist ein Mangel an Insulin, Glukagon und Somatostatin. So entsteht dem Patienten durch den Insulinmangel ein Diabetes mellitus Typ 3c (pankreopriver Diabetes mellitus) (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012).

2.4 Klinik

Das häufigste Symptom einer chronischen Pankreatitis ist starker abdomineller Schmerz. Die Schmerzcharakteristik kann dabei ganz unterschiedliche Formen zeigen, wie zum Beispiel brennend, stechend, oder als dumpfer Dauerschmerz mit Schmerzspitzen

(Mullady, Yadav et al. 2011, D'Haese, Hartel et al. 2014). Typischerweise ähnelt die Schmerzausprägung meist der akuten Pankreatitis mit Lokalisation im Epigastrium und gürtelförmiger Ausstrahlung in den Rücken. Zusätzlich werden die Schmerzen häufig von Übelkeit und Erbrechen begleitet (Schütte, Waldthaler et al. 2013). Da derartige abdominelle Schmerzen aber nicht spezifisch für die chronische Pankreatitis sind, sollten sie stets weiter diagnostisch abgeklärt werden.

Ein weiteres Symptom der chronischen Pankreatitis ist die Steatorrhoe. Die Steatorrhoe kann generell Ausdruck einer mangelhaften Aufnahme von Fetten (Malabsorption), oder einer unzureichenden Spaltung der Fette (Maldigestion) sein. Bei der chronischen Pankreatitis kommt es, wie oben angeführt, zu Einbußen der exokrinen Funktion des Pankreas. Es handelt sich daher um eine Maldigestion. Diese macht sich meist erst bemerkbar, wenn die Syntheseleistung für die Verdauungsenzyme auf weniger als 10 % der normalen Syntheseleistung gesunken ist (DiMagno, Go et al. 1973). In diesem Stadium sind dann bereits 80-90 % des Organs durch die Entzündung zerstört (Schütte, Waldthaler et al. 2013). Durch die Maldigestion leiden die Patienten dann auch an Gewichtsabnahme, Diarrhoe und Meteorismus (Herold 2012). Meist kommt es nach etwa 10jährigem Krankheitsverlauf zu Symptomen einer manifesten exokrinen Pankreasinsuffizienz (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012).

Als Ausdruck der endokrinen Insuffizienz leiden viele der Patienten im Laufe der Erkrankung an einem pankreopriven Diabetes mellitus (Typ 3c) (Malka, Hammel et al. 2000, Association 2011). Da allerdings nicht nur die Insulinproduktion von der Erkrankung betroffen ist, sondern auch die des Glukagons, kann es zu gefährlichen Schwankungen des Glukosehaushalts kommen (Schütte, Waldthaler et al. 2013).

2.5 Diagnose

Leider existieren bis dato keine einfachen und zuverlässigen klinischen Tests, sodass es einige Zeit in Anspruch nehmen kann, bis die Diagnose einer chronischen Pankreatitis gesichert ist (Levy, Dominguez-Munoz et al. 2014). Nach ausführlicher Anamnese und körperlicher Untersuchung sollte zunächst eine transabdominelle Ultraschalluntersuchung durchgeführt werden. (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012). Sind die Verhältnisse unklar, sollten zur Abklärung noch eine EUS (Endosonographie), eine MRCP (Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie), sowie eine CT (Computertomographie) erfolgen. Die EUS weist in diesem Zusammenhang die größte

Trennschärfe auf (Catalano, Sahai et al. 2009). Es wird die komplementäre Verwendung von EUS und MRCP empfohlen, da die diagnostische ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) keine weiteren relevanten Daten liefert, aber komplikationsträchtiger ist (Pungpapong, Wallace et al. 2007).

2.6 Therapie

Im akuten Schub der Pankreatitis ist die wichtigste Säule der Behandlung eine rasche und ausreichende Flüssigkeitsgabe, um systemischen Komplikationen vorzubeugen (Gastroenterology, Britain et al. 2005, Banks and Freeman 2006). Des Weiteren sollte auch die Schmerztherapie einen hohen Stellenwert einnehmen. Hierzu kann bei schwereren Fällen sogar auf eine Periduralanalgesie (PDA) zurückgegriffen werden (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012).

Die weitere Therapie der chronischen Pankreatitis ist stark von den jeweiligen Gegebenheiten abhängig und kann konservativ, interventionell oder operativ erfolgen. Sie sind in der aktuellen S3-Leitlinie zur chronischen Pankreatitis im Detail aufgelistet (Hoffmeister, Mayerle et al. 2012). Generell lässt sich aber sagen, dass bei einem unkomplizierten Verlauf eher zur endoskopischen Therapie geraten wird (Seicean and Vultur 2015).

3. Sternzellen

3.1 Entdeckung

Als Erstbeschreiber der Sternzellen der Leber (HSC) gilt Karl Wilhelm von Kupffer (geb. 14.11.1829 in Lesten, gest. 16.12.1902 in München). Kupffer war zuletzt Leiter der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität in München, entdeckte die Sternzellen aber schon während seiner Zeit als Leiter der Anatomischen Anstalt in Kiel 1876 (Kupffer 1876, Wake 2004).

Kupffers eigentliches Ziel war es „die Nerven der Leberläppchen nachzuweisen“. Hierfür bediente er sich einer Färbemethode mit Goldchloridlösung nach Gerlach. Bei dieser Färbung entdeckte er schließlich schwarzgefärbte Zellen in Lebergewebe, die in ihrer Gestalt Sternen glichen.

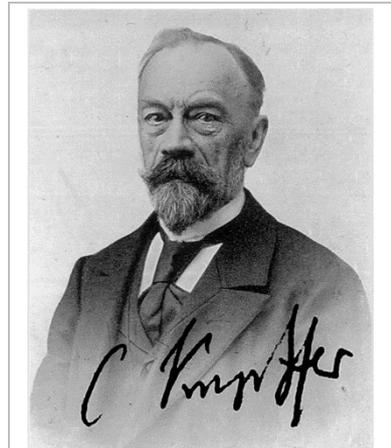


Abbildung 3 Portait Karl Wilhelm von Kupffer aus www.wikipedia.org/wiki/Karl_Wilhelm_von_Kupffer

3.2 Vorkommen

Obwohl Kupffer Sternzellen bereits 1876 im Lebergewebe beschrieben hatte, dauerte es bis 1982, dass Forscher die Zellen auch in Pankreasgewebe bei Mäusen (Watari, Hotta et al. 1982), und erst 1990 in humanem und Pankreasgewebe von Ratten nachweisen konnten (Ikejiri 1990). Heutzutage ist bekannt, dass Sternzellen auch in weiteren Organen, wie zum Beispiel der Lunge, den Nieren, der Milz, dem Ductus deferens und den Stimmbändern zu finden sind. Der Ursprung der Zellen hingegen konnte bis heute noch nicht endgültig geklärt werden (Erkan, Adler et al. 2012).

3.3 Bedeutung und Funktion

Eine charakteristische Eigenschaft der Sternzellen ist die Speicherung von Vitamin A in Form von Lipidtropfen. Diese Einschlusskörperchen deutete Kupffer damals in einer Publikation als Erythrozyten oder Fragmente von Erythrozyten, die durch Phagozytose aufgenommen worden seien (Kupffer 1899).

Lange Zeit herrschte in der Fachwelt eine gewisse Unklarheit über die Definition der Sternzellen. Kenjiro Wake zeigte 1971 durch verschiedene Färbemethoden, Fütterung der Versuchstiere mit Vitamin A, und Elektronenmikroskopie schließlich die Unterschiede zwischen Kupffer-Zellen (phagozytotische Zellen), Sternzellen und endothelialen Zellen in der Leber (Wake 1971).

Nach aktueller Definition sind Sternzellen myofibroblasten-ähnliche Zellen, die im exokrinen Teil des Pankreas vorkommen. Man findet sie vornehmlich periazinär, periduktal, und perivaskulär (Omary, Lugea et al. 2007). Unterscheidungsmerkmale zu normalen Fibroblasten sind die Vitamin A speichernden Lipidvesikel im Zellinneren, die man im Phasen-Kontrast-Mikroskop, Elektronenmikroskop, oder aber auch anhand ihrer Autofluoreszenz (unter ultraviolettem Licht bei 328 nm) nachweisen kann. Des Weiteren weisen sie ein charakteristisches Färbeverhalten auf. In ihrer ruhenden Form sind die Zellen positiv für Vimentin, Desmin und GFAP, hingegen negativ für α -SMA. Werden sie nach einiger Zeit in Kultur, oder durch äußere Einflüsse aktiviert, so werden sie auch positiv für α -SMA, und die Lipidvesikel verschwinden (Apte, Haber et al. 1998, Bachem, Schneider et al. 1998).

	Quiescent	Activated
Morphologic features		
Vitamin A autofluorescence	+ (in fat droplets)	Absent or remnant
Endoplasmic reticulum	+	++
Nucleus	Basal size	Enlarged
Molecular markers^A		
Vimentin	++	++
Desmin	+	+
GFAP	+	+
Nestin	+	++
α -SMA	–	+
Properties		
ECM production	Limited	Prominent
Cell proliferation	Limited	Increased
Cell migration	Limited	Increased
–, absence; +, presence; ++, present at high levels. ^A Upon isolation of PaSCs, there is heterogeneity of marker expression that might reflect multiple states of activation or differentiation, or different pools of fibrogenic cell type. Although 100% of cultured PaSCs isolated from rat pancreas express vimentin, only 20%–40% of them express desmin. The use of PaSC markers can suffer from similar limitations noted for HSC markers. For example, 70%–80% of rat HSCs express desmin, whereas human HSC seem to lack desmin expression		

Tabelle 4 stellt die Eigenschaften ruhender und aktivierter Sternzellen gegenüber (“General features of quiescent (inactive) and activated PaSCs“) aus (Omary, Lugea et al. 2007)

4. Desmoplasie

Unter Desmoplasie oder desmoplastischer Reaktion eines Gewebes versteht man Umbauvorgänge eines Gewebes hin zu fibrotischem Gewebe aufgrund von Tumorerkrankung oder chronischer Entzündung. Wie bereits erwähnt ist der desmoplastische Umbau ein integraler Bestandteil der Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms (Bachem, Zhou et al. 2008). Dabei kommt es um das betroffene Gewebe herum zu einer Aktivierung vor allem von Sternzellen, die daraufhin extrazelluläre Matrix (ECM) produzieren. Die Komponenten der Extrazellulären Matrix sind vor allem Kollagen, Fibronectin und Laminin (Schneider, Schmid-Kotsas et al. 2001). Die Sternzellen haben darüber hinaus die Fähigkeit Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Tissue Inhibitor of MetalloProteinases (TIMP 1/2) zu produzieren. Das bedeutet, dass sie sowohl dazu fähig sind fibrotisches Gewebe zu produzieren, als auch aufzulösen. Diese auf den ersten Blick widersprüchlich anmutende Eigenschaft lässt sich folgendermaßen erklären. Beim Gesunden befinden sich die

Sternzellen überwiegend im ruhenden Zustand und sezernieren beiderlei Komponenten gleichermaßen, wodurch sich das Gewebe in einem Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau befindet. Werden nun die Sternzellen aktiviert, so verschiebt sich dieses Gleichgewicht in Richtung der ECM-Proteine. Vereinfacht gesagt kommt es zu einer stärkeren Fibrogenese, als zu einer Degradierung des fibrotischen Gewebes (Phillips, McCarroll et al. 2003).

Dies führt zu einem Umbau des Gewebes in einen Zustand, der dem Narbengewebe ähnlich ist (Apte, Pirola et al. 2006). Daher rührt beim Pankreaskarzinom auch die derbe weißliche Konsistenz des Gewebes, und man spricht von einem szirrhösen Tumor (Bornhöft 2013). Dabei macht die Desmoplasie ungefähr 80% der Tumormasse des Pankreaskarzinoms aus (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2010).

Mittlerweile wird angenommen, dass die PSC durch sehr komplexe Wechselbeziehungen zu den Tumorzellen das Voranschreiten und die Invasivität des Karzinoms unterstützen (Bachem, Zhou et al. 2008). Auch spielen sie eine große Rolle bei der Tumorangiogenese und der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Xu, Pothula et al. 2014).

Aufgrund dieser Tatsachen ist es äußerst wichtig, mehr Informationen über die Funktion der Sternzellen zu gewinnen und sie als mögliches Ziel einer Therapie zu identifizieren.

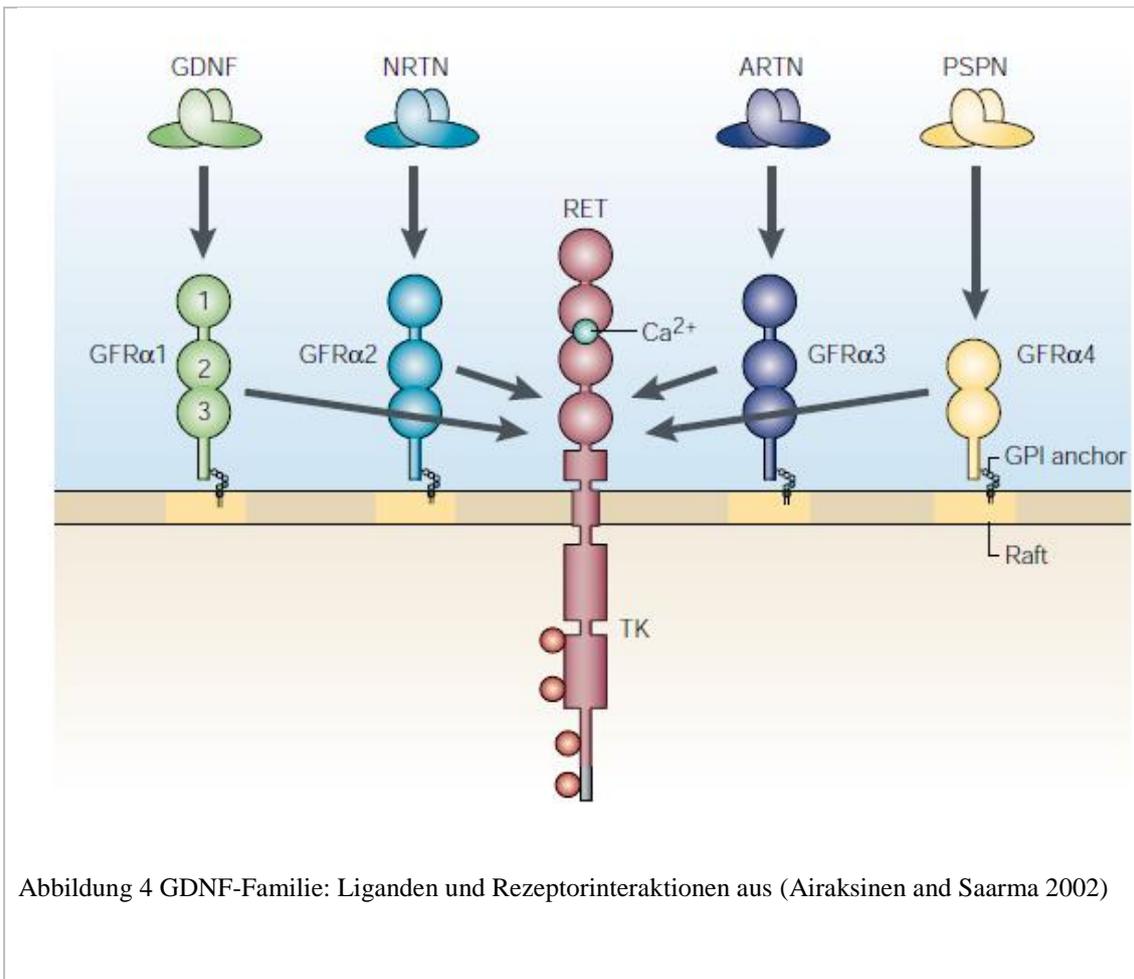
5. Neurale Veränderungen und neuropathischer Schmerz

Ein kennzeichnendes Merkmal des Pankreaskarzinoms und der chronischen Pankreatitis ist der abdominelle Schmerz (Li, Xie et al. 2004, Schütte, Waldthaler et al. 2013). Histologisch betrachtet kommt es zu einer Zunahme der Nervendichte mit gleichzeitiger neuraler Hypertrophie (Zunahme des Nervendurchmessers), Entzündung der Nerven und Einwanderung von Tumorzellen sowohl in intrapankreatische Nerven, als auch in den extrapankreatischen Nervenplexus (Ceyhan, Demir et al. 2009, Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Die Ursache des Schmerzes ist also nicht nur auf eine Nozizeption, sondern vor allem auf eine Schädigung sensorischer Nervenstrukturen zurückzuführen. Dies bezeichnet man als neuropathischen Schmerz (Birklein 2002).

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass unter anderem neurotrophe Faktoren für derartige Veränderungen an den Nerven verantwortlich sein können (Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Besonders GDNF und Artemin werden beim Pankreaskarzinom im Vergleich zum gesunden Gewebe deutlich stärker exprimiert (Funahashi, Takeyama et al. 2003, Ceyhan, Giese et al. 2006). Auch werden von den Tumorzellen GFR α 1 und RET gebildet, was ein Hinweis darauf sein könnte, wie die Tumorzellen mit den Nerven interagieren (Funahashi, Takeyama et al. 2003). Bei manchen Pankreaskarzinomzelllinien konnten auch erhöhte Werte des neurotrophen Faktors nerve growth factor (NGF) festgestellt werden. Dieser Faktor ist unter anderem ein Ligand von TrkA (tropomyosin-related kinase A), einer Rezeptor-Tyrosinkinase, die auch im Perineurium vorzufinden ist. Durch eine parakrine Stimulation könnte so das Nervenwachstum, die neurale Invasion der Tumorzellen und die Schmerzwahrnehmung angeregt werden (Zhu, Friess et al. 1999, Zhu, Friess et al. 2001).

6. Neurotrophe Faktoren

Die GDNF-Gruppe (glial cell line-derived neurotrophic factor) beinhaltet sehr potente neurotrophe Faktoren. Diese sind im einzelnen GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin. Ihre zugehörigen Rezeptoren sind GFR α 1-4 (GDNF family receptor). GFR α 1-4 fungieren als Ko-Rezeptoren und aktivieren zusammen mit ihrem Liganden die Rezeptor Tyrosin Kinase (RET) (Durbec, Marcos-Gutierrez et al. 1996).



Die neurotrophen Faktoren der GDNF-Familie binden als Homodimere an ihren jeweils bevorzugten Liganden und aktivieren zusammen die RET-Tyrosinkinase (durch Pfeile markiert). Die GFR α sind durch einen GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol) mit der Zellmembran verbunden. Bis auf GFR α 4 verfügen sie über 3 Cysteinereiche Abschnitte (1,2,3)

6.1 GDNF

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) ist als erstes Protein der GDNF-Gruppe zu Beginn der 1990iger Jahre entdeckt worden (Vastag 2010). Es fördert als neurotropher Faktor vor allem das Überleben dopaminerger Nervenzellen, und das Wachstum ihrer Neuriten (Lin, Doherty et al. 1993). Da der Effekt, den GDNF auf das Wachstum der Nervenzellen ausübt, sehr deutlich ausfiel, behandelte man sogar an Morbus Parkinson erkrankte Patienten mit intrakraniellen Infusionen von GDNF (Gill, Patel et al. 2003).

In der Entwicklung des Pankreas spielt GDNF eine herausragende Rolle bei der Ausbildung der Innervation des Organs, indem es die Migration und Differenzierung der neuronalen Zellen steuert (Muñoz-Bravo, Hidalgo-Figueroa et al. 2013). GDNF ist im gesunden Pankreasgewebe in duktalem Zellen und insbesondere in endokrinen Zellen und intrapankreatischen Nerven nachweisbar (Ito, Okada et al. 2005). Wie nachfolgend noch genauer besprochen löst GDNF hauptsächlich über die Bindung an GFR α 1 und RET Signalkaskaden aus (Airaksinen and Saarma 2002). Da all diese Komponenten auch von Karzinomzellen exprimiert werden (Liu, Ma et al. 2011, Liu, Li et al. 2012, Fielder, Yang et al. 2018) konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass GDNF die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms durch Begünstigung der Zellproliferation, der Invasivität, sowie der chemotaktischen Migration vorantreibt (Funahashi, Okada et al. 2005, Sawai, Okada et al. 2005, Ceyhan, Demir et al. 2008, Zeng, Cheng et al. 2008, Liu, Li et al. 2012).

6.2 Neurturin

Neurturin wurde als weiteres Mitglied der GDNF-Familie 1996 identifiziert, und ist zu etwa 40% mit GDNF identisch (Kotzbauer, Lampe et al. 1996). Es ist ein etablierter neurotropher Faktor bei verschiedenen Erkrankungen im Hinblick auf Neuropathie und Neuroplastizität. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Neurturin und sein korrespondierender Rezeptor GFR α 2 beim Pankreaskarzinom und in Gewebe mit chronischer Pankreatitis in deutlich erhöhten Mengen vorzufinden ist (Demir, Wang et al. 2012, Wang, Demir et al. 2014).

Generell werden neurotrophe Faktoren nicht als bereits aktive Formen sezerniert, sondern als sogenannte präpro-Formen in den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums gebildet. Während des Transportes der Proteine durch die Membran des ERs wird das prä-Peptid abgespalten, und das Protein wird als pro-Form bezeichnet. Diese ist immer noch längerkettig als die aktive Form des Proteins. Die pro-Sequenz eines Proteins wird erst abgespalten, wenn das Protein auch in seiner aktiven Funktion wirken soll. Bei einigen neurotrophen Faktoren konnte allerdings gezeigt werden, dass sie auch als pro-Form aktiv an Signalwegen beteiligt sind (Lee, Kermani et al. 2001).

Bei neurotrophen Faktoren der GDNF Gruppe verbinden sich zwei Monomere, nachdem auch die pro-Sequenz abgespalten wurde, zu einem Homodimer und binden so an den jeweiligen Rezeptor (Airaksinen and Saarma 2002).

6.3 Artemin

Artemin ist als neurotropher Faktor wichtig für die Entwicklung und Differenzierung von Nerven in verschiedenen Entwicklungsabschnitten. Zusätzlich fördert es das Überleben eines Nerven (Baloh, Tansey et al. 1998, Andres, Forgie et al. 2001). Artemin wird auch von glatten Muskelzellen entlang der Blutgefäße sezerniert, um die Migration sympathischer Nervenfasern in das jeweilige Zielgewebe zu fördern und zu leiten (Honma, Araki et al. 2002). Es ist außerdem bekannt, dass geschädigte Nerven beim Pankreaskarzinom Artemin sezernieren, um Reperaturmechanismen in Gang zu setzen. Dies hat die negative Folge, dass Tumorzellen möglicherweise auf diesem Wege zur Läsion geleitet werden, und insgesamt die neurale Invasion weiter angeregt wird (Ceyhan, Giese et al. 2006).

6.4 Persephin

Persephin, das einige Ähnlichkeit zu GDNF und NTN aufweist, wurde 1998 erstmals als neurotropher Faktor identifiziert (Milbrandt, de Sauvage et al. 1998). Während ihm im Hinblick auf das Überleben und die Proliferation von Nerven ähnliche Funktionen, wie anderen neurotrophen Faktoren zugeschrieben werden, ist über seine Rolle bei malignen Erkrankungen bis heute noch wenig bekannt (Baba, Sakamoto et al. 2013). Auch zeigte sich, dass Persephin nur in einigen wenigen Gewebeproben von pankreatischem Adenokarzinom nachgewiesen werden konnte (Ito, Okada et al. 2005).

6.5 GDNF-Family Rezeptor

Die neurotrophen Faktoren aktivieren zusammen mit ihrem jeweiligen Rezeptor die ebenfalls membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RET) (Airaksinen and Saarma 2002). Dadurch werden in der Zelle verschiedene Signalkaskaden, wie der RAS/ERK/MAPK-Pathway, in Gang gesetzt (Wells and Santoro 2009).

Neueren Studien zufolge muss das Konzept, dass ein neurotropher Faktor an einen spezifischen Co-Rezeptor bindet, überdacht werden. Sidorova et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass alle Faktoren der GDNF-Gruppe an GFR α 1 binden können, und auch auf diesem Wege Signale weitergeben (Baloh, Tansey et al. 1998, Sidorova, Matlik et al. 2010).

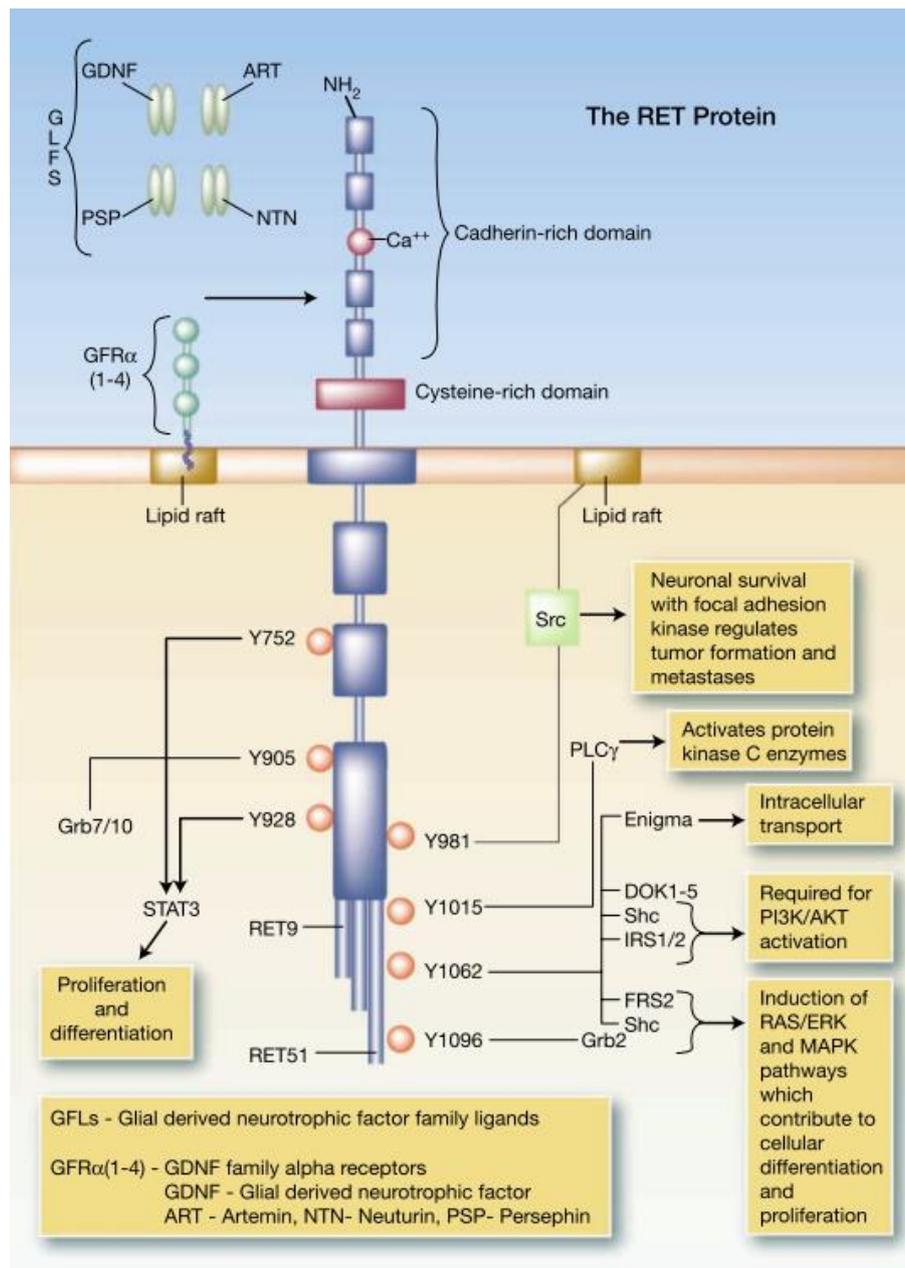


Abbildung 5 aus (Wells and Santoro 2009) Die Struktur des RET und weiterführende Signalwege.

GFR α -Rezeptoren können membranständig (cis-Konfiguration; mit GPI-Anker) oder gelöst im Extrazellulärraum vorkommen (trans-Konfiguration) und werden sowohl von Nerven, als auch von Schwannzellen exprimiert (Paratcha, Ledda et al. 2001). Besonders der gelösten Form von GFR α 1 wird eine große Bedeutung bei der chemotaktischen Migration von Karzinomzellen zugeschrieben (He, Chen et al. 2014).

6.6 NGF

NGF (nerve growth factor), der zur Gruppe der Neurotrophinen gehört, bindet an TrkA (tropomyosin receptor kinase A), aber auch an den p75NTR-Rezeptor (Haas, Fitzner et al. 2009). Es ist bekannt, dass er als Wachstums- und Überlebensfaktor für sympathische und sensorische Nerven fungiert (Kuruvilla, Zweifel et al. 2004). Mittlerweile wurde mehrfach belegt, dass NGF bei vielen Erkrankungen, insbesondere des Pankreas verstärkt exprimiert wird (Friess, Zhu et al. 1999, Zhu, Friess et al. 2001, Zhu, Kleeff et al. 2002). Bei Pankreastumoren korreliert eine hohe NGF Expression mit verstärkter perineuraler Invasion und stärkeren Schmerzen (Zhu, Friess et al. 1999). Auch bei der chronischen Pankreatitis wird das Nervenwachstum durch NGF und TrkA angeregt und es kommt verstärkt zu neuropathischen Schmerzen (Friess, Zhu et al. 1999).

7. Fragestellung der Dissertation

„Untersuchung der Nerv-Sternzell-Interaktion beim Pankreaskarzinom und der chronischen Pankreatitis.“

Welche neurotrophen Faktoren und Rezeptoren der GDNF-Familie können generell von Sternzellen exprimiert werden?

Wie in den vorherigen Kapiteln bereits ausführlicher besprochen, gibt es einige Untersuchungen dazu, dass neurotrophe Liganden und Rezeptoren bei pankreatischen Krankheitsentitäten in erhöhter Menge vorkommen (Liu, Ma et al. 2012). Durch den Nachweis, dass hPSC in der Lage sind Artemin zu produzieren (Ceyhan, Bergmann et al. 2007), rückten die Sternzellen als mögliche Quelle dieser Moleküle weiter in den Fokus der Forschung.

In welchem Maße ändert sich das Expressionsprofil der neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren im Rahmen der Aktivierung von pankreatischen Sternzellen?

Reagieren die Zellen auf eine Stimulation hin mit einer Zu- oder Abnahme der Expression einzelner Faktoren? Lassen sich anhand des Expressionsprofils für das Verständnis pathophysiologischer Vorgänge mehr oder weniger relevante Faktoren identifizieren?

Könnten Sternzellen ein neues Ziel in der Therapie pankreatischer Erkrankungen darstellen?

Obwohl sich die Operationstechniken stetig verbessern, und auch die Radiochemotherapie immer mehr an Bedeutung in der Therapie des Pankreaskarzinoms gewinnt, haben sich die Überlebensraten für die Patienten noch nicht zufriedenstellend verbessern können (Amin, Lucas et al. 2013). Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie ist unabdingbar, um neue Therapieansätze zu finden, die dringend erforderlich sind!

Die Hauptprobleme der pathophysiologischen Vorgänge beim PCA sind die starke Fibrosierung des Gewebes und die neurale Invasion der Karzinomzellen. Letzteres ist bei 100 % der Patienten nachweisbar (Liebl et al. Ann Surg 2014). Wie sich in den letzten Jahren gezeigt hat, spielen die pankreatischen Sternzellen bei diesen Vorgängen eine wichtige Rolle, indem die desmoplastischen Reaktionen im PCA die Entstehung der neuralen Invasion positiv zu beeinflussen zu scheinen (Ceyhan et al. Gastroenterology 2009).

Die neurale Invasion der Tumorzellen ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass Tumorzellen durch die neurotrophen Faktoren zu den Nerven angezogen werden, und so ihr Einwachsen in die Nervenstrukturen vorangetrieben wird (Gil, Cavel et al. 2010). Besonders GDNF scheint die Proliferation und Invasivität der Karzinomzellen dabei deutlich zu unterstützen (Sawai, Okada et al. 2005).

Neurotrophe Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der komplexen Pathophysiologie und könnten ein entscheidender Schlüssel zu einer effizienteren Therapie pankreatischer Erkrankungen sein. Möglicherweise ließen sich dabei neue Wege erschließen, einerseits den neuropathischen Schmerz zu lindern, und andererseits die Invasivität von Karzinomzellen zu verringern.

8. Material und Methoden

8.1 Zellkultur

8.1.1 Verbrauchsmaterialien

- 96 well Platten: 96 well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Pipetten: Tip One, Star lab (Hamburg, GER)
- Pipetten, Glas: Serological Pipette, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Reagenzröhrchen: Falcon Röhrchen, Ratiolab (Dreieich, GER)
- Tubes: Reagiergefäße Safe Seal, Sarstedt (Nürnbrecht, GER)
- Zellkulturflaschen: Cellstar, 75cm², Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Zellschaber: Cell Lifter, costar (Washington, USA)

8.1.2 Geräte

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

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

8.1.3 Zellkulturmedium

Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in folgendem Medium kultiviert:

- DMEM High Glucose 4500, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- 1:1 mit Hams F12, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- 20% Fetal Bovine Serum, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- 1% Penicillin-Streptomycin, Bio Reagent, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- 1% Amphotericin B, Sigma Life Science (St. Louis, USA)

8.1.4 Kultivieren der Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen ausgesät und mit 10 ml des Mediums in einem Zellinkubator in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37° C kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium unter sterilen Bedingungen erneuert.

Die Sternzellen wurden nicht passagiert, um eine Verfälschung der Ergebnisse, aufgrund einer Aktivierung durch die Passage selbst, zu vermeiden.

8.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% für die Versuche verwendet.

8.2 Gewinnung von pankreatischen Sternzellen

8.2.1 Gewebegewinnung

Für diese Forschungsarbeit wurden sowohl Sternzellen aus menschlichem Gewebe, als auch aus Ratten-Pankreas verwendet. Auf die Unterschiede in der Gewinnung wird im Folgenden eingegangen. Ich erlernte diese und andere Methoden bei Dr. Phoebe Phillips an der University of New South Wales in Sydney, Australien. Sie ist die dortige Leiterin der Forschungsgruppe „Pancreatic Cancer Translational Research Group“.

Der Ethikantrag für die Versuche an humanen und tierischen pankreatischen /Sternzellen (Nr. 550/16s) wurde von der zuständigen Ethikkommission zustimmend bewertet.

Gewebeproben von Patienten

Die Gewebeproben, die für die Versuche verwendet wurden, wurden Patienten im Rahmen eines operativen Eingriffes am Pankreas (zum Beispiel chronische Pankreatitis oder Pankreaskarzinom) entnommen. Die Patienten wurden sorgfältig über den Eingriff und die Verwendung der Proben aufgeklärt und willigten freiwillig ein.

Gewebeproben von Versuchstieren

Um tatsächlich ruhende (quiescent) Sternzellen zu isolieren, ist es allgemeiner Konsens die sogenannte „Nycodenz-Methode“ zu benutzen (Erkan, Adler et al. 2012). Diese wurde zuerst von Minoti Apte 1998 beschrieben (Apte, Haber et al. 1998, Vonlaufen, Phillips et al. 2010). Wie bereits erwähnt, speichern die Sternzellen im Zellinneren Vitamin A in Lipidvesikeln. Diese Eigenschaft macht man sich bei der „Nycodenz-Methode“ zunutze, indem man die Zellen des Pankreasgewebes aufgrund ihrer Dichte auftrennt.

Für diese Versuche wurden Wistar-Ratten verwendet, die zwischen 2 und 6 Wochen alt waren. Den Ratten wurde handelsübliches Rattenfutter und Wasser ad libitum gegeben. Sie wurden unter Standardbedingungen bei 24 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 12 Stunden gehalten.

8.2.2 Material

Outgrowth-Methode

- 50ml Falcon, Ratiolab (Dreieich, GER)
- Kalte PBS-Lösung, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- Steriles Skalpell, Feather Disposable Scalpel (Osaka, JPN)
- Petrischale
- Kulturmedium

Nycodenz-Methode nach (Apte, Haber et al. 1998)

- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- Magnetrührer: MSI-Minishaker, Num: 03014906, IKAWorks, Inc. (Wilmington, USA)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- Analytische Waage, Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)
- Glasgefäße
- Unterdruckfilter
- 0,9% NaCl-Lösung
- GBSS
- Enzymlösung in GBSS + NaCl
 - Kollagenase P (Roche Diagnostics Cat # 11213873001) 1.3 mg/ml
 - Protease (Sigma Aldrich, Cat # p5147) 1 mg/ml
 - Deoxyribonuklease (Roche Diagnostics, Australia) 0.01 g/ml
- 0.3% Bovines Serumalbumin (BSA; Pierce, Cat # A9418) 0.15 g BSA / 50ml GBSS + NaCl
- Nycodenz (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) 2.87 g Nycodenz / 10 ml GBSS – NaCl
- Kulturmedium

8.2.3 Methode

Outgrowth-Methode

Die Outgrowth-Methode nach Bachem et al. verwendeten wir in modifizierter Weise ausschließlich zur Gewinnung von humanen Sternzellen (Bachem, Schneider et al. 1998).

Das Gewebestück wurde zunächst unter sterilen Bedingungen im Operationssaal in kalte PBS-Lösung gegeben. Dann wurde es auf eine Zellkulturschale gegeben und mit 2 Skalpellern in kleinere Stücke zerschnitten (ca. 0,5-1mm³). Anschließend wurde die Petrischale 10 Minuten lang mit den Gewebestücken in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gestellt, ohne Medium hinzuzugeben. Dieser Schritt ist notwendig, damit die Stücke am Boden der Schale haften bleiben, wenn später das Medium hinzugegeben wird. Für die „Outgrowth-Methode“ verwenden wir normales Kulturmedium. Mit einer 1ml Pipette nimmt man Medium auf und beginnt vorsichtig die Gewebestücke so zu umspülen, dass sie sich nicht vom Untergrund lösen und aufschwimmen. Sind die Gewebestücke ausreichend mit Medium bedeckt (bei einer 10 cm Petrischale ca. 7ml), wird die Schale vorsichtig in den Inkubator gestellt und dort 48 Stunden lang kultiviert. Nach dieser Zeit lässt sich unter dem Mikroskop beobachten, dass aktivierte Sternzellen, Fibroblasten und andere Zellen damit beginnen aus dem Gewebe heraus auf den Boden der Petrischale zu migrieren. Das Medium sollte danach alle 2 Tage gewechselt werden, bis eine ausreichende Konfluenz erreicht ist, und die Zellen für Versuche verwendet werden können. Die verbleibenden Gewebestücke schwimmen nach einiger Zeit auf und können verworfen werden.

Nycodenz-Methode

Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien für die GBSS-Lösung werden auf einer analytischen Waage abgewogen und in zwei Behälter mit je einem Fassungsvermögen von je 500ml gegeben.

Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.21 g/l
Magnesiumsulfat (MgSO_4 ; wasserfrei)	0.0342 g/l
Kaliumchlorid (KCl)	0.37 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 ; wasserfrei)	0.03 g/l
Natriumbikarbonat (NaHCO_3)	2.27 g/l
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 ; wasserfrei)	0.112 g/l
Natriumchlorid (NaCl) (nur für eine der beiden Lösungen; GBSS+NaCl)	7 g/l

Tabelle 5 Zusammensetzung einer GBSS-Lösung

Anschließend gibt man zu den Chemikalien 500ml MilliQ-Wasser hinzu und rührt die Lösungen solange, bis sich die Salze komplett im Wasser gelöst haben. Nun gibt man zu 2ml Wasser 0.1126g Kalziumchlorid (CaCl_2) hinzu und mischt dieses gut. Mit einer Einmalpipette gibt man nun vorsichtig tropfenweise die Kalziumchloridlösung dem GBSS hinzu, welches während der Prozedur weiter verrührt wird. Die Zugabe der Kalziumchloridlösung sollte so langsam erfolgen, dass sich kein Präzipitat mit dem gelösten Phosphat formt. Wenn die Lösungen gut verrührt sind, können sie steril filtriert werden. Die Lösungen können so bis zu zwei Wochen lang verwendet werden.

Mit den abgewogenen Mengen an Enzymen und 40ml GBSS + NaCl kann nun in einem 50ml Falcon die Enzymlösung angesetzt werden. Diese sollte nicht stark geschüttelt werden, sondern lediglich durch leichtes Hin- und Herbewegen aufgelöst werden. Am besten eignet sich hierzu eine rotierende Walze, wie sie auch für Western-Blots verwendet wird.

In gleicher Weise verfährt man mit der BSA-Lösung (50ml GBSS + NaCl), und der Nycodenz-Lösung (10ml GBSS – NaCl).

Nachdem die Ratte getötet wurde, wird das Pankreas reseziert. Fettgewebe sollte entfernt werden. Unter dem Mikroskop lässt sich Pankreasgewebe von Fettgewebe deutlich unterscheiden. Das Resektat wird bis zur Weiterverarbeitung in kalter PBS-Lösung aufbewahrt.

Nachdem man die Enzymlösung auf 37°C erwärmt hat, kann nun mit einer Insulinspritze das Pankreas mit der Lösung so injiziert werden, dass die Lobuli des Pankreas sichtbar werden. Das Pankreas wird anschließend mit 20ml der Enzymlösung in ein 37°C warmes Schüttelbad gestellt. Dies inkubiert man nun 4 Minuten lang bei 160 Umdrehungen/Minute und danach 3 Minuten lang bei 120 Umdrehungen/Minute.

Diese Suspension wird auf einer Petrischale ausgegossen und das Pankreas mithilfe zweier Skalpelle möglichst fein zerschnitten. Anschließend inkubiert man nochmals 7 Minuten lang im Schüttelbad bei 120 Umdrehungen/Minute. Sollte sich das Gewebe nicht ausreichend auflösen, oder sich beim Zerschneiden starke Klumpen bilden, kann man zusätzlich 7,5µl DNase hinzugeben.

Nach der zweiten Inkubation im Wasserbad wird nun die Suspension mehrmals zunächst mit einer 5ml, dann mit einer 1ml Pipette aufgezogen, um sie weiter zu homogenisieren, bevor man sie im nächsten Schritt filtert.

Für diesen Schritt faltet man aus dem 250µm Nylon-Mesh einen Filter, und bringt diesen an einem frischen 50ml Falcon an. Nun wird die Suspension durch das Nylon-Mesh gefiltert. Nachdem alles gefiltert wurde, spült man den Filter mit GBSS + NaCl nach, so dass das Filtrat ein Volumen von insgesamt 45ml erreicht.

Das Falcon wird nun bei 450 x g (1500rpm) und 4°C 10 Minuten zentrifugiert.

Danach wird der flüssige Überstand abgesaugt, und die verbleibenden Zellen in ...ml der BSA-Lösung neu aufgelöst. Dieser Schritt dient dem Herauswaschen und damit dem Inaktivieren der Verdauungsenzyme. Anschließend wird das Falcon wiederum bei 450 x g (1500rpm) und 4°C 10 Minuten zentrifugiert.

Die Zeit, die für das Zentrifugieren benötigt wird, kann man zur Vorbereitung des Nycodenz-Tubes verwenden. In diesen gibt man 6ml der BSA-Lösung.

Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand wieder abgesaugt, und die Zellen in 9,5ml der BSA-Lösung resuspendiert. Nachdem man durch Mischen wieder eine homogene Suspension hergestellt hat, gibt man noch 8ml der Nycodenz-Lösung hinzu.

Dieses Gemisch zieht man nun mit einer 20ml Spritze auf und befestigt daran die abgeschnittene Plastikkanüle einer Einmalpipette. Luftblasen müssen vollständig aus der Suspension entfernt sein.

Nun taucht man mit der Kanüle in die BSA-Lösung im Nycodenz-Tube ganz ein, und schichtet die Nycodenz-Suspension unter die BSA-Lösung. Dieser Schritt muss mit größter Sorgfalt durchgeführt werden, damit sich die beiden Schichten nicht vermischen.

Der Nycodenz-Tube wird nun 20 Minuten lang bei 2800rpm und 4°C zentrifugiert. Sowohl die Beschleunigung, als auch die Abbremsung sollten auf ein Minimum

herunterreguliert sein, damit sich die Schichten nicht durch ruckartige Bewegungen vermischen.

Nun nimmt man den Tube vorsichtig aus der Zentrifuge heraus. Die Sternzellen haben sich durch die Zentrifugation aufgrund ihrer Dichte zwischen der wässrigen Schicht und der Nycodenz-Schicht angesammelt. Sie werden mit einer Pipette abgesaugt, wobei man die obere wässrige Schicht komplett mit abnehmen kann, und in einem neuen Falcon gesammelt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1500rpm, 4°C, 10 Minuten) kann das Pellet in Medium resuspendiert werden, und auf Petrischalen ausgesät werden.

8.3 Proteinchemische Untersuchungen

8.3.1 Verbrauchsmaterialien

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

8.3.2 Chemikalien

- Ammoniumpersulfat, Sigma Life Scienc (St. Louis, USA)
- BCA Protein Assay: Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Dreieich, GER)

- ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
- Ethanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Glycin, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- HCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Ripa Buffer, Sigma Aldrich
- Inhibitortabletten: Complete Mini EDTA free Proteinase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche (Basel, CH)
- Methanol, Merck (Darmstadt, GER)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- NaCl, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- SDS: SDS Ultrapure, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, Fermentas (St. Leon-Rot, GER)
- TEMED, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tris, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- Tween 20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

Lösungen:	Zusammensetzung:
6x LSB für 100 ml	35 ml Tris HCl 10,28 g SDS 36,2 ml Glycerol 12 mg Bromphenolblau 10 ml β -2-Mercapto pH 6,8
4x Upper Tris	1,5 M (=60,8g) Tris 0,4 % (=4 g) SDS 1 L H ₂ O pH 6,8
4x Lower Tris	1,5 M (=181,65 g) Tris 0,4 % (= 4 g) SDS 1 L H ₂ O pH 8,8
SDS Laufpuffer (10x)	Tris 30,3 g Glycin 144 g SDS 10 g 1 L H ₂ O
Anodenpuffer I	Tris 36,3 g Methanol 200 ml 1 L H ₂ O pH 10,4
Anodenpuffer II	Tris 3,03 g Methanol 200 ml 1 L H ₂ O pH 10,4
Kathodenpuffer	Tris 3,03 g ϵ -Amino-capronsäure 5,24 g Methanol 200 ml 1 L H ₂ O pH 9,4
10x PBS	Natriumchlorid 1,37 M (80g) Kaliumchlorid 27 mM (2g) Dinatriumhydrogenphosphat 100 mM (14,4g) Kaliumhydrogenphosphat 18 mM (2,4g) pH 7,4
5 % Milch (in PBST)	Milchpulver 5 % (=50 g) Tween 20 0,1 % (=1 ml) ad 1 L PBS
7,5 % Milch (in PBST)	Milchpulver 7,5 % (=75 g) Tween 20 0,1 % (=1 ml) ad 1 L PBS
PBST	100 ml 10x PBS

	1 ml Tween 20 ad 1 L H ₂ O
4 % Sammelgel (20ml)	Bidest 12,4 ml 4 x Upper Tris 5 ml AA/BIS 2,7 ml TEMED 40 µl 10 % APS 60 µl
10 % SDS Polyacrylamidgel (20 ml)	Bidest 8,1 ml 4 x Lower Tris 5 ml AA/BIS 6,7 ml TEMED 10 µl 10 % APS 255 µl
10 % Ammonium persulfate	100 mg Ammonium persulfate 1 ml H ₂ O

Tabelle 6 Zusammensetzung der Lösungen für Western Blot

8.3.3 Geräte

- Blottingkammer: PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Entwicklermaschine: Optimax, Protec (Oberstenfeld, GER)
- Magnetrührer: Laboratory Stirrer/Hot Plate, Corning PC-420D (MEX)
- Netzgerät: Power Pack 25, Biometra (Göttingen, GER)
- Photometer: Multiskan EX, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
- Reinstwasser: Milli-Q-Reference-Reinstwassersystem, Merck-Millipore GmbH (Schwalbach, GER)
- Roll-Mixer: Stuart Roller-SRT9 (Shaffordshire, UK)
- Scanner: Nikon LS-5000 ED (Zürich, CH)
- Shaker: Shaker DRS-12, neolab (Heidelberg, GER)
- Thermomixer: Comfort 1,5ml, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
- Ultraschallgerät: Bioruptor Diagenode (Denville, USA)
- Waage: Analytic AC 210 S, Sartorius (Ulm, GER)

- Western Blot Laufkammer: Model: 45-1010, Rated: 0-600V, 0-200mA, class II, PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- Zentrifuge: Centrifuge, 5424 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)

8.3.4 Antikörper

Primärantikörper:

- GFR α 1 Antikörper (H-70): sc-10716 rabbit (Santa Cruz)
- GFR α 2 Antikörper G9415 rabbit (Sigma Aldrich)
- GFR α 3 Antikörper ab8028 rabbit (Abcam)
- GFR α 4 Antikörper (C-15): sc-46986 goat (Santa Cruz)
- α -SMA Antikörper ab5694 rabbit (Abcam)
- Persephin Antikörper (C-17): sc-8684 goat (Santa Cruz)
- Neurturin Antikörper ab8061 rabbit (Abcam)
- Artemin Antikörper NBP1-46591 rabbit (Novus Biologicals)
- GDNF Antikörper (E-10): sc-398555 mouse (Santa Cruz)
- Smad 2/3 Antikörper 3102S rabbit (Cell Signaling)
- p-Smad 2 Antikörper 3108S rabbit (Cell Signaling)
- GFAP Antikörper Z0334 rabbit (Dako)

Sekundärantikörper:

- Amersham ECL anti-rabbit HRP NA934OV (GE Healthcare)
- Amersham ECL anti-mouse HRP NA931V (GE Healthcare)
- ECL anti-goat HRP: sc-2020 (Santa Cruz)

8.3.5 Methoden

Die Western Blots wurden nach den Publikationen von W. Burnette und U. Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970, Burnette 1981).

8.3.5.1 Probenextraktion

Die Zellen wurden bei ausreichender Konfluenz von ca. 80% für die proteinchemischen Bestimmungen verwendet. Dazu wurde das jeweils laufende Experiment beendet, das Medium abgesaugt, und die Petrischale einmal mit PBS überschichtet. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit 150µl RIPA-Puffer lysiert. Mit einem Cell Scraper wurden die Zellen nun mechanisch von der Oberfläche gelöst und in einem Eppendorf- oder 1,5ml-Tube gesammelt. Die lysierten Zellen wurden nun bei 13200 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt, in einem neuen Gefäß gesammelt, und das Pellet verworfen.

8.3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Bevor die Proben für den Western Blot verwendet werden können, muss man ihre Konzentration bestimmen, um gleiche Proteinmengen aufzutragen. Dadurch erlangt man eine bessere Vergleichbarkeit, wenn möglichst gleiche Proteinmengen für die einzelnen Spuren verwendet werden. Zur Konzentrationsbestimmung verwendet man das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce. Hierbei mischt man in einer 96 well plate je 5 µl einer Probe mit 200 µl der BCA-Lösung. Die BCA-Lösung enthält zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}), die durch die Proteine zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) reduziert werden. Cu^+ bildet mit Bicinchoninsäure einen Komplex, der sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachweisen lässt. Anhand einiger Referenzwerte, die durch definierte Proteinmengen aus Albumin gewonnen werden, lässt sich rechnerisch mittels linearer Regression auf die jeweils gesuchte Proteinmenge rückschließen. Sowohl für die Albumin-Standards, als auch für die Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, und der Mittelwert für die Berechnungen verwendet. Die Proben und Standards werden auf eine 96 well plate pipettiert und eine halbe Stunde bei 37 °C in den Inkubator gestellt, bevor die Werte im Photometer ausgelesen werden.

8.3.5.3 Vorbereitung der Proben

Nach der Konzentrationsbestimmung mischt man 30 µg Protein mit einer entsprechenden Menge Wasser und 7µl 6x LSB, um auf eine Gesamtmenge von 30 µl zu kommen. Anschließend werden die Proben bei 95°C denaturiert.

8.3.5.4 Gelelektrophorese

Vor dem eigentlichen Blotting müssen die Proteine anhand ihrer Größe mit der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die hierzu verwendete Methode der sogenannten diskontinuierlichen Gelelektrophorese geht zurück auf Leonard Ornstein und Baruch J. Davis (Davis 1964, Ornstein 1964). Dazu werden 2 unterschiedliche Polyacrylamidgele vorbereitet: Ein sogenanntes Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 und ein Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8. Das Trenngel ist durch seine Zusammensetzung feinporiger, als das Sammelgel. Die beiden Gele werden nach obenstehender Tabelle gemischt und nacheinander zwischen 2 Glasplatten gegossen, wo sie dann polymerisieren. Wenn die Gele fertig polymerisiert (nach ca. 15 Minuten) und die Proteinlösungen abgekühlt sind, überschichtet man die Gele mit SDS-Laufpuffer.

In die erste Tasche des Gels wird ein Marker pipettiert. Dieser ist essentiell, um später die Größe des gesuchten Proteins abschätzen zu können. In die übrigen Taschen werden die weiteren Proben pipettiert.

Die Elektrophorese-Kammer wird nun verschlossen und Strom mit einer Stärke von 25 mA und 120 V (Obergrenze) angelegt. Durch das elektrische Feld wandern nun Chloridionen als sogenannte Leitonen Richtung Trenngel voraus. Danach folgen die Proteine und zuletzt Glycinationen des Laufpuffers als Folgeionen. Durch einen Spannungsgradienten werden die langsameren Proteine beschleunigt, und die rascher laufenden Proteine vor den Leitonen durch deren negative Ladung abgebremst. Diese Anordnung bewirkt eine Konzentration der Proteinbande im Sammelgel an der Grenze zum Trenngel. Hier ändert sich nun der pH-Wert, wodurch die Laufgeschwindigkeit der Glycinationen erhöht wird, und sie den Proteinstapel überholen. Die Proteine werden nun anhand ihres Molekulargewichtes und damit einhergehend anhand ihrer Laufgeschwindigkeit in dem feinporigeren Trenngel aufgetrennt (Krüger 2004).

Die Elektrophorese wird beendet, sobald der Marker und die LSB-Markierung den unteren Rand der Platten erreicht haben (nach ca. 2 Stunden).

8.3.5.5 Western Blot

Nach Beendigung der Gelelektrophorese folgt nun das eigentliche Blotting. Für die Untersuchungen wurde das sogenannte Semi-dry Blotting verwendet. Das Semi-dry Blotting bietet gegenüber dem herkömmlichen Tank Blotting einige Vorteile. Die Handhabung ist leichter, man verbraucht weniger Pufferlösungen und die Blotting Zeiten

sind kürzer. Außerdem kommt es zu einer weitaus geringeren Hitzeentwicklung, weshalb bei diesem System auch keine extra Kühlung notwendig ist.

Tovey und Baldo zeigten in Ihrer Publikation 1987 bereits, dass der Proteintransfer mit der Semidry-Methode effizienter verläuft, und sich die Proteine sensitiver anfärben lassen (Tovey and Baldo 1987).

Es werden 6 Filterpapiere mit Anodenpuffer 1, 3 Filterpapiere mit Anodenpuffer 2 und 6 Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt. Die Membran wird kurz (ca. 3 Sekunden) in Ethanol äquilibriert und dann in Anodenpuffer 2 gelegt. In die Blot-Kammer werden nun zuunterst die Filterpapiere mit Anodenpuffer 1, dann die Filterpapiere mit Anodenpuffer 2, dann die Membran, darüber das Gel und zuletzt noch die Filterpapiere mit Kathodenpuffer gelegt, und die Kammer gut verschlossen. Beim Einlegen der einzelnen Schichten muss darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen bilden, da diese sonst als blinder Fleck auf dem späteren Film zu sehen sein werden. An die Kammer wird nun eine Stunde lang eine Spannung von 70 mA pro Gel bei einer Spannungsobergrenze von 30 V angelegt.

8.3.5.6 Behandlung mit Antikörpern

Nach dem Blotting muss die Membran zuerst eine Stunde lang in 7,5 %iger Milch geschwenkt werden. Dieser Schritt dient der Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wird die Membran zusammen mit dem Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag folgen dreimal ein jeweils 10 minütiger Waschschrift, um ungebundene Antikörper zu entfernen, bevor die Membran 45 Minuten lang mit dem Sekundärantikörper inkubiert wird. Dieser Sekundärantikörper trägt eine Markierung, mit der die Position des Antigens, sprich des Proteins, auf der Membran sichtbar gemacht werden kann. Die Markierung ist das sogenannte HRP (engl. horseradish peroxidase, zu deutsch Meerrettichperoxidase). Dieses Enzym katalysiert später in Reaktion mit dem ECL die Oxidation von Luminol und löst dadurch eine Chemilumineszenz aus, die auf dem Röntgenfilm abgebildet wird.

Antikörper	Verdünnung
GFR α 1	1:1000
GFR α 2	1:1000
GFR α 3	1:1000
GFR α 4	1:1000
Persephin	1:1000
Neurturin	1:2000
Artemin	1:2000
GDNF	1:1000
Smad 2/3	1:1000
p-Smad 2	1:1000
GFAP	1:1000
ECL anti-rabbit HRP	1:2000-1:5000
ECL anti-mouse HRP	1:2000-1:5000
ECL anti-goat HRP	1:2000-1:5000

Tabelle 7 Verdünnungen der Antikörper für Western Blot

Es folgen nochmals 3 Waschschritte, um den zweiten Antikörper auszuwaschen und anschließend eine 10 minütige Spülung in PBST.

8.3.5.7 Entwicklung der Membran

Die Membranen werden zunächst eine Minute lang in ECL Western Blotting Detection Reagent geschwenkt. Anschließend werden sie zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Entwicklungskassette gelegt und bei verschiedenen Expositionszeiten entwickelt.

8.3.5.8 Stripping

Um fertig geblottete Membranen für mehrere Untersuchungen zu verwenden, kann man diese „strippen“, d. h. man entfernt die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper.

Dazu verwendeten wir das sogenannte „Mild-Stripping-Protokoll“ der Firma Abcam. Zunächst mischt man dazu folgenden Puffer:

- 15g Glycin
- 1g SDS
- 10ml Tween 20

Das Volumen wird zu insgesamt 1L mit Milli-Q Wasser aufgefüllt, und ein pH-Wert von 2,2 eingestellt. Nun wird die Membran mit dem Puffer überschichtet und ca. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Puffer verworfen, und die Membran nochmals mit frischem Puffer wiederum 10 Minuten lang inkubiert. Anschließend wird die Membran zweimal 10 Minuten lang mit PBS und zweimal 5 Minuten lang mit TBST gewaschen. Bevor nun ein neuer Primärantikörper auf die Membran gegeben werden kann, muss diese wieder mit 7,5 %iger Milch geblockt werden.

8.4 RNA-Untersuchungen

8.4.1 Verbrauchsmaterialien

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

8.4.2 Chemikalien und Kits

- QIAshredder, Qiagen Cat. No. 79654
- RNeasy Plus Mini Kit, Quiagen Cat. No. 74134
- β -Mercaptoethanol, Sigma
- Cell-Scraper, Cell Lifter, Costar (Washington, USA)

- cDNA Kit: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (Californien, USA)
- PCR-Tubes
- 96 well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- Folie
- Agarose: Agarose Broad Range, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- 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)
- Nuclease-Free water: Ambion, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- RNase away: Molecular Bio Products (San Diego, USA)
- Rneasy Plus Mini Kit, Qiagen (Hilden, GER)

8.4.3 Geräte

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

8.4.4 Primer

Cyclophyllin B	forward primer: reverse primer:	5' –TGTGGTGTGGCAAAGTTC 5' –GTTTATCCCGGCTGTCTGTC
GFR α 1	forward primer: reverse primer:	5' –GCACAGCTACGGGATGCTCTTCTG 5' – GTAGTTGGGAGTCATGACTGTGCCAATC
GFR α 3	forward primer: reverse primer:	5' –CAGCGCCACCTCTGCCTAGCCCAG 5' –CATGGCAGTCCCAATCAGCCCCAG
Vimentin	forward primer: reverse primer:	5' –GCCGAGGAATGGTACAAGT 5' –CTCTTCCATTTCACGCATCT
Artemin	forward primer: reverse primer:	5' –TACTGCATTGTCCCCTGCTCC 5' –TCGCAGGGTTCTTTCGCTGCACA
α SMA	forward primer: reverse primer:	5' –ACTGGGACGACATGGAAAAG 5' –CATCTCCAGAGTCCAGCACA
GDNF	forward primer: reverse primer:	5' –AAAAATCGGGGGTGCCTTA 5' –CATGCCTGGCCTACCTTGTC
GAPDH	forward primer: reverse primer:	5' –TGGAGTCTACTGGCGTCTT 5' –TGTCATATTTCTCGTGGTTCA
Neurturin	forward primer: reverse primer:	5' –CAGCGGAGGCGCGTGCGCAGAGA 5' –CGGCTGTGCACGTCCAGGAAGGA
Persephin	forward primer: reverse primer:	5' –TGTCACAATGGCTGCAGGAAGAC 5' –AGCTCAGCCACTGGTAGGGTTCAG
Collagenase 1 a	forward primer: reverse primer:	5' –TTCCCTGGACCTAAGGGTACT 5' –TTGAGCTCCAGCTTCGCC
Hif 1 α	forward primer: reverse primer:	5' –ATCTGAGGACACGAGCTGCC 5' –GCATCGGGCTCTTTCTTAAGC

Tabelle 8 Primer für qRT-PCR

8.4.5 Methode

8.4.5.1 Isolation der RNA

Das Kulturmedium wird aus den Petrischalen abgesaugt, und die Schale einmal mit PBS gewaschen. Dieser Schritt ist wichtig, um möglichst wenig Kulturmedium in die folgenden Abschnitte zu übertragen, da sie die Lyse der Zellen und damit die Ausbeute an RNA negativ beeinflussen können.

Man pipettiert 600 μ l Buffer RLT Plus auf die Zellen, woraufhin diese sich von der Platte mit einem Cell Scraper leicht lösen lassen, und sammelt sie in einem 1,5 ml Tube.

Zur eigentlichen Isolation der RNA wurde das kommerzielle RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers. Dabei wird das Lysat zunächst auf eine Silica-Membran gegeben, die sich in der sogenannten spin-column befindet. Die RNA bindet an diese Membran, und durch mehrere Wasch-

und Zentrifugationsschritte können die restlichen Bestandteile des Lysates entfernt werden. Abschließend wird die gereinigte RNA mit Wasser von der Membran gelöst und in einem Tube gesammelt.

8.4.5.2 DNase-Verdau

Um die RNA-Proben vor der Umschreibung in DNA von bereits enthaltener DNA zu reinigen, verwendeten wir das Protokoll zum DNase-Verdau von der Firma Promega. Hierzu mischt man 1-8µl in Wasser gelöste RNA, 1µl RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer, 1u/µg RQ1 RNase-Free Dnase und gibt bis zu einem Gesamtvolumen von 10µl nukleasefreies Wasser hinzu. Anschließend wird das Gemisch bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Zum Abbruch der Reaktion gibt man 1µl der RQ1 DNase Stop Solution hinzu. Mit dieser inkubiert man schließlich die Proben bei 65°C 10 Minuten lang.

8.4.5.3 Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösungen wurde das UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop der Firma Peqlab verwendet. Hierbei wurde 1µl der Probe unverdünnt gemessen.

8.4.5.4 Reverse Transkription

Nachdem die RNA nun fertig aufbereitet ist, kann man sie mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umschreiben. Hierzu verwendet man das High-Capacity Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems.

Zur Herstellung des Master Mixes gibt der Hersteller folgende Angaben an.

Komponenten	Volumen (µl) / Reaktion
10X RT Buffer	2
25X dNTP Mix (100mM)	0,8
10X Random Primers	2
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1
Nukleasefreies H ₂ O	4,2

Tabelle 9 Zusammensetzung des Master Mixes für die reverse Transkription

Es werden nun jeweils 10 µl Master Mix und 10 µl RNA in individuelle PCR-Tubes pipettiert und kurz zentrifugiert. Anschließend stellt man die Tubes in einen Thermocycler bei folgendem Protokoll.

25 °C	10 Minuten
37 °C	120 Minuten
85 °C	5 Minuten
4 °C	Zum Abkühlen und vorübergehender Lagerung

Tabelle 10 Thermocycler-Protokoll

8.4.5.5 Quantitative Real-Time PCR

Das Prinzip der Real-Time PCR geht zurück auf Russell Higuchi (Higuchi, Dollinger et al. 1992). Im Gegensatz zur herkömmlichen Polymerasekettenreaktion können bei der qRT-PCR die Produkte genau quantifiziert werden. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (hier SYBR Green I), der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, kann nach den einzelnen Elongationsschritten die Zunahme an dsDNA bestimmt werden.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde nach Herstellerangaben folgender Reaktionsansatz (pro well) verwendet:

cDNA (Verdünnung: 5 ng/µl)	5 µl
LightCycler 480 SYBR Green Mastermix	10 µl
forward primer	1 µl
reverse primer	1 µl
Nuklease freies H ₂ O	3 µl

Tabelle 11 Reaktionsansatz für qRT-PCR

Zur Überprüfung der Ergebnisse, und um die Messgenauigkeit zu erhöhen, wurden für jede einzelne Probe Duplikate angefertigt, und bei der Auswertung der Mittelwert herangezogen.

Für die qRT-PCR Untersuchungen wurde der LightCycler 480 der Firma Roche verwendet. Dabei wurden folgende Schritte durchlaufen:

Denaturierung	5 Min., 95 °C	1 Zyklus
PCR	10 sec., 95 °C 15 sec., 60 °C (Annealing) 15 sec., 72 °C	50 Zyklen
Schmelzkurve	5 sec., 95 °C 1 Min., 65 °C durchgehend, 97 °C	1 Zyklus
Kühlung	30 sec., 40 °C	1 Zyklus

Tabelle 12 LightCycler 480 Protokoll

8.4.5.6 Quantifizierung

Für die Auswertung der qRT-PCR wurde die herstellereigene Software verwendet, die nach der Pfaffl-Methode operiert (Pfaffl 2001). Zur Erstellung der Graphiken wurden Microsoft Excel und GraphPad verwendet.

Als Housekeeping-Genes wurden sowohl Cyclophyllin B, als auch GAPDH verwendet, wobei sich letztendlich für Cyclophyllin B entschieden wurde, da dies einen früheren Anstieg der Fluoreszenzzunahme zeigte. Die Ergebnisse mit GAPDH fielen allerdings ähnlich aus.

8.5 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

8.5.1 Verbrauchsmaterialien

- Glasplättchen/Coverslips

8.5.2 Chemikalien

- Formaldehydlösung (4 % PFA in PBS)
- PBS
- PBST (PBS + 0,1 % Tween-20)
- Triton X 100-Lösung (0,5 % Triton X 100 in PBS)

- NGS
- Mounting Medium

8.5.3 Geräte

Mikroskop, Observer Z1, Zeiss (Oberkochen, GER)

8.5.4 Antikörper

Primäre Antikörper:

- α -SMA Antikörper ab5694 rabbit (Abcam)
- GFAP Antikörper Z0334 rabbit (Dako)
- Neurturin Antikörper ab8061 rabbit (Abcam)
- Vimentin Antikörper (H-84): sc-5565 rabbit (Santa Cruz)

Sekundäre Antikörper:

- Alexa Flour 488 goat anti mouse IgG (H+L) 1:500
- Alexa Flour 488 goat anti rabbit IgG (H+L) 1:500
- Alexa Flour 594 goat anti rabbit IgG (H+L) 1:400
- DAPI

8.5.5 Methode

Für die Immunfluoreszenzfärbungen werden die Zellen direkt auf kleine Glasplättchen ausgesät. Diese werden bei ausreichender Konfluenz mit PBS mit 4 % Formaldehyd überschichtet und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur fixiert.

Zur Entfernung des Formalins folgt ein Waschschriff mit PBS. Danach gibt man 1 ml Triton X 100 auf die Plättchen und lässt es 10 Minuten einwirken. Es folgt ein weiterer Waschschriff mit PBS. Nun werden die Plättchen mit 1 ml NGS für 45 Minuten inkubiert. Dies dient ähnlich der Vorgehensweise beim Western Blot zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen.

Nun können ein oder mehrere Primäantikörper in der jeweiligen Verdünnung auf die Zellen pipettiert werden und 1 Stunde lang inkubiert werden. Danach wird das Antikörpergemisch abgesaugt, und die Plättchen dreimal mit PBST gewaschen.

Da die Sekundäantikörper lichtempfindlich sind, empfiehlt es sich die folgenden Schritte an einem lichtgeschützten Platz durchzuführen. Nach den Waschschriffen werden nun die

Gemische mit den Sekundärantikörpern auf die Zellen gegeben und wiederum 45 Minuten inkubiert.

Die Plättchen werden zweimal mit PBST gewaschen und final mit einem Tropfen Mounting Medium auf einen Objektträger aufgebracht.

8.6 Statistik

Alle Untersuchungen wurden falls nicht anders angegeben mindestens 3 mal unabhängig voneinander durchgeführt, und die Ergebnisse mittels t-Test berechnet. Zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse als Graphiken wurde die Software GraphPad Prism verwendet.

9. Ergebnisse

9.1 Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen

Wie im Kapitel Material und Methoden erläutert, lernte ich die Technik zur Gewinnung von pankreatischen Sternzellen bei Forschungspartnern in Australien. Nachdem sich die Methodik in unserem Forschungslabor etabliert hatte, war es zunächst notwendig die gewonnenen Zellen korrekt zu charakterisieren, bevor weitere Versuche durchgeführt werden konnten. Die pankreatischen Sternzellen sollten eine hohe Homogenität aufweisen und frei von anderen Kontaminationen sein. Ein wichtiger Aspekt war zudem den Aktivierungszustand der Zellen nachvollziehen zu können.

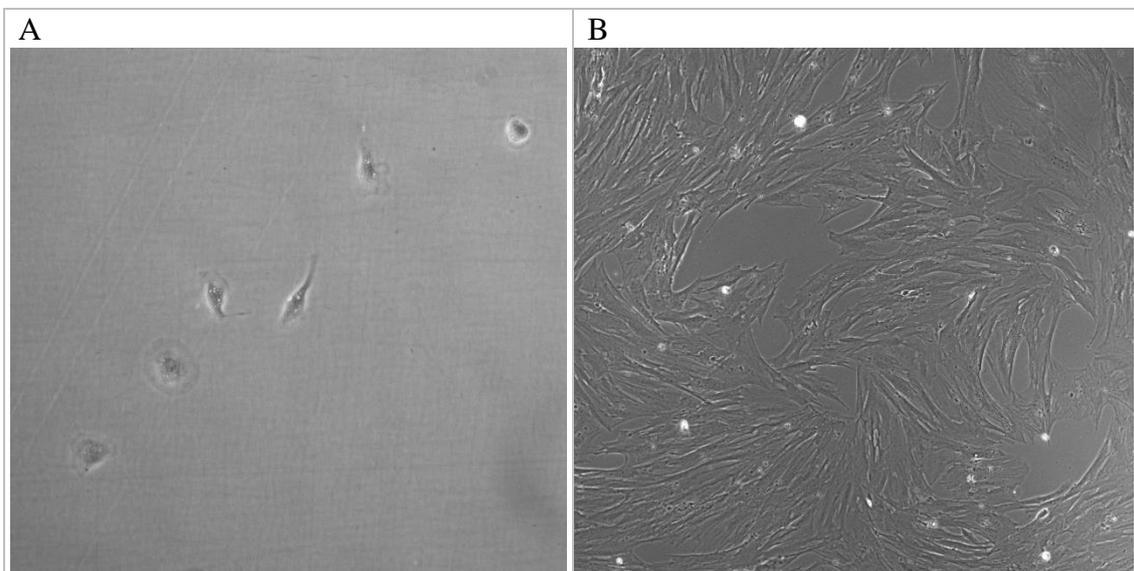


Abbildung 6 Phasenkontrast-Mikroskopie frisch isolierter (A) und aktivierter (B) pankreatischer Sternzellen

Ein wichtiger Marker für ruhende Sternzellen ist das Vorhandensein von Vitamin A-Lipid-Tröpfchen im Zellkörper (Apte, Haber et al. 1998, Bachem, Schneider et al. 1998, Pinzani 2006). Diese sind mittels Phasenkontrast-Mikroskopie am ersten Tag nach der Isolation deutlich zu erkennen. Im Laufe der Aktivierung sind sie später nicht mehr nachzuweisen. Durch die Aktivierung ändert sich außerdem das Erscheinungsbild der Zellen. Man kann bereits ohne spezielle Anfärbung die lamellierte Oberflächenstruktur, die durch die Aktin-Filamente zustande kommt, erkennen.

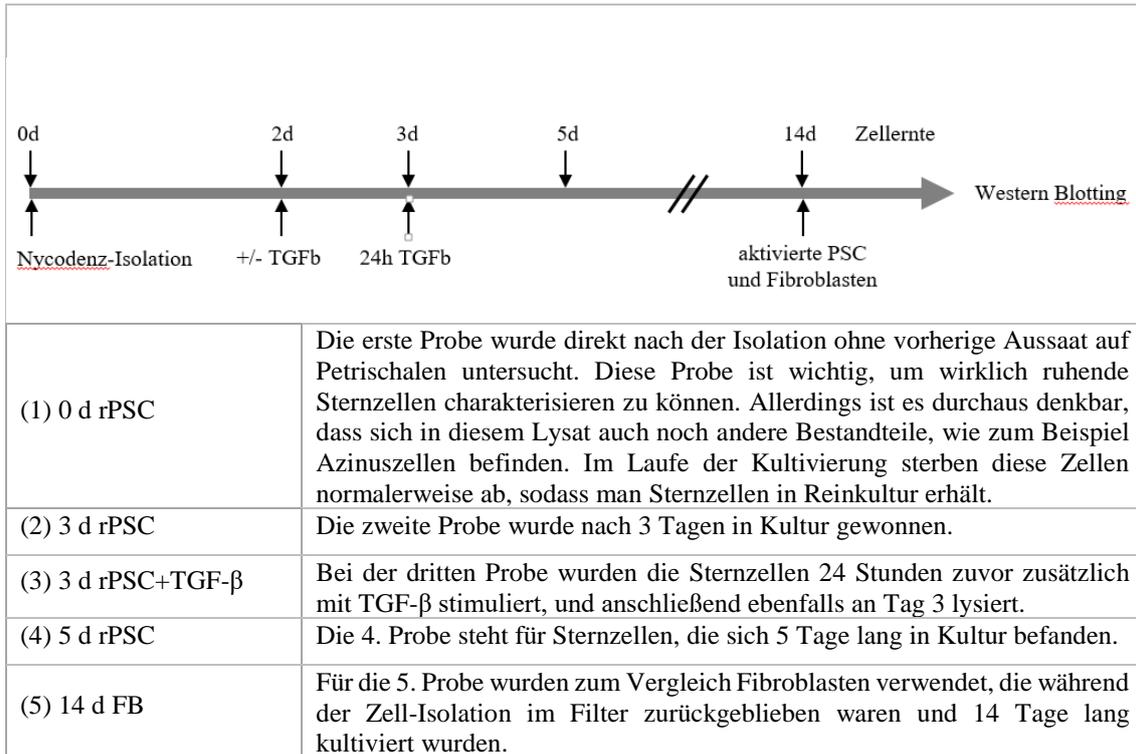
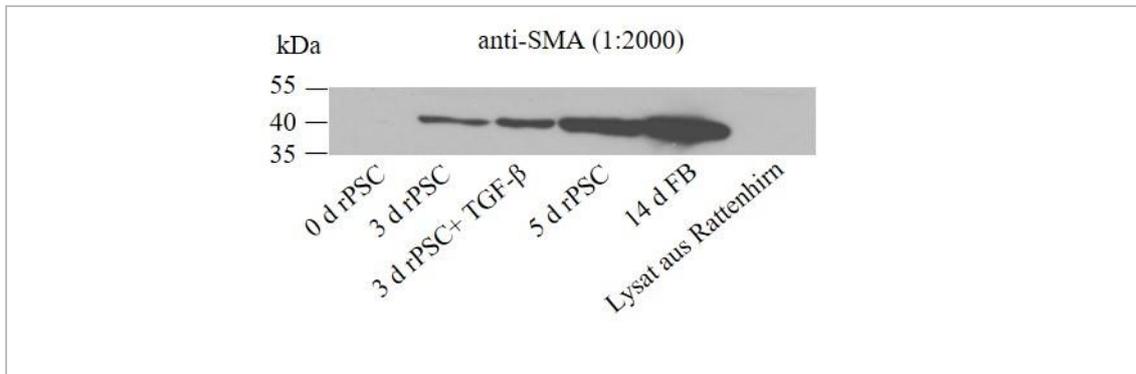


Abbildung 7 Genereller zeitlicher Verlauf der Gewinnung der Proben nach Isolation der Zellen.

Abbildung 8 Untersuchung der Expression von α -SMA bei rPSC mittels Western Blot

Werden die Sternzellen aktiviert, fangen sie verstärkt an α -SMA zu exprimieren. α -SMA ist kein spezifischer Marker für Sternzellen, sondern wird ebenso von Myofibroblasten, glatten Muskelzellen und anderen Zellen gebildet. Allgemein wird die Expression von α -SMA eher als Zeichen der Transdifferenzierung zu myofibroblasten-ähnlichen Zellen angesehen, als ein genauer Marker des Grades der Aktivierung. Wie man in Abbildung 8 sehen kann, konnte direkt nach der Isolation (0 d rPSC) mittels Western Blot noch kein α -SMA nachgewiesen werden. Nach 3 Tagen in Kultur (3 d rPSC) zeigt sich bereits eine leichte Zunahme der Expression von α -SMA. Eine weitere Zunahme der Expression von α -SMA ergibt sich nach zusätzlicher Stimulation mit TGF- β (3 d rPSC + TGF- β) und

nach 5 Tagen in Kultur (5 d rPSC). Zur Korrelation wurden auch Fibroblasten untersucht, die sich 14 Tage lang in Kultur befanden (14 d FB). Diese zeigten eine sehr deutliche Expression von α -SMA. Das Lysat aus Rattenhirn, das als Negativkontrolle diente, zeigte kein Signal für α -SMA.

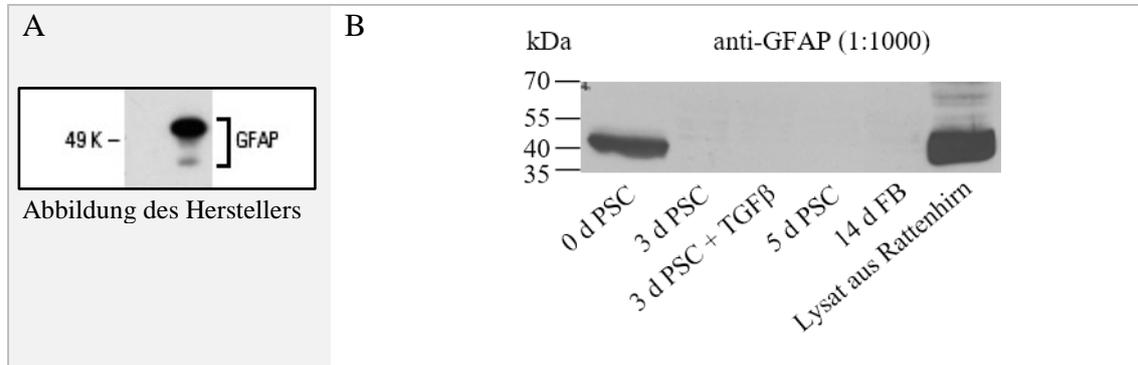


Abbildung 9 Untersuchung der Expression von GFAP bei rPSC

A: Abbildung des Herstellers aus www.scbio.de/datasheet-6170-gfap-c-19-antibody.html

B: Untersuchung der Expression von GFAP bei rPSC mittels Western Blot

Ein Marker, der spezifischer für Sternzellen ist und von Fibroblasten nicht exprimiert wird, ist GFAP. Direkt nach der Isolation lässt sich GFAP bei ruhenden pankreatischen Sternzellen (0 d rPSC) noch nachweisen. Nach Aktivierung (3 d rPSC) ist GFAP dann nicht mehr im Western Blot zu detektieren. Auch die Fibroblasten (14 d FB) zeigen keine Expression von GFAP. Einen deutlichen Nachweis von GFAP erhält man im Lysat von Rattenhirn, das hier als Positivkontrolle fungiert.

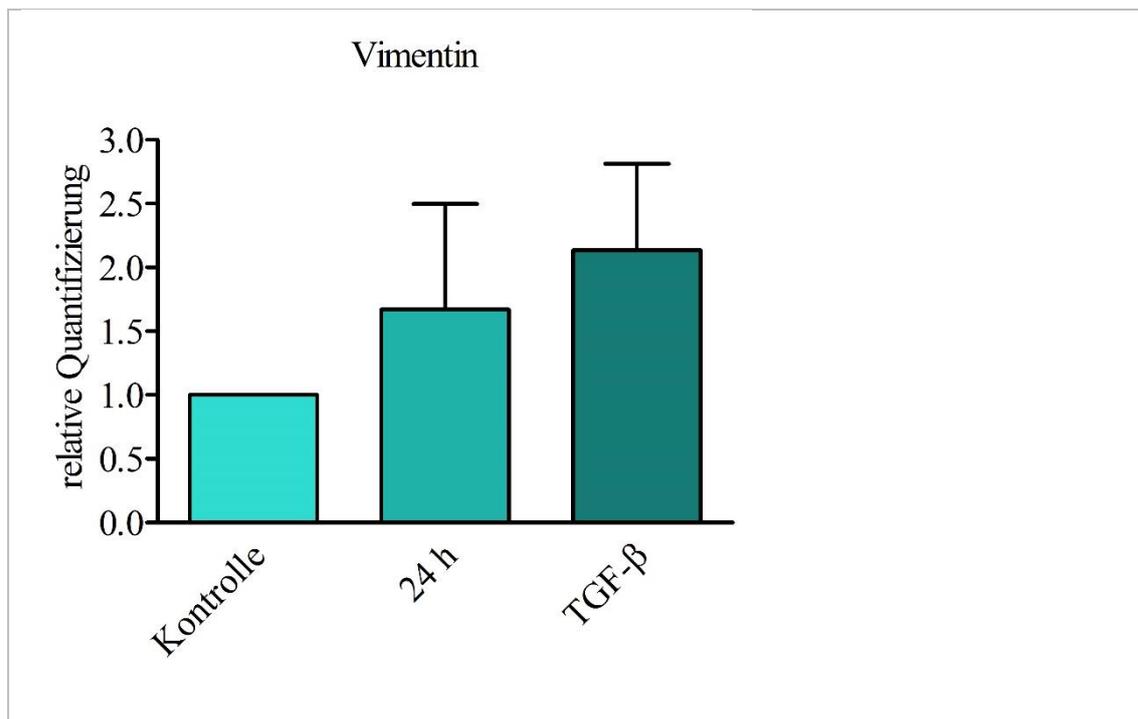


Abbildung 10 Auswertung der qRT-PCR zur Analyse der Expression von Vimentin bei rPSC

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

24h: rPSC nach 24h Hypoxiebehandlung (mean 1,67 ± sem 0,83; n=5)

TGF: rPSC nach einmaliger Stimulation mit TGF-β (mean 2,14 ± sem 0,68; n=3)

Ein weiterer Marker der Sternzellen ist eine ständige Expression von Vimentin. Diese ließ sich auch, wie in Abbildung 10 zu sehen ist, hier demonstrieren.

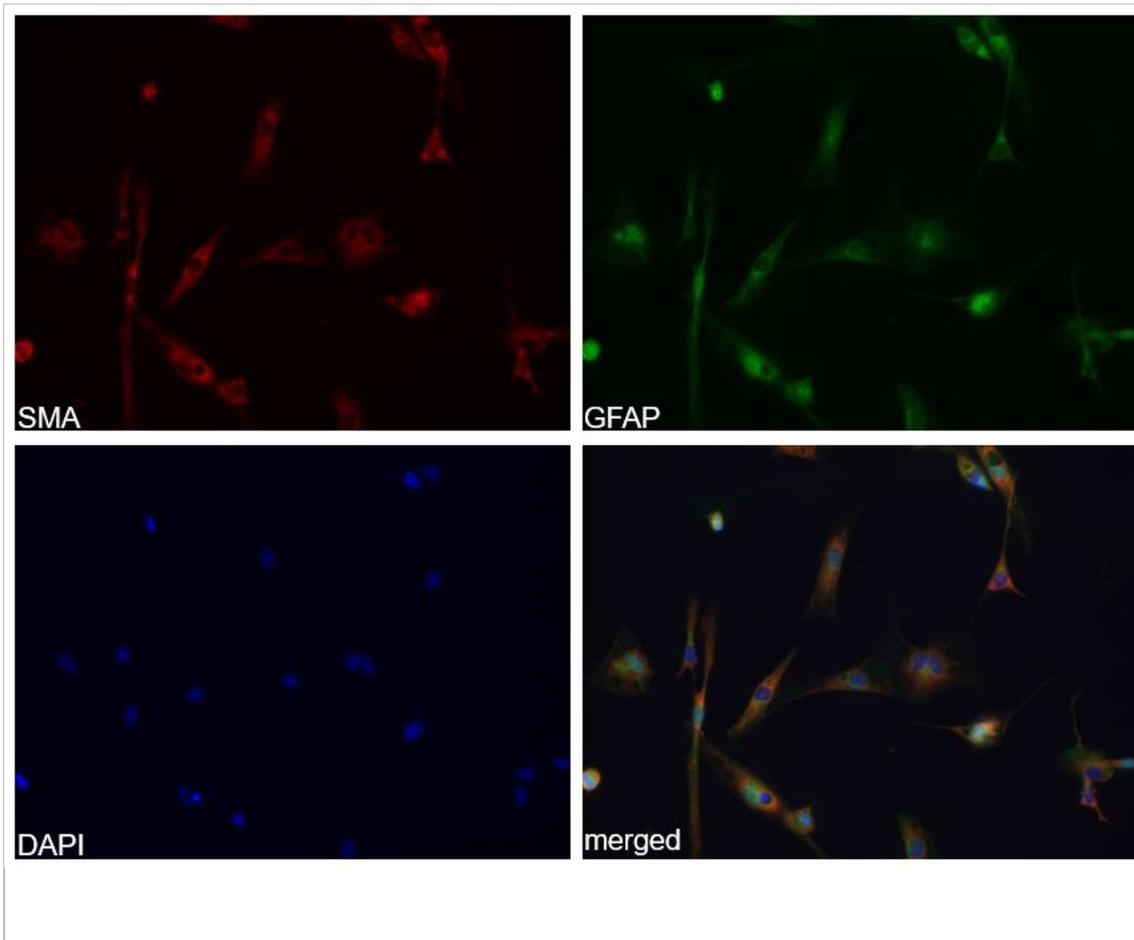


Abbildung 11 Immunfluoreszenz von rPSC 1 Tag nach Isolation

Zur Korrelation der beiden wichtigsten Marker (α -SMA und GFAP) wurden die Zellen auch mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die frisch isolierten Zellen zeigen unter dem Fluoreszenzmikroskop eine schwache Färbung für α -SMA (rot) und eine deutliche Färbung für GFAP (grün). Die Färbung mit DAPI (blau) wurde durchgeführt, um die Zellkerne kenntlich zu machen.

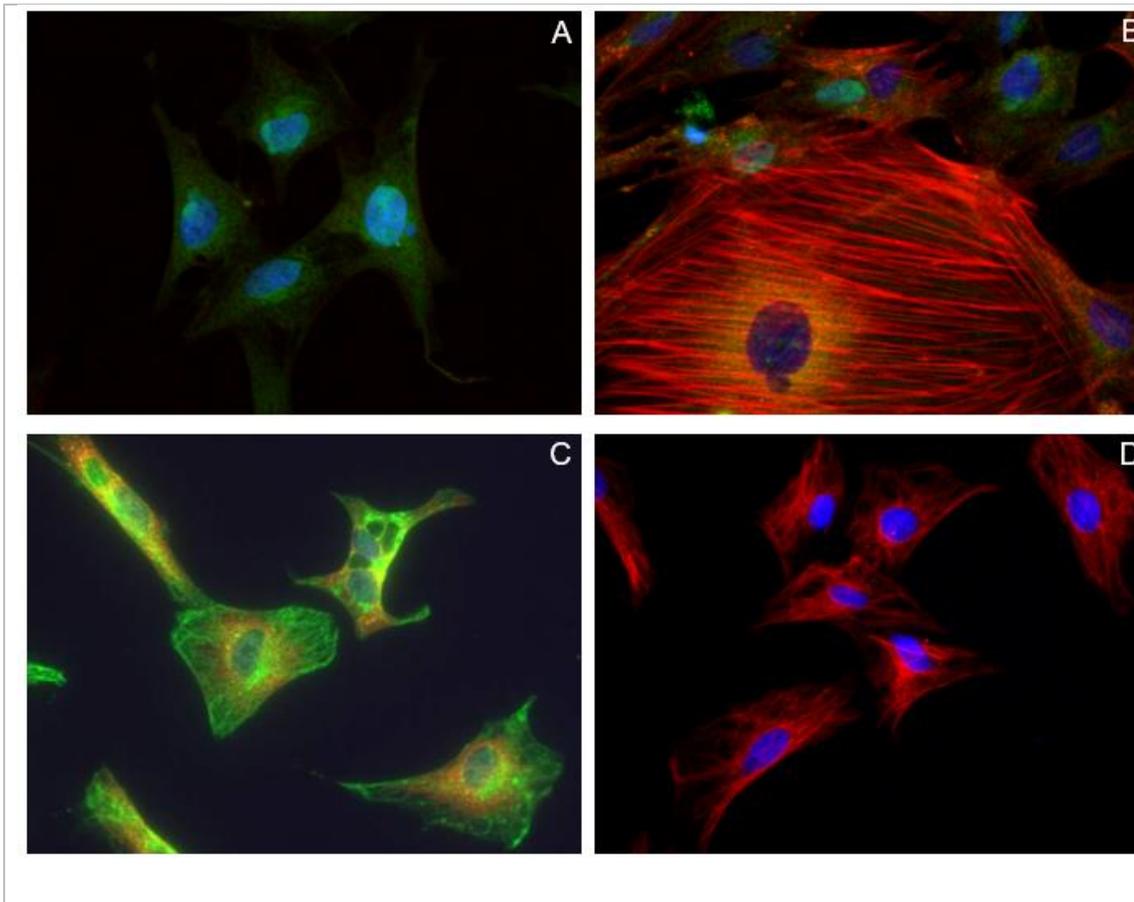


Abbildung 12 Immunfluoreszenzfärbung von ruhenden und aktivierten rPSC

In der Abbildung 12 sind α -SMA rot, GFAP grün und die Zellkerne blau dargestellt. Bild A wurde nach einem Tag in Kultur aufgenommen. Die Zellen zeigen hier eine deutliche Färbung für GFAP. Bild B spiegelt die Situation nach 5 Tagen in *in vitro* Kultur wider. GFAP lässt sich hier weniger ausgeprägt erkennen. Dafür sind die Aktin-Filamente (rot) sehr deutlich bei allen Zellen sichtbar.

Auf Bild C sieht man aktivierte rPSC, bei denen α -SMA grün, und Neurturin rot dargestellt sind. Bild D zeigt aktivierte Sternzellen mit rot angefärbtem Vimentin und blau angefärbten Zellkernen.

9.2 Stimulation der Zellen

Um zu untersuchen, in welchem Maße sich das Expressionsprofil der neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren im Rahmen der Aktivierung von pankreatischen Sternzellen verändert, wurden Versuche sowohl an ruhenden Zellen, als auch an aktivierten Zellen durchgeführt und diese miteinander verglichen. Durch Untersuchungen

an humanen und tierischen Sternzellen konnten in den letzten Jahren diverse autokrine und parakrine Faktoren als Regulatoren der Aktivierung von Sternzellen identifiziert werden (Omary, Lugea et al. 2007). Im Wesentlichen gehören dazu Zytokine wie Interleukin-1 und TNF- α , Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β , aber auch andere Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren (Apte, Haber et al. 1999, Luttenberger, Schmid-Kotsas et al. 2000, Schneider, Schmid-Kotsas et al. 2001, Shek, Benyon et al. 2002). Auch eine Behandlung mit Alkohol, sowie eine Inkubation unter hypoxischen Bedingungen führen zu einer Aktivierung der Zellen (Apte, Phillips et al. 2000, Masamune, Kikuta et al. 2008).

9.2.1 Stimulation mit TGF- β

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben sich mit den intrazellulären Vorgängen der Aktivierung pankreatischer Sternzellen beschäftigt. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere PDGF und TGF- β eine Schlüsselrolle zuteilwird (Mews, Phillips et al. 2002, Masamune and Shimosegawa 2009). Neben der Aktivierung der Zellen nimmt TGF- β außerdem Einfluss auf andere Zellfunktionen wie zum Beispiel der Produktion extrazellulärer Matrix, der Expression von α -SMA und einige mehr. Durch die Bindung von TGF- β an seinen Rezeptor werden Smad 2 und 3 phosphoryliert und führen letztendlich zur Transkription der Zielgene (Nakao, Imamura et al. 1997, Ohnishi, Miyata et al. 2004, Aoki, Ohnishi et al. 2007, Masamune and Shimosegawa 2009).

Um den Effekt der *in vitro* Behandlung mit TGF- β zu demonstrieren, wurden sowohl Zellen, die aus Ratten mittels Nycodenz-Methode gewonnen wurden, als auch humane Zellen aus der Outgrowth-Methode untersucht. Es ist bereits bekannt, dass humane Sternzellen und Sternzellen aus Ratten aus Primärkultur gleichermaßen auf TGF- β reagieren (Haas, Fitzner et al. 2009). So konnte im Western-Blot nach Stimulation bei beiden Kulturen vermehrt Smad nachgewiesen werden.

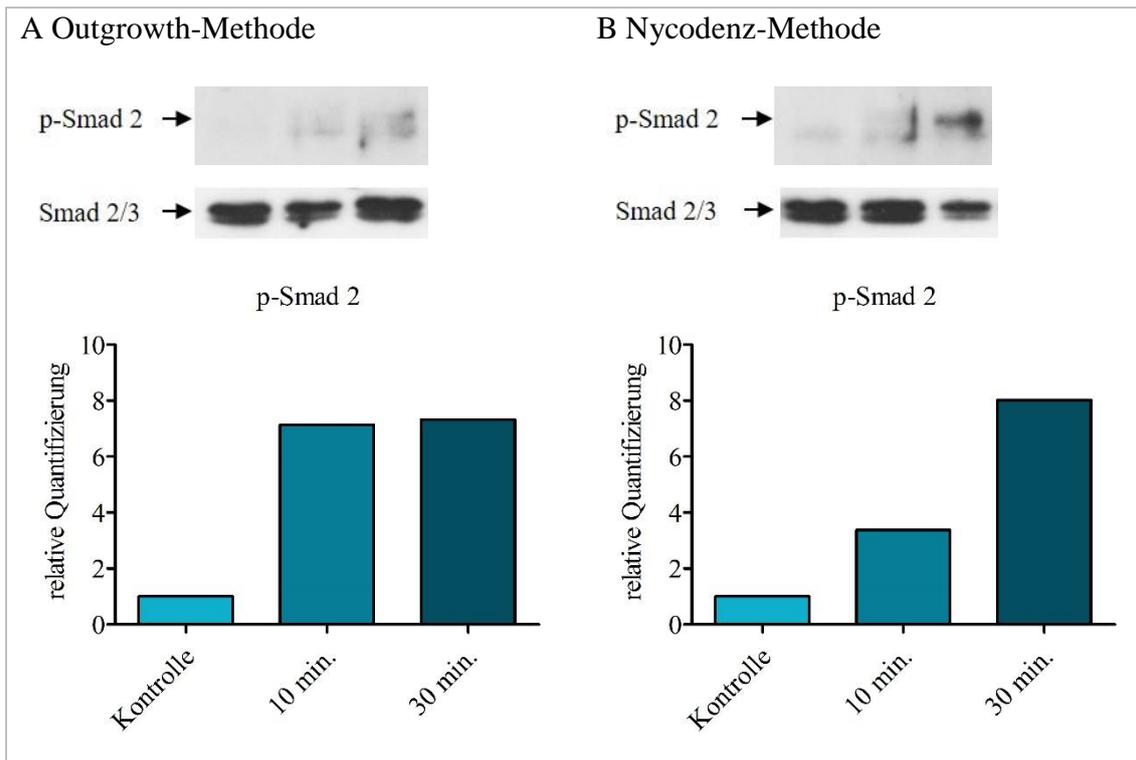


Abbildung 13 Vergleich des Einflusses von TGF- β auf Sternzellen aus unterschiedlichen Isolationsmethoden

A: Western-Blot mit Zelllysaten von hPSC, die durch die Outgrowth-Methode gewonnen wurden.

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

10 min.: 10 minütige Behandlung mit TGF- β (value 7,14; n=1)

30 min.: 30 minütige Behandlung mit TGF- β (value 7,33; n=1)

B: Western-Blot mit Zelllysaten von rPSC, die durch Dichtegradienten-Methode gewonnen wurden.

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

10 min.: 10 minütige Behandlung mit TGF- β (value 3,38; n=1)

30 min.: 30 minütige Behandlung mit TGF- β (value 8,03; n=1)

Wie bereits beschrieben ist TGF- β unter anderem von großer Bedeutung in der Expression von α -SMA. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, konnte bei Sternzellen mittels qPCR und Western Blot nach Stimulation ein signifikanter Anstieg der Expression von α -SMA nachgewiesen werden. Dieser Test hat sich mittlerweile als Kontrolle für die Aktivierung von Sternzellen in der Wissenschaft etabliert (Lee, Xu et al. 2015).

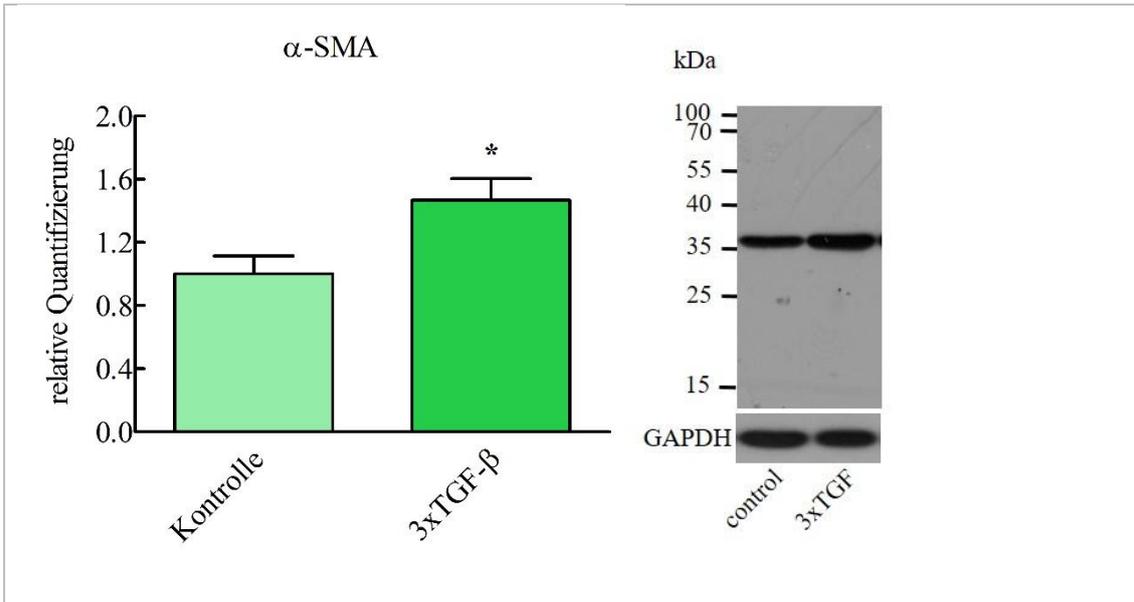


Abbildung 14 Auswertung einer qRT-PCR und Western Blot zum Vergleich der Expression von α -SMA bei nicht-stimulierten und stimulierten Sternzellen.

Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean $1 \pm \text{sem } 0,12$; $n=7$)

3xTGF- β : mit TGF- β stimulierte rPSC (mean $1,47 \pm \text{sem } 0,14$, $n=7$, p-value 0,02)

9.2.2 Stimulation durch Hypoxie

Im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge beim Pankreaskarzinom und der chronischen Pankreatitis kommt es zu fibrotischen Umbauvorgängen und damit einhergehender Hypovaskularisierung, sodass das umgebende Milieu zunehmend hypoxischer wird (Koong, Mehta et al. 2000, Buscail, Bournet et al. 2015). Um zu simulieren, welche Auswirkungen die hypoxischen Bedingungen auf die Sternzellen haben, wurden ruhende Sternzellen aus Rattenpankreas isoliert und 4 Tage lang bis zu ausreichender Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen, wie im Kapitel 8 beschrieben, mit serumfreiem Medium in einer Hypoxiekammer weiter kultiviert. Die zelluläre Antwort auf Hypoxie wird vor allem durch HIF-1 reguliert. HIF-1 besteht aus α und β Untergruppen. Während die β Untergruppe fortwährend exprimiert wird, wird die α Untergruppe bei Normoxie abgebaut. Ihre Aktivität ist also sozusagen ein zellulärer Marker für Gewebehypoxie (Semenza 2000, Masamune, Kikuta et al. 2008, Masamune and Shimosegawa 2009, Palazon, Goldrath et al. 2014). Durch Untersuchungen mittels qRT-PCR konnte demonstriert werden, dass die Sternzellen mit einer deutlich stärkeren Expression von HIF-1- α auf Hypoxie reagieren.

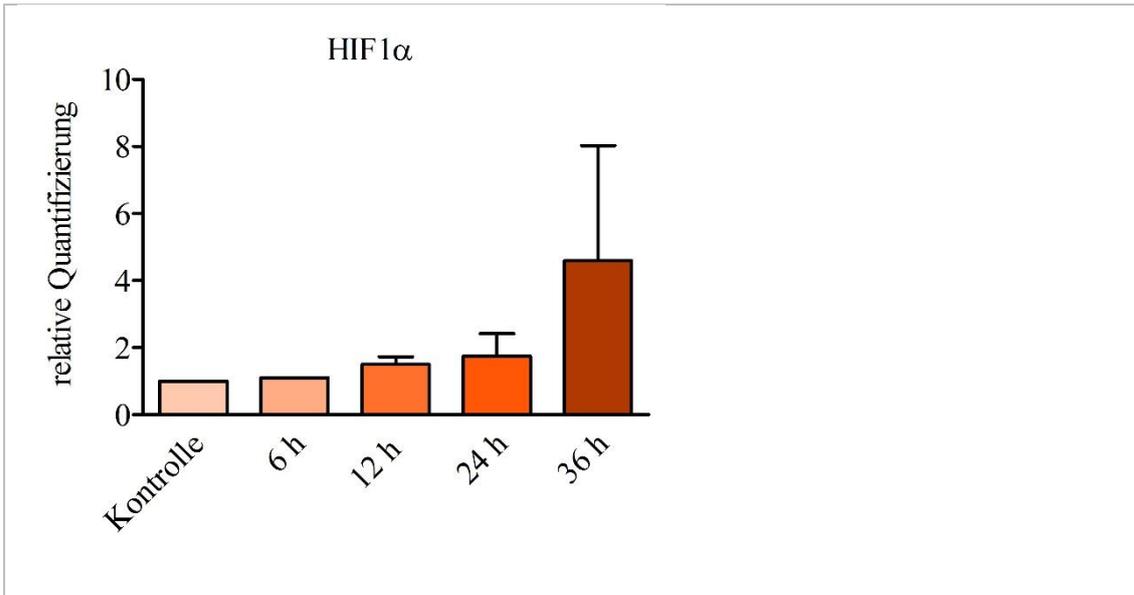


Abbildung 15 qRT-PCR zur Analyse der Expression von HIF-1- α bei rPSC bei unterschiedlich langer Kultivierung in der Hypoxiekammer.

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

6 h: 6 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 1,1; n=1)

12 h: 12 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (mean 1,51 \pm sem 0,22; n=2)

24 h: 24 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (mean 1,75 \pm sem 0,68; n=4)

36 h: 36 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (mean 4,60 \pm sem 3,44; n=2)

9.3 Analyse der neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren

Nachdem die Methodik zur Isolation ruhender Sternzellen etabliert war und gezeigt werden konnte, dass die Zellen in Kultur durch die Behandlung mit TGF- β und Hypoxie adäquat aktiviert werden, wurde nun im Folgenden die Expression der verschiedenen neurotrophen Faktoren und Rezeptoren untersucht.

9.3.1 NGF

Zunächst beschäftigte man sich mit dem Faktor NGF. Haas et al., konnten zeigen, dass pankreatische Sternzellen, die mit TGF- β stimuliert wurden, verstärkt NGF und seine korrespondierenden Rezeptoren exprimieren (Haas, Fitzner et al. 2009). Friess et al. untersuchten die Expression von NGF im Zusammenhang mit der chronischen Pankreatitis und fanden unter anderem eine erhöhte mRNA-Expression in metaplastischen duktalem Zellen, sowie Azinuszellen (Friess, Zhu et al. 1999). Weitere Untersuchungen von Ceyhan et al. zeigten, dass NGF eine wichtige Funktion im Hinblick auf die Entwicklung neuropathischer Schmerzen beim Pankreaskarzinom innehat (Ceyhan, Schäfer et al. 2010).

Bei den vorliegenden Versuchen wurden die Sternzellen mit einer Dosis von 1 $\mu\text{g/ml}$ TGF- β behandelt oder in der Hypoxiekammer kultiviert. Mittels qRT-PCR konnten nur relativ geringe Werte für NGF nachgewiesen werden. Auch konnte keine relevante Zunahme der Expression im Verlauf der Aktivierung beobachtet werden. Für einen aussagekräftigen Nachweis mit Western Blot waren die Mengen leider zu gering.

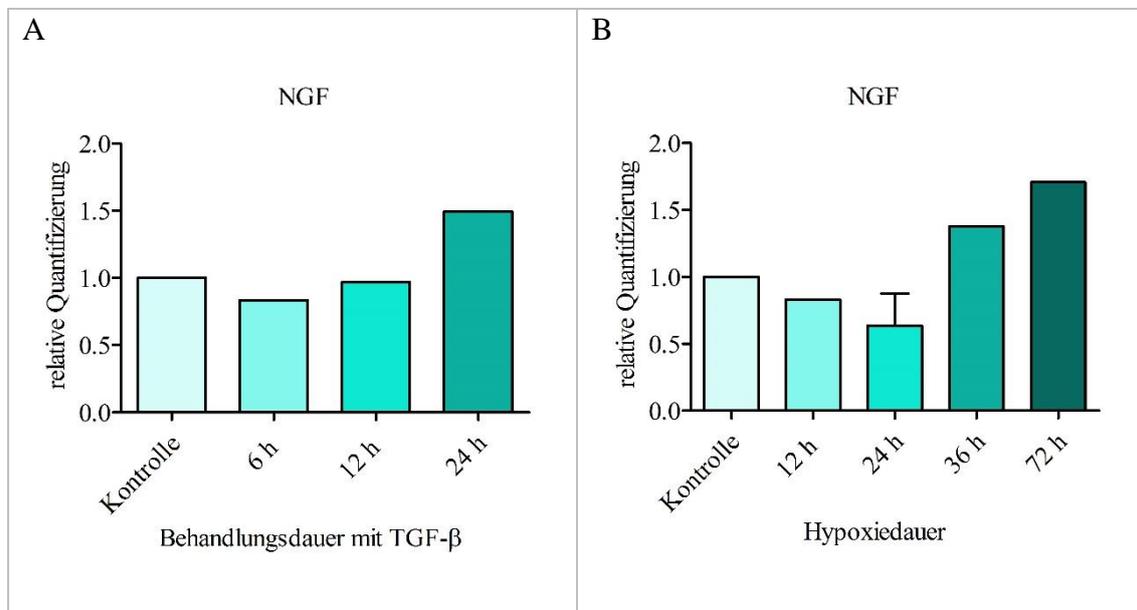


Abbildung 16 Untersuchung des Faktors NGF mittels qRT-PCR mit rPSC

A: nach Behandlung mit TGF- β

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

6 h: 6 stündige Behandlung mit TGF- β (value 0,83; n=1)

12 h: 12 stündige Behandlung mit TGF- β (value 0,97; n=1)

24 h: 24 stündige Behandlung mit TGF- β (value 1,49; n=1)

B: Kultivierung in der Hypoxiekammer

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

12 h: 12 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 0,83; n=1)

24 h: 24 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (mean 0,64 \pm sem 0,17; n=2)

36 h: 36 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 1,38; n=1)

72 h: 72 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 1,71; n=1)

9.3.2 GDNF

Western Blot

Auf proteinchemischer Ebene konnte der Faktor GDNF mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern leider nicht nachgewiesen werden.

qRT-PCR

Bei den Versuchen unter hypoxischen Bedingungen im Hinblick auf GDNF zeigte sich auf mRNA-Ebene eine tendenzielle, nicht signifikante Zunahme der Expression im zeitlichen Verlauf.

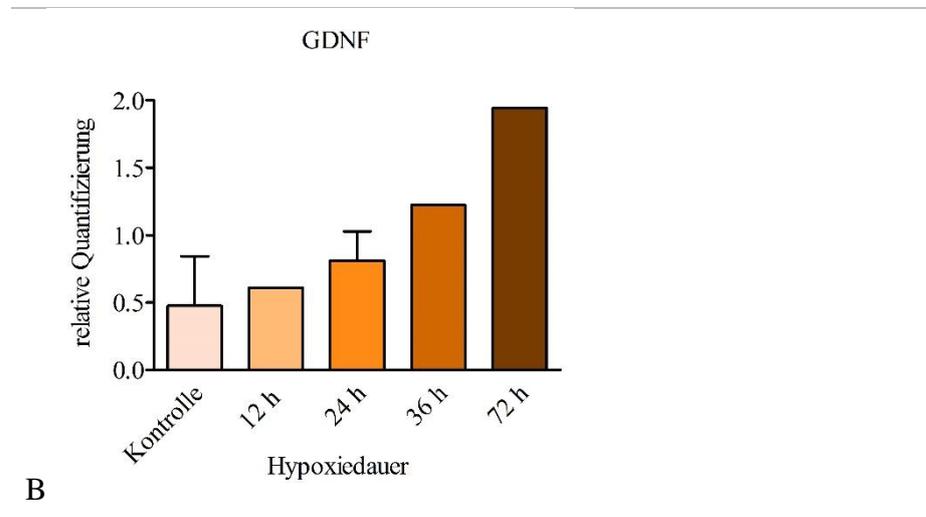


Abbildung 17 Untersuchung des Faktors GDNF mittels qRT-PCR.

Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 0,48 ± sem 0,37; n=2)

12 h: 12 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 0,61; n=1)

24 h: 24 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (mean 0,81 ± sem 0,21; n=2)

36 h: 36 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 1,22; n=1)

72 h: 72 stündige Inkubation in der Hypoxiekammer (value 1,94; n=1)

Um zu sehen, wie sich der Wert des Faktors über die Zeit hin weiter verhält, wurden noch längere Inkubationszeiten hinzugefügt. Hier zeigte sich in den vorliegenden Einzelversuchen auch ein Trend hin zu einem weiteren Anstieg nach 36 und 72 Stunden. Im Hinblick auf die Behandlung mit TGF- β kann man eine dezente, nicht signifikante Zunahme der Expression zwischen der Kontrolle und der 24h-Probe erkennen.

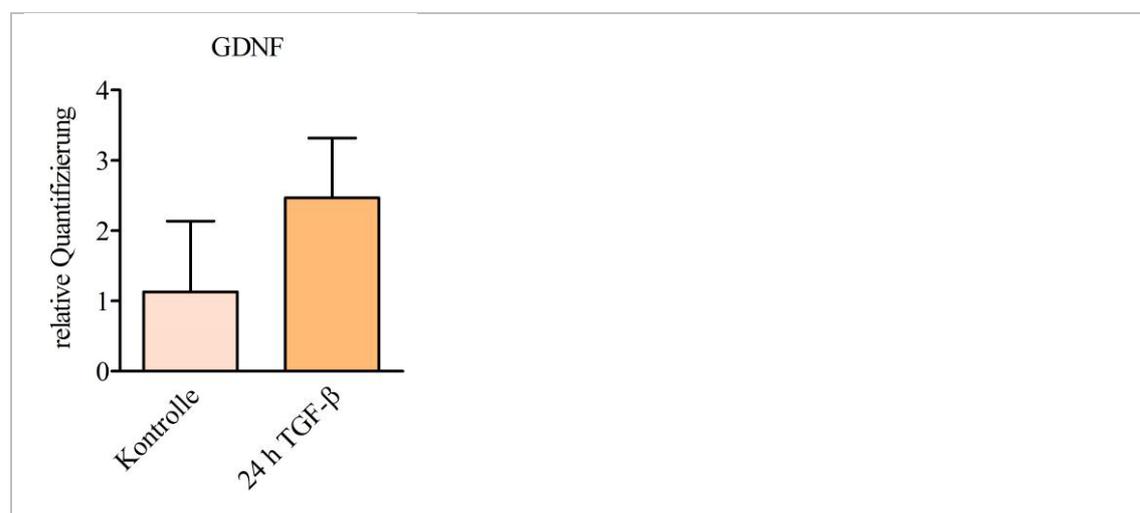


Abbildung 18 Untersuchung des Faktors GDNF mittels qRT-PCR mit rPSC nach Behandlung mit TGF- β

Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1,13 ± sem 1,01; n=2)

24 h TGF- β : 24 stündige Behandlung mit TGF- β (mean 2,47 ± sem 0,85; n=2)

9.3.3 GFR α 1

Western Blot

Bei den Untersuchungen konnte GFR α 1 im Western Blot detektiert werden. Eine signifikante Veränderung der Expression im Zuge der Aktivierung zeigte sich jedoch nicht.

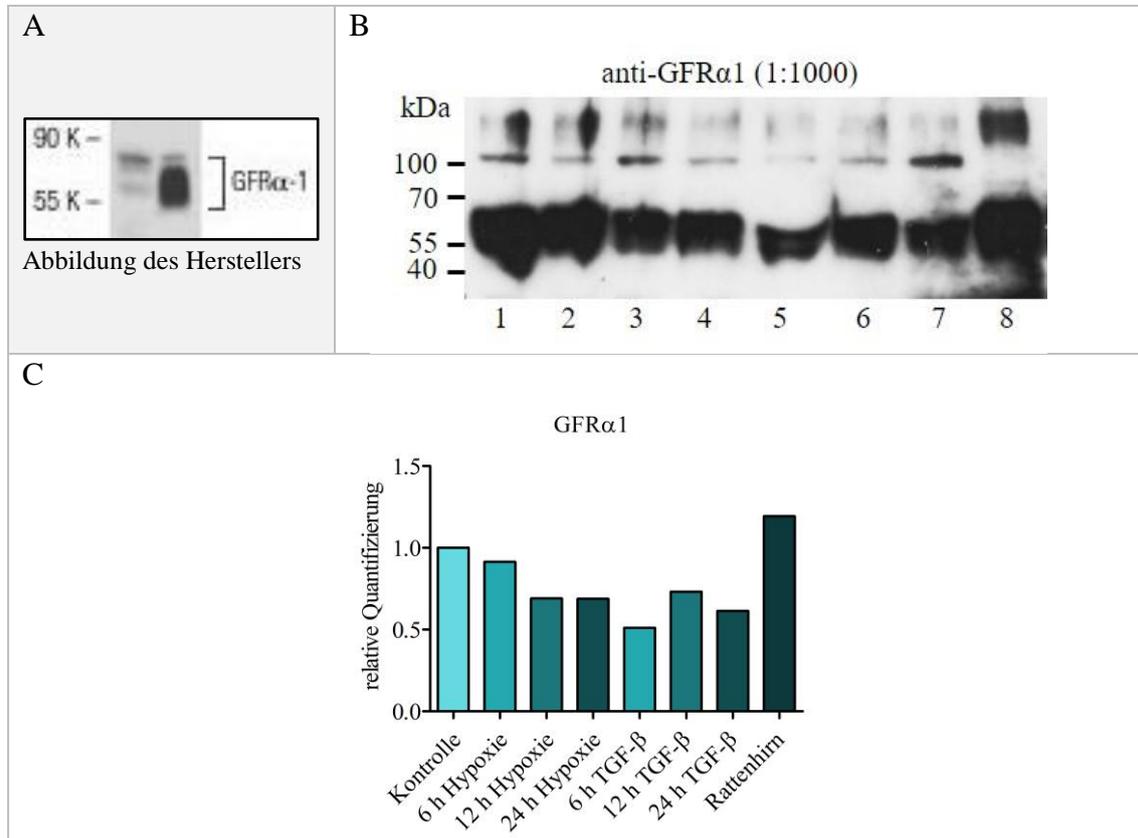


Abbildung 19 Western Blot mit anti-GFR α 1 Antikörper

A: Abbildung des Herstellers <http://www.scbt.com/datasheet-10716-gfralpha-1-h-70-antibody.html>

B: (1) unbehandelte Kontrolle, (2) 6-stündige Behandlung in der Hypoxiekammer, (3) 12-stündige Behandlung in der Hypoxiekammer, (4) 24-stündige Behandlung in der Hypoxiekammer, (5) 6-stündige Behandlung mit TGF- β , (6) 12-stündige Behandlung mit TGF- β , (7) 24-stündige Behandlung mit TGF- β , (8) Lysat aus Rattenhirn

C: Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

6 h Hypoxie: rPSC nach 6 h Inkubation in der Hypoxiekammer (value 0,91; n=1)

12 h Hypoxie: rPSC nach 12 h Inkubation in der Hypoxiekammer (value 0,69; n=1)

24 h Hypoxie: rPSC nach 24 h Inkubation in der Hypoxiekammer (value 0,69; n=1)

6 h TGF- β : rPSC nach 6 stündiger Behandlung mit TGF- β (value 0,51; n=1)

12 h TGF- β : rPSC nach 12 stündiger Behandlung mit TGF- β (value 0,73; n=1)

24 h TGF- β : rPSC nach 24 stündiger Behandlung mit TGF- β (value 0,61; n=1)

Rattenhirn: Lysat aus Rattenhirn (value 1,19; n=1)

qRT-PCR

Zur Untersuchung der GFR α 1-Expression auf mRNA Ebene wurden ruhende Sternzellen zweimal im Abstand von 24 Stunden mit TGF- β stimuliert. Eine relevante Veränderung in der Regulation konnte auch hier nicht festgestellt werden.

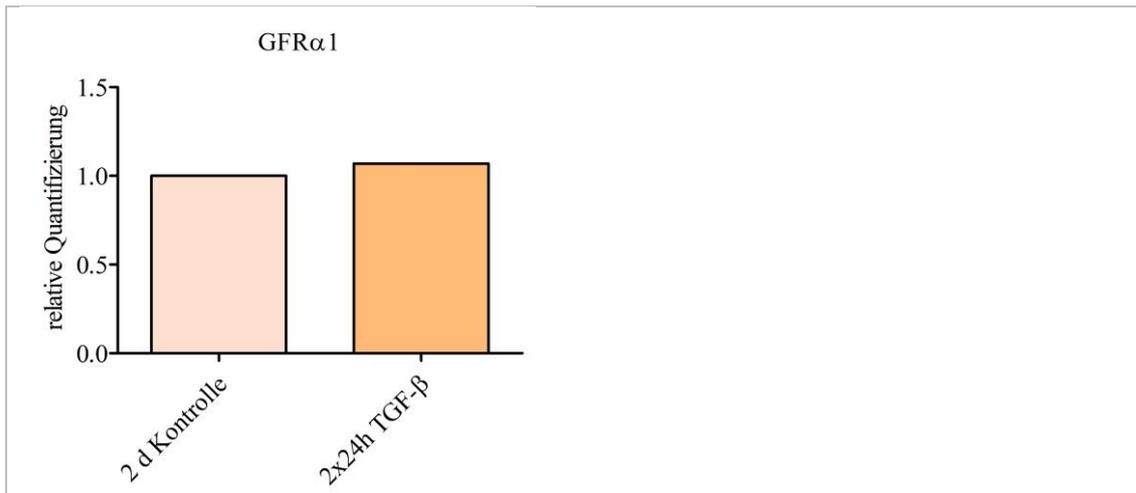


Abbildung 20 Untersuchung des Rezeptors $GFR\alpha 1$ mit rPSC nach Behandlung mit TGF- β

2 d Kontrolle: unbehandelte rPSC (2 Tage lang in Kultur) (value 1; n=1)

2x24 h TGF- β : 2x24 stündige Behandlung mit TGF- β (value 1,07; n=1)

9.3.4 Neurturin

Western Blot

In den Untersuchungen mit Zelllysaten aus rPSC stellten sich die in der Abbildung 21 angegebenen Banden dar. Die Bande 1 bei ca. 50-56 kDa beschreibt die tetramere Isoform, die aus Monomeren von ca. 11,5-14 kDa zusammengesetzt ist (Demir, Wang et al. 2012). Die Bande 2 bei ca. 40-45 kDa repräsentiert die dimere pro-Form des Proteins (Wang, Demir et al. 2014). Die Bande 3 bei ca. 37 kDa wird bisweilen sichtbar, ist aber in der aktuellen Literatur nicht näher beschrieben. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich auch um eine weitere pro-Form dieses Proteins. Die Bande 4 bei ca. 18-23 kDa beschreibt eine monomere pro-Form (wahrscheinlich 22,4 kDa) (Demir, Wang et al. 2012). Die Bande 5 bei ca. 15-17 kDa repräsentiert die monomere Isoform des Neurturins (Demir, Wang et al. 2012).

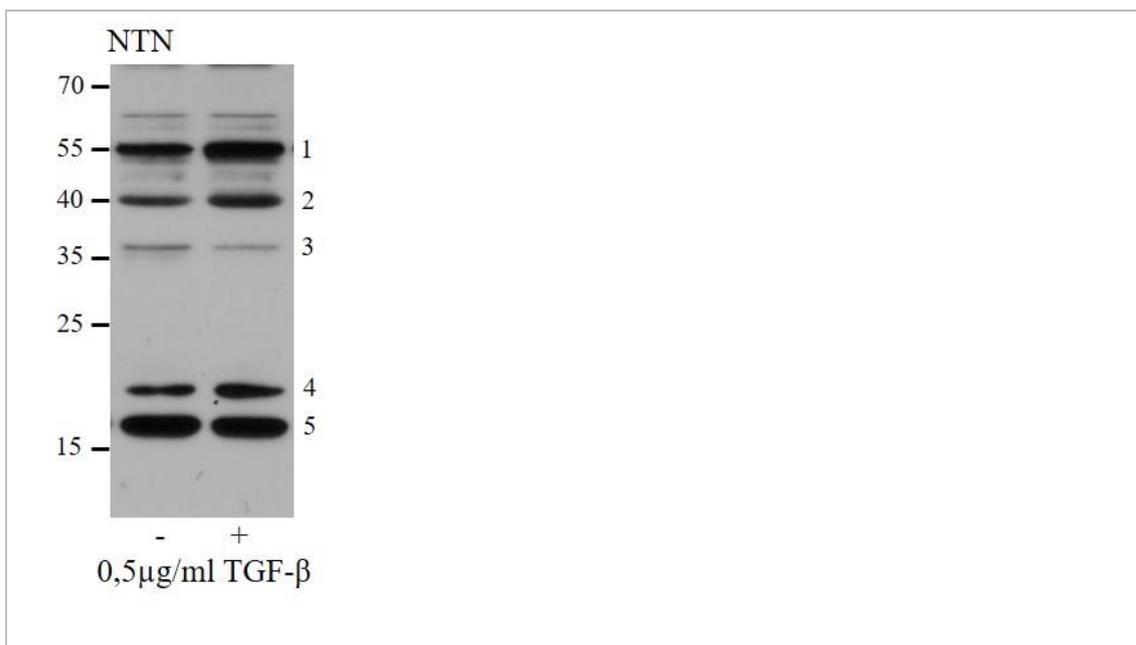


Abbildung 21 Untersuchung des Faktors Neurturin bei rPSC nach dreimaliger Stimulation durch TGF- β , Western Blot mit anti-Neurturin-Antikörper

- (1) tetramere Isoform (50-56 kDa)
- (2) dimere pro-Form (ca. 40-45 kDa)
- (3) am ehesten weitere pro-Form (ca. 37 kDa) (in der Literatur nicht näher klassifiziert)
- (4) monomere pro-Form (ca. 18-23 kDa)
- (5) monomere Isoform (ca. 15-17 kDa)

Vor den eigentlichen Versuchen wurde eine Testreihe zur Evaluation der maximalen Aktivierung durch TGF- β durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit TGF- β behandelt und nach 24 Stunden lysiert oder nochmals nach 24 Stunden und 48 Stunden mit TGF- β behandelt und dann lysiert.

Da man den größten Effekt der Aktivierung nach dreimaliger Stimulation sehen konnte, wurden alle Sternzellen für die Untersuchung des neurotrophen Faktors Neurturin dreimal mit 0,5 μ g/ml TGF- β nach folgendem Schema stimuliert:

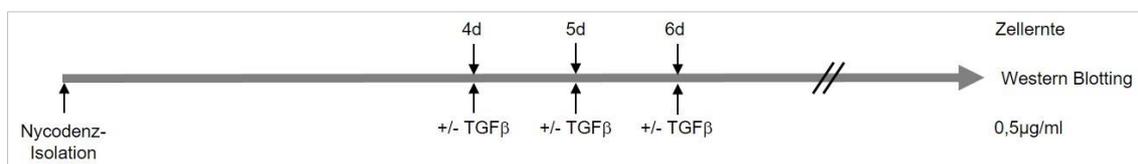


Abbildung 22 zeitliches Schema der Stimulation von rPSC

In Abbildung 23 sind die jeweiligen Quantifizierungen der einzelnen Banden nach Stimulation dargestellt.

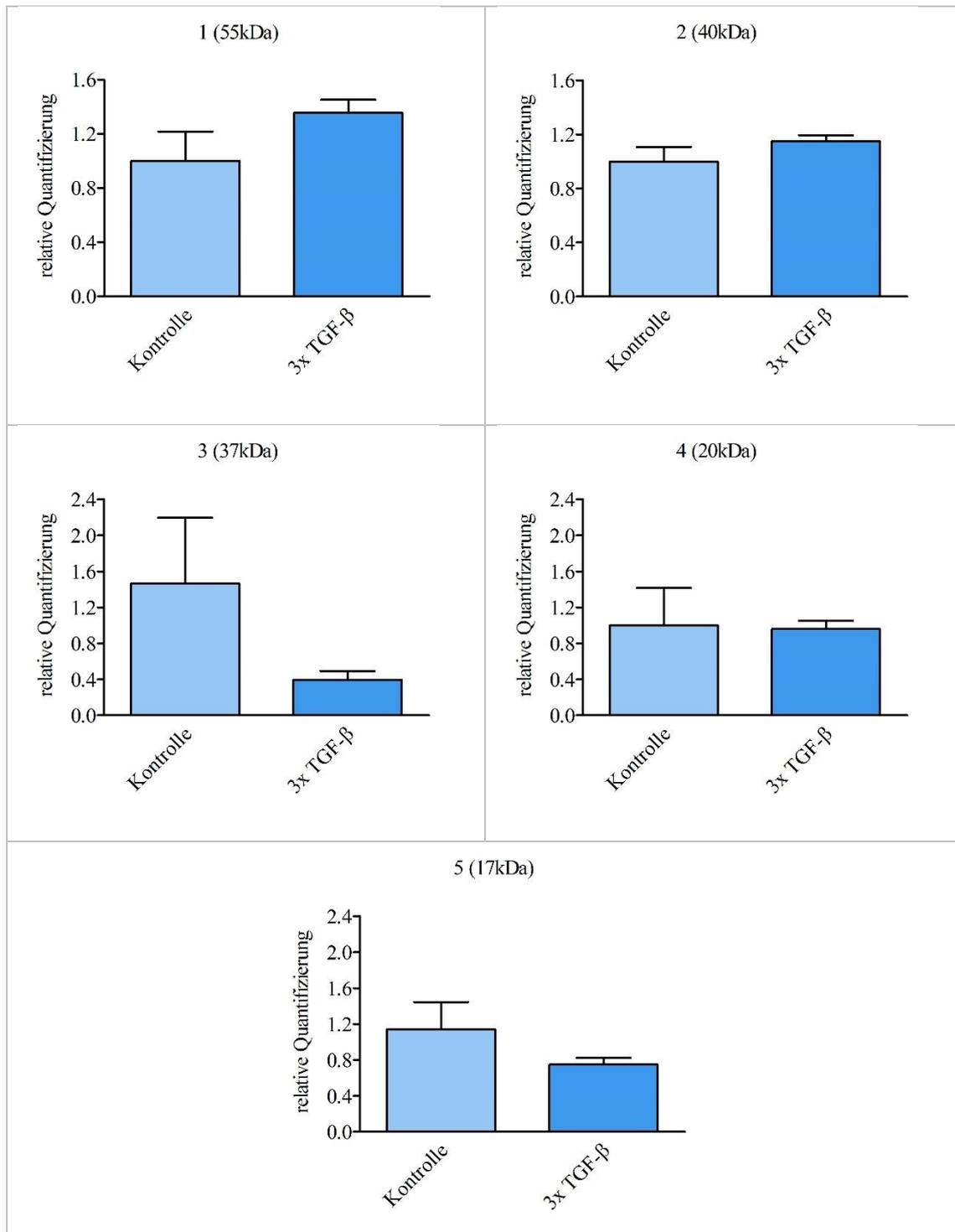


Abbildung 23 Auswertung der verschiedenen Banden bei Western Blot mit anti-Neurturin-Antikörper

- 1 Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1 ± sem 0,22; n=3)
3xTGF-β: rPSC, die dreimal mit TGF-β stimuliert wurden (mean 1,35 ± sem 0,1; n=3) (p=0,21)
- 2 Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1 ± sem 0,11; n=3)
3xTGF-β: rPSC, die dreimal mit TGF-β stimuliert wurden (mean 1,15 ± sem 0,04; n=3) (p=0,27)
- 3 Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1,46 ± sem 0,73; n=2)
3xTGF-β: rPSC, die dreimal mit TGF-β stimuliert wurden (mean 0,4 ± sem 0,1; n=2) (p=0,28)
- 4 Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1,0 ± sem 0,42; n=3)
3xTGF-β: rPSC, die dreimal mit TGF-β stimuliert wurden (mean 0,96 ± 0,09; n=3) (p=0,93)

- 5 Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1,14 ± sem 0,3; n=2)
3xTGF-β: rPSC, die dreimal mit TGF-β stimuliert wurden (mean 0,75 ± sem 0,08; n=2) (p=0,34)

qRT-PCR

Auf DNA-Ebene kann nach Stimulation mit TGF-β ein Anstieg der Transkription von Neurturin verzeichnet werden.

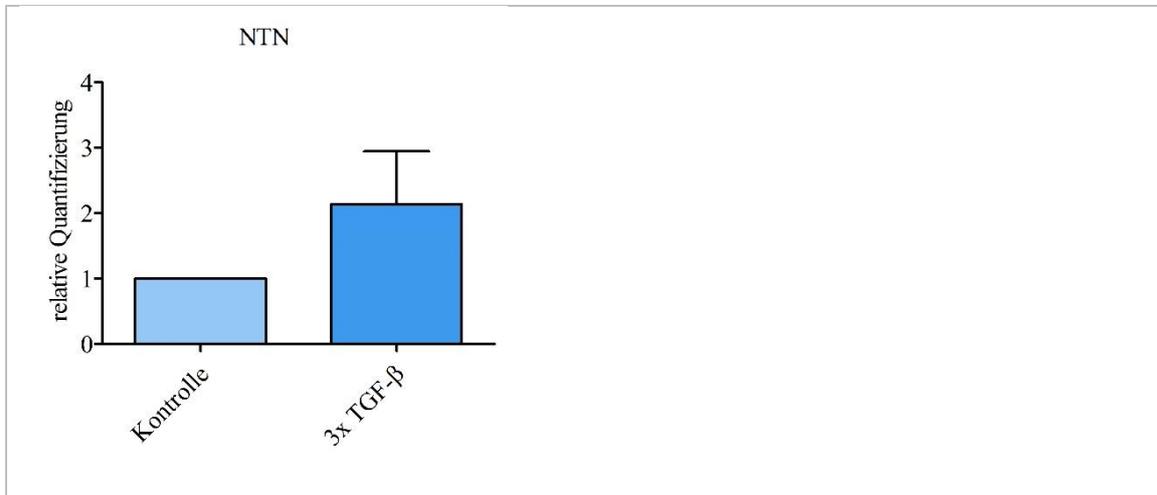


Abbildung 24 Expression von Neurturin bei rPSC nach Stimulation mit TGF-β Expressionsniveaus von Neurturin bei unbehandelten, und dreimal stimulierten rPSC

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

3xTGF-β: rPSC, die dreimal mit TGF-β stimuliert wurden (mean 2,14 ± sem 0,57; n=2)

Bei den Versuchen in der Hypoxiekammer zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proben. Ein geringer Trend ist jedoch erkennbar. Bei der hier vorliegenden Expressionsanalyse (Abbildung 25) wurden die Zellen 12 oder 24 Stunden lang in einer Hypoxiekammer inkubiert. Zum Vergleich wurden Kontrollzellen gleich lang in serumfreiem Medium unter normalen Bedingungen weiter inkubiert.

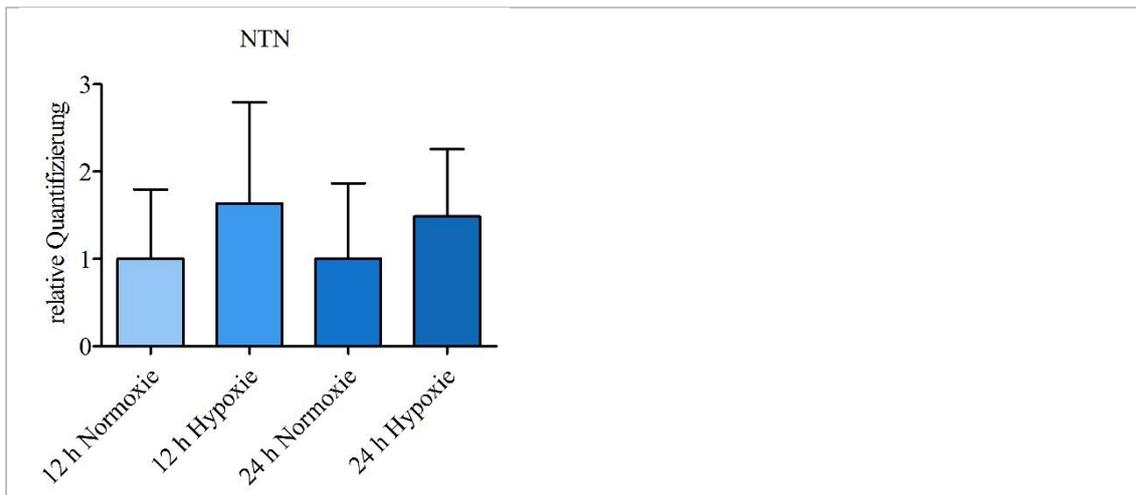


Abbildung 25 Expressionsanalyse von Neurturin bei Hypoxie

12 h Normoxie: unbehandelte rPSC (mean $1 \pm \text{sem } 0,56$; $n=2$)

12 h Hypoxie: rPSC nach 12 h Inkubation in der Hypoxiekammer (mean $1,64 \pm \text{sem } 0,67$; $n=3$) ($p=0,55$)

24 h Normoxie: unbehandelte rPSC (mean $1 \pm \text{sem } 0,62$; $n=2$)

24 h Hypoxie: rPSC nach 24 h Inkubation in der Hypoxiekammer (mean $1,49 \pm \text{sem } 0,38$; $n=4$) ($p=0,52$)

9.3.5 GFR α 2

Western Blot

Der Rezeptor GFR α 2 konnte im Western Blot gut detektiert werden. Allerdings konnte durch die Stimulation keine nennenswerte Regulation des Rezeptors erreicht werden.

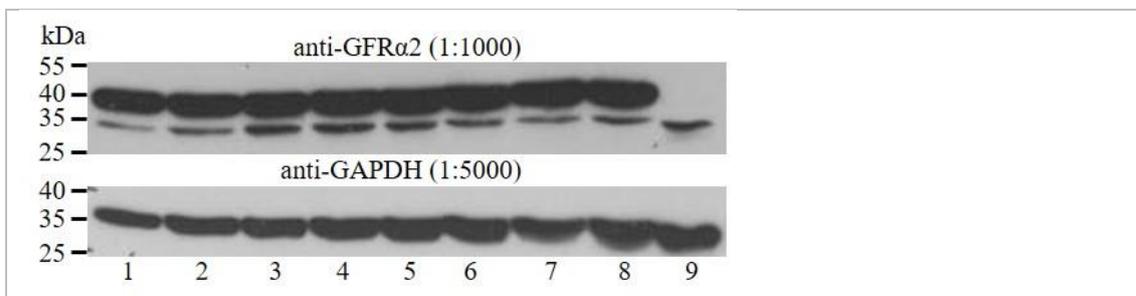


Abbildung 26 Western Blot mit GFR α 2

Nycodenz-rPSC: (1) 0h Kontrolle, (2) 6h TGF- β , (3) 12h TGF- β , (4) 24h TGF- β

Mesh-Fibroblasten: (5) 0h Kontrolle, (6) 6h TGF- β , (7) 12h TGF- β , (8) 24h TGF- β

(9) Rattenhirn

9.3.6 Artemin

Western Blot

Als spezifische Bande wird für den neurotrophen Faktor Artemin laut Hersteller eine Masse von ca. 23 kDa angegeben. Nichts desto trotz findet man in der Literatur häufiger

die Angabe einer spezifischen Bande bei ca. 40 kDa (Ceyhan, Giese et al. 2006, Ceyhan, Bergmann et al. 2007).

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnte die Bande bei 23 kDa nicht immer zuverlässig dargestellt werden. Die Bande bei 40 kDa war jedoch stets gut detektierbar.

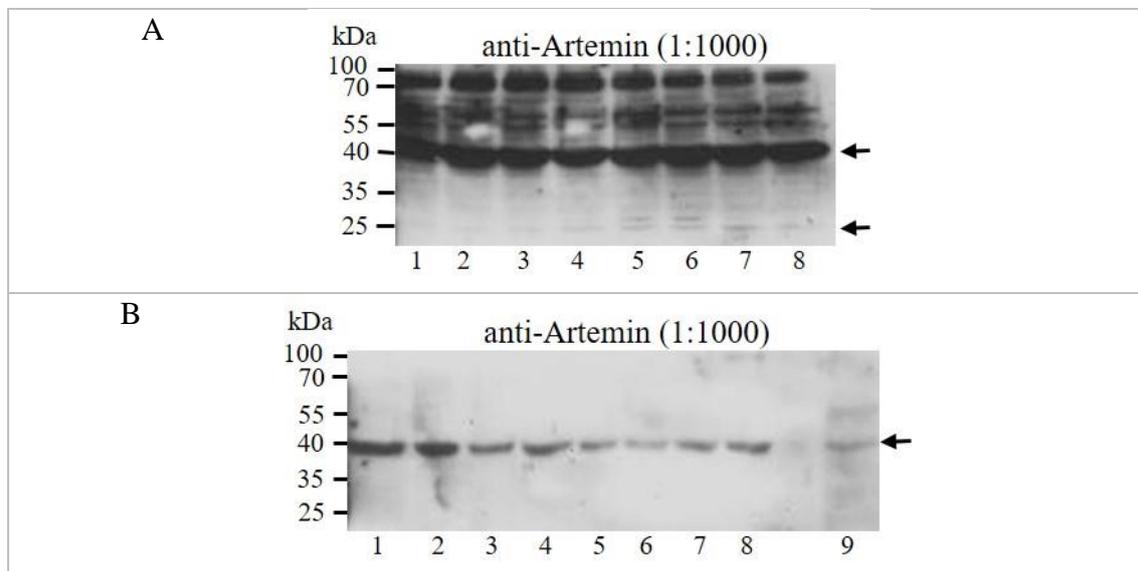


Abbildung 27 Western Blot von rPSC nach TGF β -Behandlung

- A: Nycodenzmethode: (1) 0h Kontrolle, (2) 6h TGF- β , (3) 12h TGF- β , (4) 24h TGF- β
 Mesh-Fibroblasten: (5) 0h Kontrolle, (6) 6h TGF- β , (7) 12h TGF- β , (8) 24h TGF- β
 B: Nycodenzmethode: (1) 0h Kontrolle, (2) 6h TGF- β , (3) 12h TGF- β , (4) 24h TGF- β
 Mesh-Fibroblasten: (5) 0h Kontrolle, (6) 6h TGF- β , (7) 12h TGF- β , (8) 24h TGF- β
 (9) Rattenhirn

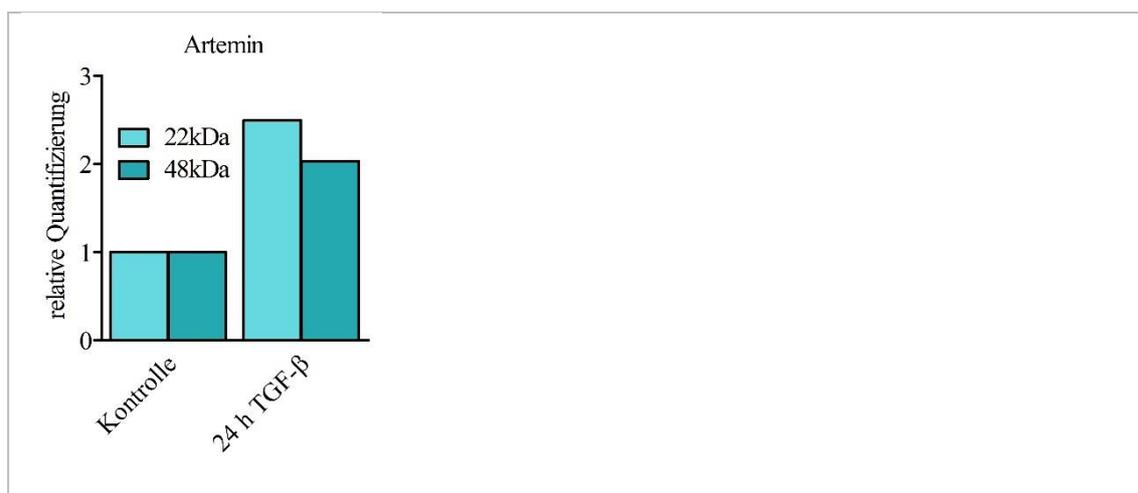


Abbildung 28 Proteinchemische Untersuchung von Artemin mit rPSC

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value 1; n=1)

24 h TGF- β 22 kDa: 24 stündige Behandlung mit TGF- β (value 2,49; n=1)

24 h TGF- β 48 kDa: 24 stündige Behandlung mit TGF- β (value 2,03; n=1)

Wie man auf der Grafik erkennen kann, bewirkt die Stimulation mit TGF- β auf Proteinebene einen Anstieg der Expression des neurotrophen Faktors Artemin. Die

vorliegenden Daten beziehen sich auf Einzelversuche. Eine Aussage zur Signifikanz ist deshalb nicht zu treffen.

qRT-PCR

Auf DNA-Ebene lässt sich nach Stimulation mit TGF- β eine verhältnismäßige Zunahme der Expression des neurotrophen Faktors Artemin registrieren (Abbildung 29A). In der relativen Quantifizierung zeigte sich nach 24 stündiger Behandlung mit TGF- β ein Wert von $2,45 \pm 0,51$ im Vergleich zur Kontrolle. Einen Einfluss scheint auch die Inkubation unter hypoxischen Verhältnissen auf die Expression des Artemins auszuüben (Abbildung 33B). Hier zeigte sich im Vergleich zwischen der Kontrolle und 24 stündiger Inkubation in der Hypoxiekammer ein signifikanter Anstieg auf einen Wert von $4,04 \pm 0,87$.

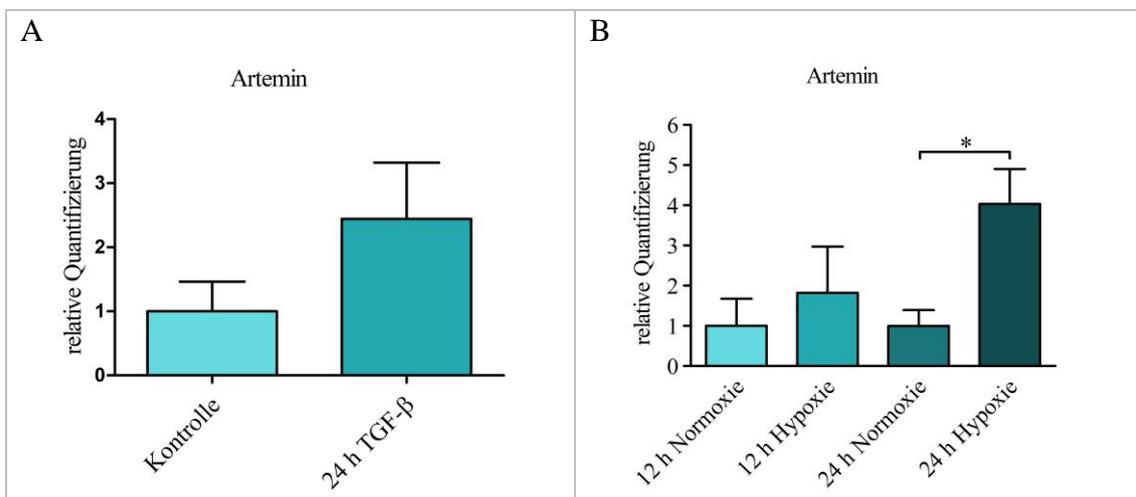


Abbildung 29 Untersuchung des neurotrophen Faktors Artemin mit qRT-PCR

A: Einmalige Behandlung mit TGF- β

Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean $1 \pm \text{sem } 0,27$; $n=3$)

24 h TGF- β : 24 stündige Behandlung mit TGF- β (mean $2,45 \pm \text{sem } 0,51$; $n=3$) ($p=0,07$)

B: Inkubation unter hypoxischen Bedingungen.

12 h Normoxie: unbehandelte rPSC nach 12 Stunden Inkubation in serumfreiem Medium (mean $1 \pm \text{sem } 0,67$; $n=2$)

12 h Hypoxie: rPSC nach 12 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer (mean $1,82 \pm \text{sem } 1,15$; $n=2$) ($p=0,60$)

24 h Normoxie: unbehandelte rPSC nach 24 Stunden Inkubation in serumfreiem Medium (mean $1 \pm \text{sem } 0,39$; $n=3$)

24 h Hypoxie: rPSC nach 24 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer (mean $4,04 \pm \text{sem } 0,87$; $n=3$) ($p=0,03$)

9.3.7 GFR α 3

Western Blot

Auch bei dem Rezeptor GFR α 3 kann man im Western Blot keine nennenswerten Unterschiede durch die Stimulation detektieren.

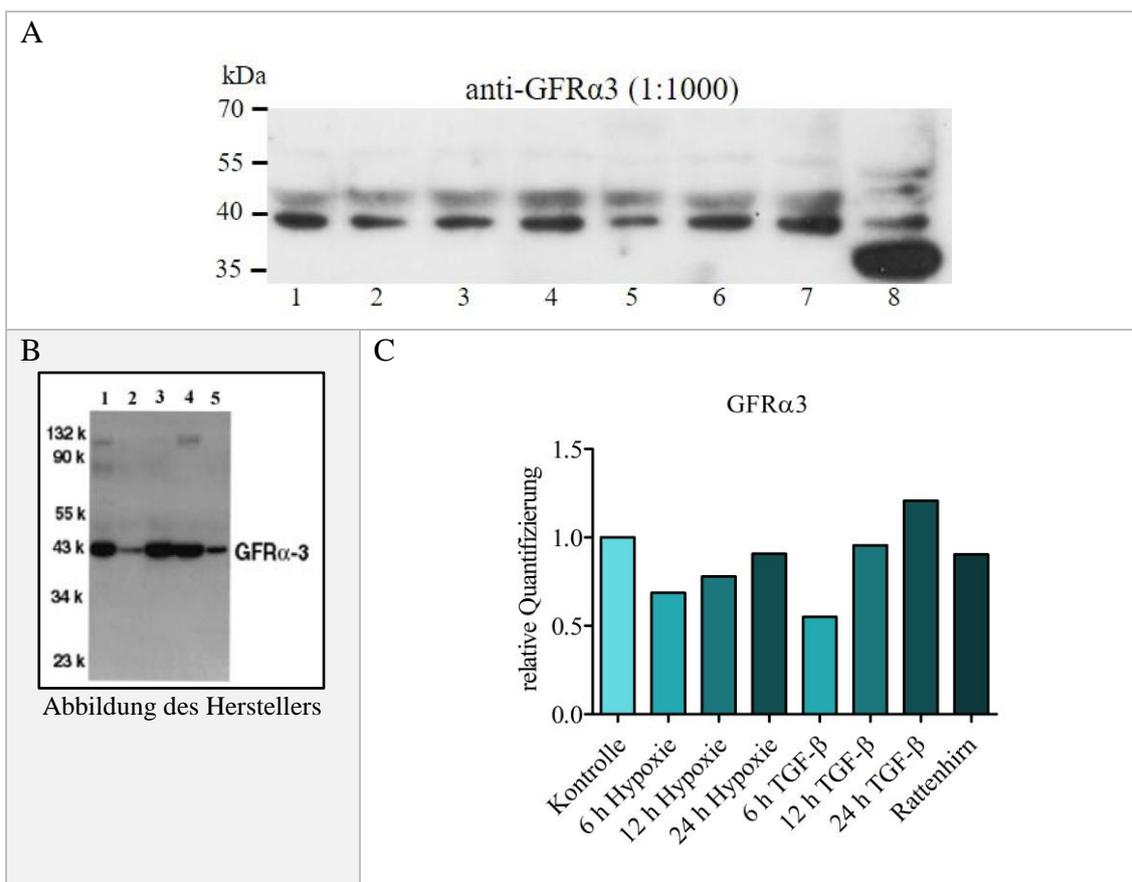


Abbildung 30 Western Blot mit anti-GFR α 3 von rPSC nach Behandlung mit TGF- β und Hypoxie

A: Abbildung des Herstellers <http://www.abcam.com/gfr-alpha-3-antibody-ab8028.html>

B: (1) 0h Kontrolle, (2) 6h Hypoxie, (3) 12h Hypoxie, (4) 24h Hypoxie.
(5) 6h TGF- β , (6) 12h TGF- β , (7) 24h TGF- β , (8) Rattenhirn

C: Kontrolle: unbehandelte rPSC

6 h Hypoxie: rPSC nach 6 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer

12 h Hypoxie: rPSC nach 6 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer

24 h Hypoxie: rPSC nach 6 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer

6 h TGF- β : rPSC nach 6 stündiger Behandlung mit TGF- β

12 h TGF- β : rPSC nach 6 stündiger Behandlung mit TGF- β

24 h TGF- β : rPSC nach 6 stündiger Behandlung mit TGF- β

Rattenhirn: Lysat aus Rattenhirn

9.3.8 Persephin

Western Blot

Die Proteinmengen von Persephin lagen leider unterhalb der Nachweisgrenze.

qRT-PCR

Der neurotrophe Faktor Persephin ließ sich nur in sehr geringen Mengen überhaupt mit der qRT-PCR nachweisen. Zwar kann man eine Zunahme der Expression als Trend erkennen, die Ergebnisse sind jedoch aufgrund der geringen Ausbeute und hohen Streubreite differenziert zu betrachten.

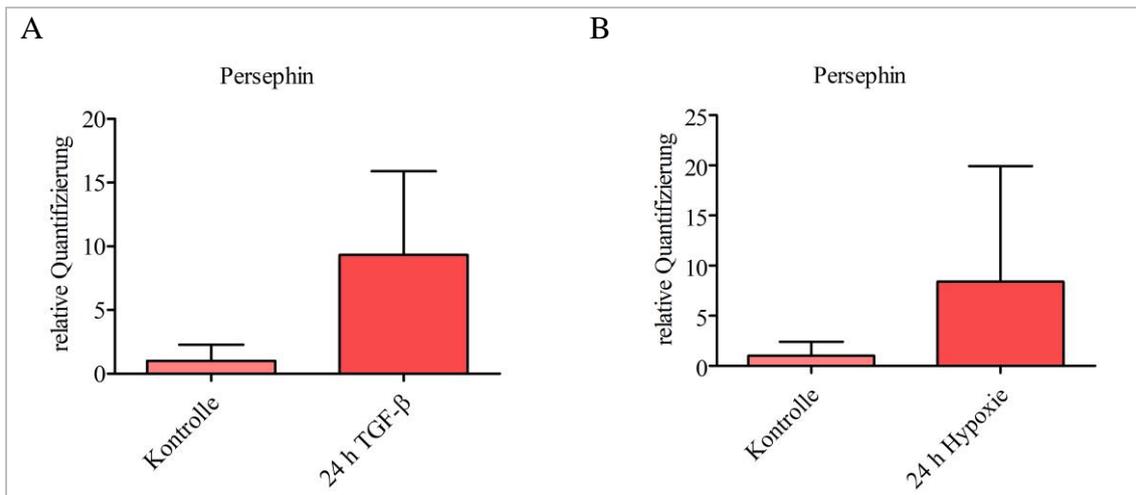


Abbildung 31 Expressionsanalyse von Persephin mit rPSC

A: Einmalige Behandlung mit TGF-β

Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1 ± sem 0,91; n=2)

24 h TGF-β: 24 stündige Behandlung mit TGF-β (mean 9,3 ± sem 4,65; n=2) (p= 0,25)

B: Inkubation unter hypoxischen Bedingungen.

Kontrolle: unbehandelte rPSC (mean 1 ± sem 1; n=2)

24 h Hypoxie: rPSC nach 24 Stunden Inkubation in der Hypoxiekammer (mean 8,40 ± sem 8,15; n=2) (p= 0,16)

9.3.9 GFRα4

Leider war es mithilfe von Western Blotting oder qRT-PCR nicht möglich im Hinblick auf GFRα4 kongruente Ergebnisse zu erzielen.

9.4 Behandlung von Sternzellen mit Calcipotriol

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der Vitamin D Rezeptor bei pankreatischen Sternzellen im Rahmen der Aktivierung als Genregulator eine Rolle spielt. Durch Induktion mittels Calcipotriol konnte hier eine Abnahme der Aktivierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Dadurch wurde die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren verringert, und im PDA-Mausmodell sogar das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Gemcitabine verbessert (Sherman, Yu et al. 2014).

Die vorliegenden Einzelversuche dienen als Vorarbeiten für weitere Untersuchungen. Die Zellen wurden 48 Stunden lang mit 100nM Calcipotriol behandelt.

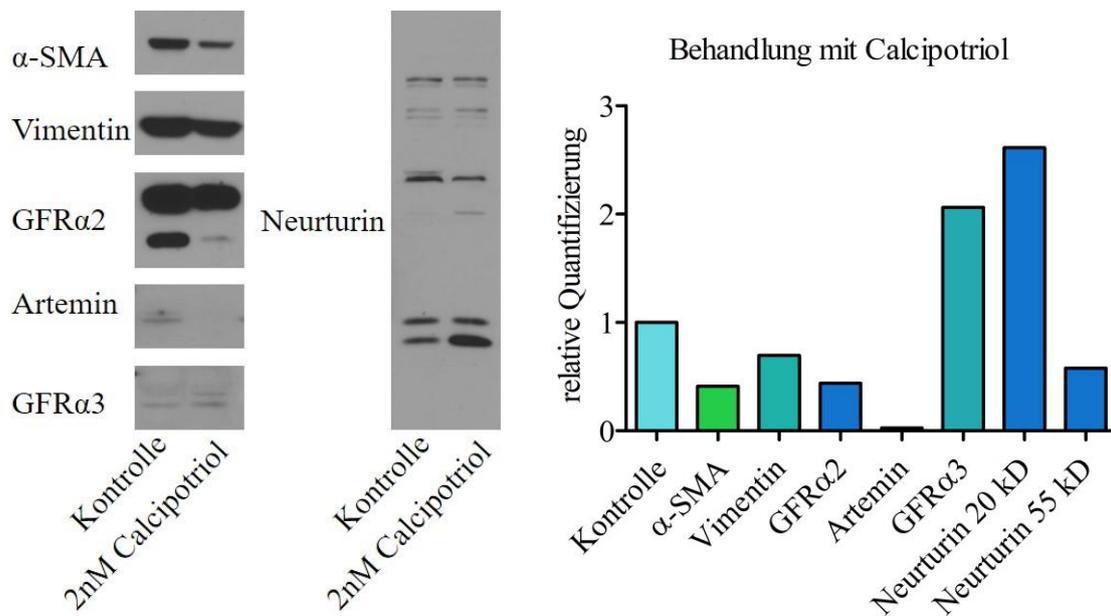


Abbildung 32 Behandlung von pankreatischen Sternzellen mit 100nM Calcipotriol

Kontrolle: unbehandelte rPSC (value=1)

α -SMA (value=0,41)

Vimentin (value=0,70)

GFR α 2 (value=0,44)

Artemin (value=0,03)

GFR α 3 (value=2,06)

Neurturin 20 kD (value=2,61)

Neurturin 50 kD (value=0,58)

Bei den Untersuchungen mittels Western Blot konnte man eine Abnahme der Menge an α -SMA, Vimentin, GFR α 2, Artemin und der 55 kD Bande von Neurturin nachweisen. GFR α 3 und die 20 kD Bande von Neurturin nahmen hingegen zu.

10. Diskussion

10.1 Notwendigkeit der Untersuchung von Sternzellen

Wie im Kapitel 1 genauer erläutert, und in der Literatur vielfach beschrieben, stellen nach wie vor die Hauptprobleme der Therapie des Pankreaskarzinoms die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und die rasche Metastasierung des Tumors dar (McCarroll, Sharbeen et al. 2014). Dies spiegelt sich vor allem darin wider, dass trotz jahrzehntelanger intensiver Grundlagenforschung und Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten, die generelle 5-Jahres-Überlebensrate mit gerade einmal 5-8 % immer noch sehr gering ausfällt (Jemal, Siegel et al. 2009, Demir, Ceyhan et al. 2010, Kaatsch, Spix et al. 2013).

Im Bereich der Krebsforschung hat sich in den letzten Jahren die perineurale Invasion als wichtiger Angriffspunkt vieler Tumorentitäten besonders etabliert (Liebig, Ayala et al. 2009, Liebig, Ayala et al. 2009, Demir, Ceyhan et al. 2010). Die Inzidenz der perineuralen Invasion liegt beim Pankreaskarzinom bei 100%, was die Wichtigkeit dieses Phänomens unterstreicht (Liu and Lu 2002, Ceyhan, Demir et al. 2008, Liebl, Demir et al. 2014).

Bis heute existieren noch zwei Hypothesen darüber, wie es zur perineuralen Invasion beim Pankreaskarzinom kommt: Zum einen die Hypothese über den „path of low resistance“ und zum anderen die Hypothese über „reciprocal signaling interactions“ (Liu, Ma et al. 2012). Beim „path of low resistance“ wird angenommen, dass die Tumorzellen entlang oder innerhalb der Nerven metastasieren, weil sie hier den wenigsten Widerstand erfahren, und in diesem Milieu schnell wachsen können (Liebig, Ayala et al. 2009). Aktuellere Studien sprechen hingegen für die Theorie der „reciprocal signaling interactions“. Dabei geht man davon aus, dass sich Nervenzellen, Karzinomzellen und andere gegenseitig durch auto- und parakrine Mechanismen stimulieren. So kommt es letztendlich sowohl zu axonalem Wachstum, als auch zur perineuralen Invasion (Liebig, Ayala et al. 2009, Liu, Ma et al. 2012, Demir, Boldis et al. 2014).

In diesem Zusammenhang haben neurotrophe Faktoren immer stärker das Interesse der Forschung geweckt. Diese sollen eine wichtige Rolle im Rahmen der perineuralen Invasion spielen, indem sie zwischen den Karzinomzellen und den Nerven interagieren. Einige Faktoren und ihre Rezeptoren konnten in erhöhtem Maße in intrapankreatischen Nerven und Karzinomzellen nachgewiesen werden (Zhu, Friess et al. 1999, Zhu, Kleeff et al. 2002, Ito, Okada et al. 2005, Ceyhan, Giese et al. 2006).

Exokrin					
Antikörper	duktale Zellen	azinäre Zellen	Endokrin	Nerven	Karzinom
GDNF	+	-	++	++	+
NTN	+	-	++	-	+
ARTN	+	-	++	++	+
PSP	+	-	++	-	+
RET	+	++	-	-	++
GFRα1	+	-	++	-	+
GFRα2	+	-	++	-	+

Tabelle 13 Expressionsprofil von Faktoren der glial cell line–derived neurotrophic factor Gruppe und ihren Rezeptoren nach (Ito, Okada et al. 2005)

ARTN, Artemin; GDNF, glial cell line–derived neurotrophic factor; GFR α 1, GDNF family receptor α -1; GFR α 2, GDNF family receptor α -2; NTN, Neurturin; PSP, Persephin. Die Intensität der Immunfärbung wurde wie folgt kategorisiert: – negativ; + schwach oder moderat; ++ stark

Mittlerweile sind nicht nur die in Tabelle 13 dargestellten Faktoren in pankreatischem Gewebe nachgewiesen worden, sondern es konnte sogar gezeigt werden, dass Faktoren wie GDNF und NTN die Invasivität von Karzinomzellen unterstützen (Okada, Takeyama et al. 1999).

Wie bereits erwähnt, spielt in der Pathophysiologie des Pankreaskarzinoms und der chronischen Pankreatitis die Desmoplasie eine wesentliche Rolle. Für diese Art des Gewebeumbaus werden vor allem die pankreatischen Sternzellen verantwortlich gemacht (Apte, Haber et al. 1998, Apte, Park et al. 2004, Apte, Yang et al. 2013, Lee, Xu et al. 2015). Obwohl bereits einiges über die Interaktion zwischen Tumorzellen und Nerven bekannt ist, wissen wir noch recht wenig über die Interaktion zwischen Sternzellen und Nerven (Demir, Friess et al. 2012). Dass auch Sternzellen eine Rolle in der Interaktion zwischen Nerven und Karzinomzellen spielen könnten, wird zum Beispiel daraus ersichtlich, dass eine enge Korrelation zwischen dem Grad der Desmoplasie und dem Ausmaß der neuralen Invasion besteht (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass Sternzellen, die aus Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis gewonnen wurden, *in vitro* das Wachstum von Neuriten aus DRGs oder aus Zellen des myenterischen Plexus deutlich fördern (Demir, Ceyhan et al. 2010). Für humane pankreatische Sternzellen aus Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis konnte auf mRNA Ebene auch gezeigt werden, dass sie auf eine Behandlung mit TGF- β hin mit einer erhöhten Expression des neurotrophen Faktors Artemin reagieren (Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Haas und Mitarbeiter fanden heraus, dass hPSC auf eine

Behandlung mit TGF- β hin über den ALK-5-Pathway auch vermehrt NGF produzieren (Haas, Fitzner et al. 2009).

Die neurotrophen Faktoren GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin sind in gewisser Weise mit der TGF- β Superfamilie verwandt (Cik, Masure et al. 2000). Von GDNF und Neurturin ist außerdem bekannt, dass sie die Invasivität von Karzinomzellen zu erhöhen scheinen (Okada, Takeyama et al. 1999).

Führt man sich all diese Beobachtungen vor Auge, liegt der Verdacht nahe, dass auch die Sternzellen dazu fähig sein könnten durch Expression von neurotrophen Faktoren und deren Rezeptoren mit den Nerven zu interagieren. Dies könnte bei der chronischen Pankreatitis das neurale Remodelling, und beim Pankreaskarzinom die perineurale Invasion und Zunahme der Neuritendichte mit vorantreiben.

10.2 Isolation der Sternzellen

Für diese Arbeit wurden pankreatische Sternzellen aus Ratten verwendet, da diese in hoher Reinheit durch die Nycodenz-Methode gewonnen werden können. Außerdem befinden sie sich nach Isolation noch in ihrem ruhenden Zustand, und werden erst durch die spätere Behandlung aktiviert.

Humane Gewebeproben aus Operationsresektaten sind meist sehr fibrotisch, aufgrund dessen sich hier nur die Möglichkeit der Isolation durch die Outgrowth-Methode ergibt. Dabei können allerdings keine ruhenden Sternzellen gewonnen werden.

10.3 Limitationen in den Untersuchungen

Die Pathophysiologie der chronischen Pankreatitis und des Pankreaskarzinoms ist ein äußerst vielschichtiger Prozess, der noch weiterer Aufklärung durch die Forschung bedarf. Mit Sicherheit lässt sich aber jetzt schon sagen, dass die Interaktion zwischen Nerven und Sternzellen eine Hauptkomponente der sich abspielenden Prozesse darstellt.

Die Limitationen in den vorliegenden Experimenten ergeben sich vor allem aus dem Umstand, dass Sternzellen in Kultur sehr schnell vom ruhenden Zustand in den aktivierten (Myofibroblasten-ähnlichen) Zustand übergehen. Um den Verlauf der Expression der Faktoren möglichst authentisch darzustellen, wurden die Zellen vor den

Versuchen nie passagiert, wie das teilweise in anderen Publikationen angegeben wird. Da die Ausbeute an Zellen, die durch die Nycodenz-Methode aus Ratten isoliert wurden, relativ niedrig ausfiel, waren sehr viele Versuchstiere notwendig, um eine ausreichende Menge an Zellen für die Versuche zu gewinnen.

Insgesamt herrscht in der Forschungsgemeinschaft allgemeiner Konsens darüber, dass Untersuchungen zur Aktivierung von Sternzellen durch viele weitere Faktoren beeinflusst sein können (zum Beispiel die Reinheit der Zellen, die Zusammensetzung der unterschiedlichen Kulturmedia, das Alter der Versuchstiere, oder die Art der Erkrankung, aus der ein Resektat gewonnen wurde). Es ist ebenso möglich, dass *in vitro* Versuche nicht die tatsächliche *in vivo* Situation genau genug simulieren können. Sternzellen sind *in vivo* von vielen anderen Zellen umgeben und werden darüber hinaus von einigen weiteren Botenstoffen reguliert (Erkan, Adler et al. 2012).

Zur differenzierten Betrachtung der Ergebnisse sollte man beachten, dass die neurotrophen Faktoren sich in ihrer Struktur und Funktion durchaus ähnlich sind und eine Aminosäuresequenz-Homologie von 40% haben (Baloh, Tansey et al. 1998, Milbrandt, de Sauvage et al. 1998). Gewisse Überschneidungspunkte findet man auch in der Interaktion mit den Rezeptoren. So hat zwar jeder neurotrophe Faktor eine spezielle Affinität zu einem bestimmten Rezeptor, kann aber auch an andere binden, und so Signale weitergeben (Baloh, Tansey et al. 1998, Airaksinen, Titievsky et al. 1999, Baloh, Enomoto et al. 2000, Sidorova, Matlik et al. 2010). Es ist sogar bekannt, dass auch ohne die Anwesenheit von RET Signale weitergegeben werden können (Airaksinen, Titievsky et al. 1999, Trupp, Scott et al. 1999). Für GFR α 4 ist bereits gezeigt worden, dass es, selbst ohne die Anwesenheit von Persephin, RET aktivieren und die nachfolgende Signalkaskade in Gang setzen kann (Yang, Runeberg-Roos et al. 2007).

Da die Forschung über die Funktion neurotropher Faktoren bei pankreatischen Erkrankungen noch relativ am Anfang steht, ist es alles in allem kompliziert zu benennen, welche genaue Funktion welcher Faktor hier innehat. Bis auf Persephin und GFR α 4 kann man aber davon ausgehen, dass sie eine wesentliche Rolle in der gegenseitigen Stimulation von Nerven-, Karzinom- und Sternzellen spielen.

10.4 Charakterisierung der pankreatischen Sternzellen

Zunächst wurden die isolierten Zellen auf α -SMA, GFAP und Vimentin hin untersucht. Charakteristisch für Sternzellen ist eine Zunahme der Expression von α -SMA und eine Abnahme der Expression von GFAP im Verlauf ihrer Aktivierung. Vimentin wird hingegen durchgehend exprimiert (Apte, Haber et al. 1998, Bachem, Schneider et al. 1998, Zha, Li et al. 2014).

10.5 Stimulation der Zellen

TGF- β kann Zellen unter anderem im Hinblick auf Wachstum, Differenzierung und Produktion extrazellulärer Matrix beeinflussen (Heldin, Miyazono et al. 1997, Lee, Xu et al. 2015). Bei pankreatischen Sternzellen führt dieses Zytokin zur Aktivierung und Umwandlung in Myofibroblasten-ähnliche Zellen (Omary, Lugea et al. 2007, Apte, Pirola et al. 2012).

Nachdem TGF- β an den TGF- β -Rezeptor bindet, werden Smad 2 und 3 phosphoryliert und gelangen in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren (Nakao, Imamura et al. 1997). Es ist bereits untersucht worden, dass hPSC und rPSC aus Primärkultur gleichermaßen auf TGF- β reagieren (Haas, Fitzner et al. 2009). Als zusätzlichen Nachweis dafür, dass pankreatische Sternzellen, die durch die Gradienten-Methode isoliert wurden, gleich gut auf TGF- β reagieren, wie Zellen, die durch die Outgrowth-Methode gewonnen wurden, wurden Smad 2 und 3, sowie die phosphorylierte Form von Smad 2 mittels Western Blot untersucht. Hier zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg der Menge an p-Smad 2 nach Behandlung mit TGF- β .

Um zu zeigen, dass TGF- β die Sternzellen zusätzlich zur immer vorhandenen Aktivierung durch die Kultivierung stimuliert, untersuchten wir die Expression von α -SMA bei Kontrollzellen und stimulierten Zellen. Nach Behandlung mit TGF- β zeigte sich hier ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies zeigt, dass durch die Stimulation mit TGF- β die Zellen stark aktiviert werden. Dieser Test wird mittlerweile als Positivkontrolle für die Aktivierung von pankreatischen Sternzellen herangenommen (Lee, Xu et al. 2015).

Neben der schon in der Literatur beschriebenen Stimulation durch TGF- β wurde noch die Stimulation der PSC durch Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen gewählt.

Hypoxie stellt ein wichtiges Merkmal pankreatischer Erkrankungen dar. Pathophysiologisch kommt es dabei durch überschießende Fibrosierung des Gewebes zu einer Hypovaskularisation und damit einhergehenden Hypoxie des Gewebes (Erkan, Reiser-Erkan et al. 2009, Buscail, Bournet et al. 2015).

Dem Signalmolekül HIF-1- α (hypoxia inducible factor) wird bei hypoxischen Zuständen eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort zuteil (Palazon, Goldrath et al. 2014). Dieses Molekül besteht aus einer α und einer β -Untereinheit. Während die β -Untereinheit kontinuierlich exprimiert wird, unterliegt die α -Untereinheit einer Regulation, die sich vor allem nach dem Sauerstoffgehalt richtet (Wang, Huang et al. 2013). Bei hepatischen Sternzellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Hypoxie die Sternzellen zur Aktivierung anregt. Es wird angenommen, dass dies ebenfalls über die TGF- β und Smad Kaskade erfolgt (Shi, Fong et al. 2007).

Um den Effekt der Hypoxie auf die Zellen nachweisen zu können, wurde HIF-1- α mit Hilfe von qRT-PCR nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1- α im Verlauf der hypoxischen Inkubation immer stärker von den Sternzellen exprimiert wird, wodurch sich die Wirksamkeit dieser Stimulationsmethode bestätigte.

10.6 Expression neurotropher Faktoren

Welche neurotrophen Faktoren und Rezeptoren können von Sternzellen exprimiert werden?

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass pankreatische Sternzellen generell in der Lage sind die bekannten neurotrophen Faktoren (NGF, GDNF, NTN, ART, PSP) und deren entsprechende Rezeptoren (GFR α 1-4) zu exprimieren.

Dabei ließ sich vor allem für GDNF, Neurturin und Artemin eine Korrelation zwischen ihrem Aktivitätsstadium und der Expression dieser Faktoren feststellen.

Bei den anderen Faktoren und Rezeptoren konnte zwar gezeigt werden, dass sie ebenfalls von Sternzellen exprimiert werden, eine Regulation im Rahmen der Aktivierung war hingegen nicht nachweisbar.

In welchem Maße ändert sich das Expressionsprofil der neurotrophen Faktoren und ihrer Rezeptoren bei Stimulation?

10.6.1 NGF

NGF wurde bereits von Haas et al. bei rPSC, die aus Primärkultur stammten, mittels semiquantitativer PCR bestimmt (Haas, Fitzner et al. 2009). Hier wurde gezeigt, dass NGF auf mRNA Ebene im Zeitverlauf bis zu 7 Tagen zunimmt. Auch eine Stimulation der Sternzellen mit TGF- β zeigte hier eine Zunahme der Expression des NGF. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Publikation von Haas et al. konnten in der vorliegenden Arbeit aber mittels qRT-PCR nur sehr geringe Werte für NGF nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich keine relevante Zunahme der Expression im Verlauf. Für einen aussagekräftigen Nachweis mit Western Blot reichten die Proteinmengen von NGF nicht aus, sodass es nach unseren Ergebnissen zu keiner Hochregulation von NGF nach Stimulation von Sternzellen kommt.

10.6.2 GDNF und GFR α 1

Für GDNF konnte nach Stimulation ein tendenzieller Anstieg der Expression verzeichnet werden. Dieses Ergebnis ist vor allem im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom von besonderer Relevanz. Hier konnte nämlich gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Expression von GDNF und perineuraler Invasion von Karzinomzellen besteht. Es kann davon ausgegangen werden, dass GDNF Karzinomzellen chemotaktisch anzieht (Ito, Okada et al. 2005). Bisher wurde hier aber nur die Interaktion zwischen Nerven und Karzinomzellen via GDNF direkt untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Sekretion von GDNF ein wesentlicher Faktor für die perineurale Invasion ist, und, dass durch Behandlung mit Pyrazolopyrimidin-1 (Tyrosinkinase-Inhibitor) oder auch durch Blockade der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade die neurale Invasion eingedämmt werden kann (Veit, Genze et al. 2004, Gil, Cavel et al. 2010).

GFR α 1 konnte ebenfalls bei den rPSC nachgewiesen werden. Die Stimulation hatte hier allerdings keinen Einfluss auf die Regulation der Expression. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass dieser Rezeptor wahrscheinlich kontinuierlich von den Sternzellen exprimiert wird.

Durch die Entdeckung, dass Sternzellen sowohl GDNF, als auch GFR α 1 exprimieren, ergeben sich folgende neue Hypothesen für die Pathophysiologie pankreatischer Erkrankungen:

1. Es besteht die Möglichkeit, dass eine Signalübermittlung zwischen Nerven und rPSC existiert. Beide Zelltypen sind in der Lage GDNF und GFR α 1 zu bilden und könnten sich auf diese Weise sowohl autokrin, als auch parakrin stimulieren. Diese gegenseitige Stimulation ist eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Neuritendichte bei CP und PCA und die gleichzeitig stattfindende desmoplastische Reaktion, aus der bei beiden Krankheitsentitäten die Fibrose resultiert.
2. Wie bereits unter anderem von He et al. gezeigt werden konnte, sind GFR α 1 in Verbindung mit GDNF bedeutende Faktoren für die chemotaktische Migration von Karzinomzellen (He, Chen et al. 2014). Wahrscheinlich tragen Sternzellen demnach durch Expression beider Faktoren zur Migration und letztendlich zur perineuralen Invasion von Karzinomzellen bei.

10.6.3 Neurturin und GFR α 2

Wie bereits bekannt, wird dem neurotrophen Faktoren Neurturin und seinem korrespondierenden Rezeptor GFR α 2 eine große Bedeutung in den pathophysiologischen Vorgängen pankreatischer Erkrankungen beigemessen. Neurturin wird wie die restlichen neurotrophen Faktoren zunächst als prä-pro-Peptid gebildet. Durch Abspaltungsprozesse und nachfolgende Bildung von Multimeren evolviert es zur biologisch aktiven multimeren Form (Kotzbauer, Lampe et al. 1996, Airaksinen and Saarma 2002). Der exakte Vorgang ist jedoch noch nicht abschließend erforscht. In Untersuchungen an Gewebe mit chronischer Pankreatitis fand man heraus, dass sowohl Neurturin, als auch GFR α 2 vor allem in intrapancreatischen Nerven in großer Menge vorhanden sind. Man geht davon aus, dass aufgrund der entstehenden Nervenläsionen im Rahmen der chronischen Pankreatitis von den Nervenzellen selbst vermehrt neurotrophe Faktoren gebildet werden. Vom Perikaryon der DRGs ausgehend gelangen diese über axonale Transportmechanismen retrograd in das Pankreas, um dort Reparaturmechanismen in Gang zu setzen (Leitner, Molliver et al. 1999, Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Zudem stellte man hier für Neurturin eine Verlagerung hin zur Formation von Multimeren fest (Demir, Wang et al. 2012). Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei der Untersuchung von

Pankreaskarzinomgewebe replizieren. Dabei bilden vor allem die Karzinomzellen selbst beiderlei Signalpeptid und Rezeptor aus (Wang, Demir et al. 2014).

Bei den proteinchemischen Untersuchungen von Neurturin wird nicht nur eine einzelne Bande im Western Blot detektierbar, sondern ein ganzes Bandenmuster. Zur Interpretation des Bandenmusters dienen die Publikationen (Demir, Wang et al. 2012) und (Wang, Demir et al. 2014) als Grundlage für die vorliegende Arbeit. Es zeigte sich, dass sich die Proteingrößen in manchen Abschnitten etwas unterscheiden. Dieser Umstand könnte daran liegen, dass im Gegensatz zu den hier besprochenen Versuchen die Experimente in den beiden angegebenen Publikationen an humanem Gewebe durchgeführt wurden.

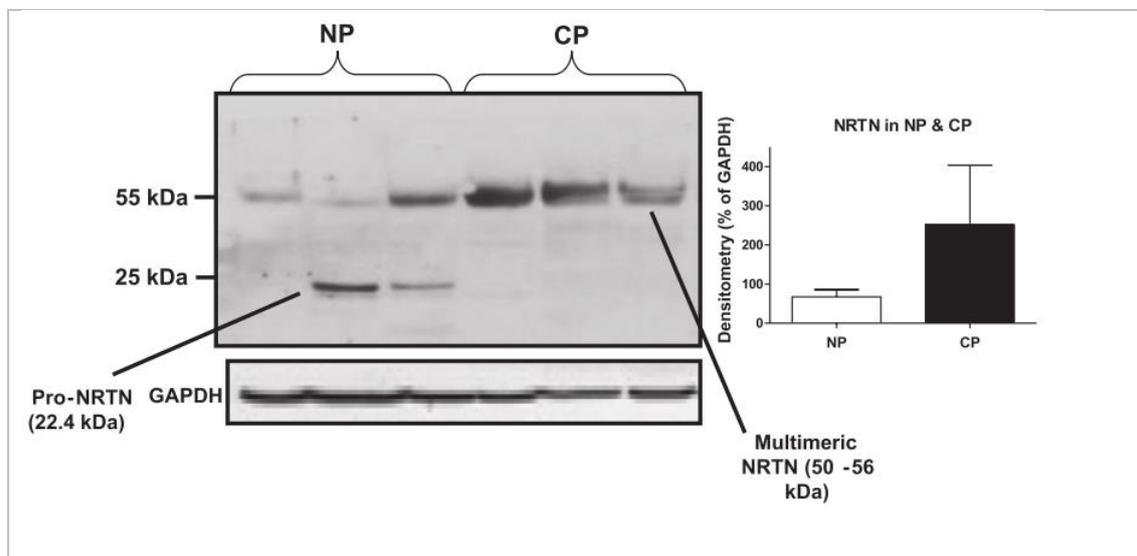


Abbildung 33 aus (Demir, Wang et al. 2012)

In gesundem Pankreasgewebe (NP) konnte eine Bande < 25 kDa und eine zweite im Bereich von 55 kDa nachgewiesen werden. Die Bande mit einer Proteingröße < 25 kDa repräsentiert eine humane monomere pro-Form, während die Bande bei 55 kDa eine tetramere Form des Neurturins darstellt. Bei Gewebeproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis konnte vermehrt die 55 kDa Bande (oft auch als Doppelbande) nachgewiesen werden, wohingegen die monomere pro-Form nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Zunahme der tetrameren Form des Neurturins bei chronischer Pankreatitis bezeichnet einen deutlichen Trend hin zu biologisch aktiven Isoformen im betroffenen Gewebe (Demir, Wang et al. 2012). Des Weiteren sind eine multimerere pro-Neurturininform mit einer Proteingröße von 40-46 kDa und eine dimere Form mit 25-28 kDa beschrieben. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei der chronischen

Pankreatitis zeigt sich ebenso bei Karzinomgewebe eine deutliche Tendenz hin zu den biologisch aktiven Formen (vergleiche Abbildung 34).

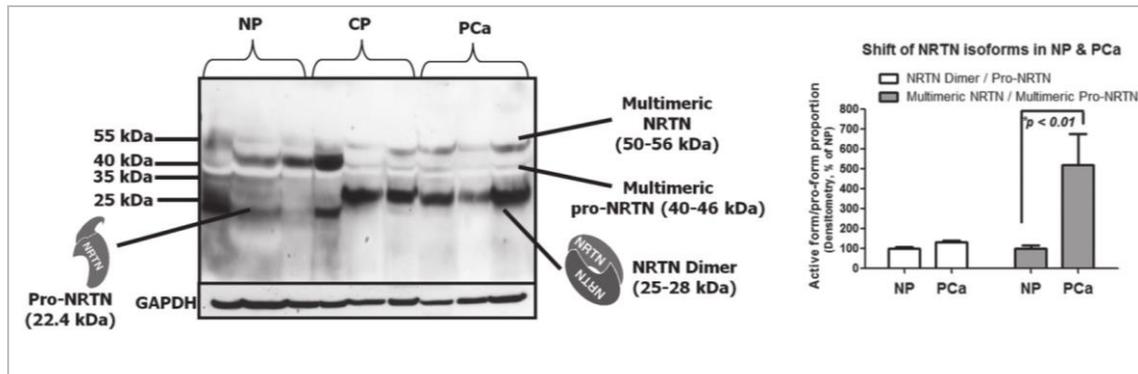


Abbildung 34 aus (Wang, Demir et al. 2014)

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der oben besprochenen Publikationen erkennt man auch in den vorliegenden Untersuchungen ein ähnliches Profil. So fällt zunächst ins Auge, dass es bei stimulierten rPSC zu einem vermehrten Vorkommen der biologisch aktiven Form kommt. Einzig die dimere pro-Form des Proteins bei circa 40 kDa zeigt wenig Dynamik, während die 37 kDa-Bande, die monomere pro-Form bei 20 kDa und die monomere Isoform bei 17 kDa einen deutlichen Rückgang verzeichnen. Eine dimere Form bei circa 25 kDa, wie sie für humanes Gewebe vorbeschrieben ist, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Insgesamt kann bei stimulierten rPSC eine Verlagerung zu Gunsten der biologisch aktiven Formen registriert werden.

Die Expression von GFR α 2 ließ sich durch die Stimulation kaum beeinflussen.

10.6.4 Artemin und GFR α 3

Für Artemin konnte eine Zunahme der Expression durch die Stimulation erreicht werden, während die Expression von GFR α 3 nicht beeinflusst wurde.

Bereits 2007 wurde von Ceyhan et al. gezeigt, dass Artemin eine deutlich höhere Expression im entzündetem Pankreasgewebe aufweist (Score I-III), als das im nicht-entzündetem Gewebe (Score 0) der Fall ist. Für GFR α 3 konnten diese Unterschiede hingegen nicht festgestellt werden (Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Außerdem konnte auf mRNA-Ebene eine positive Korrelation zwischen der Expression von Artemin und des Schweregrades der PNI festgestellt werden (Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Insbesondere Artemin, und teilweise auch GFR α 3 haben außerdem einen Einfluss auf die

Dichte und den Durchmesser der Nerven, sowie auf das Schmerzempfinden. Auch bei fibrotischem Gewebe ergaben sich für Artemin höhere Werte im Vergleich zu normalem Gewebe, während die Werte für GFR α 3 gleichblieben. Bereits zu diesem Zeitpunkt vermutete man, dass Sternzellen, neben den Nerven selbst, dazu in der Lage sind Artemin und GFR α 3 zu produzieren. Um dies zu untersuchen, wurden humane Sternzellen mit der Outgrowth-Methode isoliert und anschließend mit TGF- β weiter stimuliert. Das Resultat war ähnlich zu den vorliegenden Versuchen mit rPSC – ein Anstieg der Transkription des Artemins (Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Beim Pankreaskarzinom scheint Artemin zwar keinen direkten Einfluss auf die Proliferation der Karzinomzellen auszuüben, aber es erhöht deutlich deren Invasivität (Ceyhan, Giese et al. 2006, Gao, Bo et al. 2015).

Im Gegensatz dazu gibt es auch Untersuchungen die zeigen, dass Artemin dem neuropathischen Schmerz entgegenwirkt, und zur Nervenheilung beitragen soll (Gardell, Wang et al. 2003).

Über den genaueren Pathomechanismus ist folgende Hypothese denkbar: Zunächst wird Artemin im Rahmen des physiologischen Heilungsvorgangs von entzündeten Nerven sezerniert. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es dann durch die Aktivierung der Sternzellen zu einer zusätzlichen weiteren Sekretion dieses Faktors. Nervenzellen und Sternzellen könnten so einen positiven Feed-Back-Mechanismus aufbauen, da auch beide Zellarten den Rezeptor GFR α 3 exprimieren. Die stetige Sekretion von Artemin regt nun das Nervenwachstum an, wodurch die Neuritendichte und der Nervendurchmesser zunehmen. Außerdem erhöht es die Invasivität der Karzinomzellen und wahrscheinlich stimuliert es auch die Sternzellen, wodurch es unter anderem zur Fibrosebildung kommt.

10.6.5 Persephin und GFR α 4

Persephin konnte in den vorliegenden Untersuchungen nur in sehr geringer Menge mittels qRT-PCR überhaupt nachgewiesen werden. Eine genaue Aussage über das Expressionsprofil lässt sich hier nicht treffen. Diese auf den ersten Blick etwas ernüchternde Erkenntnis deckt sich jedoch mit anderen Darstellungen aus der Literatur. Schon bei der Erstbeschreibung des Faktors 1998 wird angegeben, dass PSP zwar in allen untersuchten Geweben nachweisbar war, jedoch stets nur in sehr knapper Menge (Milbrandt, de Sauvage et al. 1998). Erwartungsgemäß könnte sich daraus schlussfolgern lassen, dass PSP in diesem Falle nur eine untergeordnete Rolle in der zellulären Interaktion im Pankreas spielt. Denn obwohl PSP einige Eigenschaften mit GDNF und

NTN gemeinsam hat, gibt es bislang keinen Hinweis auf einen Einfluss auf periphere Nerven, einschließlich enterischer Ganglien (Milbrandt, de Sauvage et al. 1998).

10.7 Ausblick

Welche Relevanz haben die Ergebnisse dieser Untersuchung?

In den vergangenen Jahren mehrten sich die Hinweise darauf, dass neurotrophe Faktoren im Zusammenhang mit pankreatischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Im Fokus der Untersuchungen stand hier vor allem die Interaktion zwischen Nervenzellen und Karzinomzellen (Liu, Ma et al. 2012). Dass auch Sternzellen, dazu in der Lage sind neurotrophe Faktoren zu bilden wurde hingegen bisher weniger eingehend untersucht (Ceyhan, Bergmann et al. 2007).

Der Nachweis, dass Sternzellen eine weitere Quelle dieser Signalmoleküle sind, prädestiniert sie einmal mehr als Ziel neuer Therapiemaßnahmen. So könnte man nicht nur die desmoplastische Reaktion eindämmen, sondern auch die perineurale Invasion eingrenzen, beziehungsweise verlangsamen. Damit hätte man ein neues Mittel gegen zwei wesentliche Elemente pankreatischer Erkrankungen zur Verfügung. Denkbar wäre so zum Beispiel eine direkte Induktion der Apoptose der Zellen, eine Inhibition oder Umkehrung ihrer Aktivierung (McCarroll, Phillips et al. 2006), Antikörper gegen neurotrophe Faktoren, oder auch ein Eingreifen in die weitere Signalkaskade (Liu, Ma et al. 2012). Sherman und Mitarbeiter konnten demonstrieren, dass die Behandlung von Sternzellen mit Calcipotriol zu einer Abnahme ihres Aktivierungsgrades führte (Sherman, Yu et al. 2014). Auf dieser Grundlage wurden als Ausblick für weitere Experimente Einzelversuche unternommen, um eine mögliche Veränderung des Expressionsprofils der neurotrophen Faktoren zu sehen. Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass die Marker der Aktivierung (α -SMA und Vimentin) weniger stark exprimiert wurden. Auch Armin und GFR α 2 nahmen an Intensität ab. Für Neurturin zeigte sich ein Wechsel der aktiven tetrameren Isoform (55 kD) hin zur monomeren pro-Form (22 kD). Inwiefern sich eine Behandlung mit Calcipotriol auf die Pathophysiologie auswirken kann, gilt es nun in zukünftigen Versuchsansätzen zu klären.

Für das genauere Verständnis der Interaktion der Stern-, Karzinom- und Nervenzellen wäre es vor allem wichtig herauszufinden, ob Sternzellen auch durch die neurotrophen Faktoren direkt stimuliert werden. Hierzu wäre eine ähnliche Versuchsanordnung wie bei

der Stimulation mit TGF- β denkbar. Was wäre das Resultat einer Ausschaltung der Expression neurotropher Faktoren und Rezeptoren in Karzinomzellen und Sternzellen zum Beispiel durch siRNA? Möglicherweise könnte man hierdurch zeigen, dass so das Wachstum und die Invasivität gehemmt werden.

11. Zusammenfassung

Im Laufe der letzten Jahre haben sich in der Erforschung der beiden Krankheitsentitäten Pankreaskarzinom und chronische Pankreatitis zwei Bereiche besonders etabliert: Pankreatische Sternzellen und neurotrophe Faktoren. PSCs führen bei beiden Pathologien vor allem zu einem desmoplastischen Umbau des Gewebes (Apte, Yang et al. 2013). Neurotrophe Faktoren spielen hingegen eine wesentliche Rolle bei der perineuralen Invasion der Karzinomzellen, und führen sowohl bei der CP, als auch beim PCA zu einer Zunahme der Dichte und des Durchmessers der Nerven, und letztlich zu neuropathischen Schmerzen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009, Liu, Ma et al. 2012, Gao, Bo et al. 2015). Hauptsächlich durch die Erkenntnis der engen Korrelation zwischen PNI und fibrotischem Umbau des Gewebes, hat sich im Laufe der Zeit die Interaktion der Karzinomzellen mit Nerven und Sternzellen als eine wichtige Schlüsselposition der Pathophysiologie herauskristallisiert (Demir, Friess et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass pankreatische Sternzellen, die aus Ratten isoliert wurden, in der Lage sind neurotrophe Faktoren der GDNF-Familie zu bilden. Dazu wurden die ruhenden PSCs zunächst durch Behandlung mit TGF- β oder Hypoxie stimuliert, und anschließend ihr Expressionsprofil neurotropher Faktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf RNA-Ebene und Proteinebene bestimmt. Hier zeigte sich, dass aktivierte PSCs tendenziell vermehrt GDNF, Neurturin und Artemin produzieren. Der neurotrophe Faktor Persephin ließ sich nur in geringer Menge nachweisen, und zeigte auf Stimulation hin keinen signifikanten Anstieg der Expression. Neben den neurotrophen Faktoren an sich sind die PSCs auch in der Lage ihre spezifischen Rezeptoren (GFR α 1-4) zu exprimieren.

Anhand dieser neuen Erkenntnisse lassen sich mögliche Rückschlüsse auf die pathophysiologischen Grundlagen pankreatischer Erkrankungen ziehen. Aktivierte PSCs sezernieren neurotrophe Faktoren, die auto- und parakrin verstärkt PSCs weiter aktivieren könnten, und so das Einwachsen von Nerven ins Gewebe vorantreiben, und die Invasivität der Karzinomzellen fördern. Die Inhibition neurotropher Faktoren, oder auch das Targeting der PCSs selbst könnte neue Therapieansätze in der Behandlung neuropathischer Schmerzen darstellen, und möglicherweise sogar letztendlich die Behandlungschancen verbessern.

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Güralp O. Ceyhan für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Betreuung und die konstruktive Zusammenarbeit. Ich bedanke mich außerdem sehr herzlich für die Ermöglichung meines Forschungsaustausches mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Phoebe Phillips von der University of New South Wales.

Ein großer Dank geht an meinen Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Steffen Teller, ohne den ich das Projekt in dieser Art und Weise wahrscheinlich nicht hätte bewerkstelligen können. Vielen Dank für Deine große Unterstützung und Deine aufbauenden Worte.

Ein Dank gilt auch Herrn PD Dr. med. Ekin Demir, der mich in das Projekt eingeführt hat, und mir wichtige Arbeitsmethoden nähergebracht hat.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei Herrn PD Dr. med. Daniel Hartmann, der immer ein offenes Ohr für jegliche Anliegen hatte.

Auch bei allen anderen Mitgliedern der AG Ceyhan bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme, die kollegiale Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis untereinander.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Lisa Dreizehnter bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat, und mir stets zur Seite stand.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinen beiden Geschwistern, die mich in allen Lebenslagen liebevoll unterstützen.

Allen anderen, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben ein herzliches Dankeschön!

Literaturverzeichnis

- Adamek, H. E., J. Albert, H. Breer, M. Weitz, D. Schilling and J. F. Riemann "Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study." The Lancet **356**(9225): 190-193.
- Airaksinen, M. S. and M. Saarma (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." Nat Rev Neurosci **3**(5): 383-394.
- Airaksinen, M. S., A. Titievsky and M. Saarma (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" Mol Cell Neurosci **13**(5): 313-325.
- Amin, S., A. L. Lucas and H. Frucht (2013). "Evidence for treatment and survival disparities by age in pancreatic adenocarcinoma: a population-based analysis." Pancreas **42**(2): 249-253.
- Andres, R., A. Forgie, S. Wyatt, Q. Chen, F. J. de Sauvage and A. M. Davies (2001). "Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth." Development **128**(19): 3685-3695.
- Aoki, H., H. Ohnishi, K. Hama, S. Shinozaki, H. Kita, H. Osawa, H. Yamamoto, K. Sato, K. Tamada and K. Sugano (2007). "Cyclooxygenase-2 is required for activated pancreatic stellate cells to respond to proinflammatory cytokines." American Journal of Physiology-Cell Physiology **292**(1): C259-C268.
- Apte, M., R. Pirola and J. Wilson (2012). "Pancreatic Stellate Cells : A Starring Role in Normal and Diseased Pancreas." Frontiers in Physiology **3**.
- Apte, M. V., P. S. Haber, T. L. Applegate, I. D. Norton, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola and J. S. Wilson (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut **43**(1): 128-133.
- Apte, M. V., P. S. Haber, S. J. Darby, S. C. Rodgers, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola and J. S. Wilson (1999). "Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis." Gut **44**(4): 534-541.
- 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.
- Apte, M. V., P. A. Phillips, R. G. Fahmy, S. J. Darby, S. C. Rodgers, G. W. McCaughan, M. A. Korsten, R. C. Pirola, D. Naidoo and J. S. Wilson (2000). "Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells." Gastroenterology **118**(4): 780-794.

- Apte, M. V., R. C. Pirola and J. S. Wilson (2006). "Battle-scarred pancreas: role of alcohol and pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis." J Gastroenterol Hepatol **21 Suppl 3**: S97-s101.
- Apte, M. V., L. Yang, P. A. Phillips, Z. Xu, W. Kaplan, M. Cowley, R. C. Pirola and J. S. Wilson (2013). "Extracellular matrix composition significantly influences pancreatic stellate cell gene expression pattern: role of transgelin in PSC function." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **305**(6): G408-417.
- Arata, S., T. Takada, K. Hirata, M. Yoshida, T. Mayumi, M. Hirota, M. Yokoe, M. Hirota, S. Kiriyama, M. Sekimoto, H. Amano, K. Wada, Y. Kimura, T. Gabata, K. Takeda, K. Kataoka, T. Ito and M. Tanaka (2010). "Post-ERCP pancreatitis." Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences **17**(1): 70-78.
- Association, A. D. (2011). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **34 Suppl 1**: S62-69.
- Baba, T., Y. Sakamoto, A. Kasamatsu, Y. Minakawa, S. Yokota, M. Higo, H. Yokoe, K. Ogawara, M. Shiiba, H. Tanzawa and K. Uzawa (2013). "Persephin: A potential key component in human oral cancer progression through the RET receptor tyrosine kinase-mitogen-activated protein kinase signaling pathway." Mol Carcinog.
- Bachem, M., S. Zhou, K. Buck, W. Schneiderhan and M. Siech (2008). "Pancreatic stellate cells—role in pancreas cancer." Langenbeck's Archives of Surgery **393**(6): 891-900.
- Bachem, M. G., E. Schneider, H. Gross, H. Weidenbach, R. M. Schmid, A. Menke, M. Siech, H. Beger, A. Grunert and G. Adler (1998). "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." Gastroenterology **115**(2): 421-432.
- Ballehaninna, U. K. and R. S. Chamberlain (2012). "The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal." J Gastrointest Oncol **3**(2): 105-119.
- Baloh, R. H., H. Enomoto, E. M. Johnson, Jr. and J. Milbrandt (2000). "The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development." Curr Opin Neurobiol **10**(1): 103-110.
- Baloh, R. H., M. G. Tansey, P. A. Lampe, T. J. Fahrner, H. Enomoto, K. S. Simburger, M. L. Leitner, T. Araki, E. M. Johnson, Jr. and J. Milbrandt (1998). "Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex." Neuron **21**(6): 1291-1302.
- Banks, P. A. and M. L. Freeman (2006). "Practice guidelines in acute pancreatitis." Am J Gastroenterol **101**(10): 2379-2400.
- Bergmann, F. (2013). Pathogenese der Autoimmunpankreatitis. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 157-161.
- Bernards, N., G. J. Creemers, C. J. Huysentruyt, I. H. de Hingh, G. P. van der Schelling, A. P. de Bruine and V. E. Lemmens (2015). "The relevance of pathological verification in suspected pancreatic cancer." Cancer Epidemiol.

- Birklein, F. (2002). "Neuropathische Schmerzen - Mechanismen und Therapie." Fortschr Neurol Psychiatr **70**(02): 88-94.
- Bond-Smith, G., N. Banga, T. M. Hammond and C. J. Imber (2012). "Pancreatic adenocarcinoma." BMJ **344**: e2476.
- Bornhöft, G. (2013). Pathologie Kompakt. Berlin Heidelberg, Springer
- Buchler, P., H. A. Reber, M. C. Buchler, M. A. Roth, M. W. Buchler, H. Friess, W. H. Isacoff and O. J. Hines (2001). "Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody (herceptin)." J Gastrointest Surg **5**(2): 139-146.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Modiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens and D. D. Von Hoff (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-2413.
- Buscail, L., B. Bournet, M. Dufresne, J. Torrisani and P. Cordelier (2015). "[Advance in the biology of pancreatic of cancer]." Bull Cancer **102**(6 Suppl 1): S53-61.
- Catalano, M. F., A. Sahai, M. Levy, J. Romagnuolo, M. Wiersema, W. Brugge, M. Freeman, K. Yamao, M. Canto and L. V. Hernandez (2009). "EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification." Gastrointest Endosc **69**(7): 1251-1261.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadıhasanoglu, 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., F. Bergmann, M. Kadıhasanoglu, M. Erkan, W. Park, U. Hinz, T. Giese, M. W. Muller, M. W. Buchler, N. A. Giese and H. Friess (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." Gut **56**(4): 534-544.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, B. Altintas, U. Rauch, G. Thiel, M. W. Müller, N. A. Giese, H. Friess and K.-H. Schäfer (2008). "Neural invasion in pancreatic cancer: A mutual tropism between neurons and cancer cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **374**(3): 442-447.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, U. Rauch, F. Bergmann, M. W. Müller, M. W. Büchler, H. Friess and K.-H. Schäfer (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. Wente, T. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2006). "The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion." Ann Surg **244**(2): 274-281.

- Ceyhan, G. O., K.-H. Schäfer, A. G. Kerscher, U. Rauch, I. E. Demir, M. Kadihasanoglu, C. Böhm, M. W. Müller, M. W. Büchler, N. A. Giese, M. Erkan and H. Friess (2010). "Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma." Ann Surg **251**(5): 923-931.
- Cik, M., S. Masure, A. S. Lesage, I. Van Der Linden, P. Van Gompel, M. N. Pangalos, R. D. Gordon and J. E. Leysen (2000). "Binding of GDNF and neurturin to human GDNF family receptor alpha 1 and 2. Influence of cRET and cooperative interactions." J Biol Chem **275**(36): 27505-27512.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J. B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot and M. Ducreux (2011). "FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer." N Engl J Med **364**(19): 1817-1825.
- D'Haese, J. G., M. Hartel, I. E. Demir, U. Hinz, F. Bergmann, M. W. Büchler, H. Friess and G. O. Ceyhan (2014). "Pain sensation in pancreatic diseases is not uniform: the different facets of pancreatic pain." World J Gastroenterol **20**(27): 9154-9161.
- Davis, B. J. (1964). "Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins." Ann. NY Acad. Sci **121**(2): 404-427.
- Demir, I. E., A. Boldis, P. L. Pfitzinger, S. Teller, E. Brunner, N. Klose, T. Kehl, M. Maak, M. Lesina and M. Laschinger (2014). "Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion." Journal of the National Cancer Institute **106**(8): dju184.
- Demir, I. E., G. O. Ceyhan, F. Liebl, J. G. D'Haese, M. Maak and H. Friess (2010). "Neural Invasion in Pancreatic Cancer: The Past, Present and Future." Cancers **2**(3): 1513-1527.
- Demir, I. E., G. O. Ceyhan, U. Rauch, B. Altintas, M. Klotz, M. W. Müller, M. W. Büchler, H. Friess and K. H. Schafer (2010). "The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity." Neurogastroenterol Motil **22**(4): 480-490, e112-483.
- Demir, I. E., H. Friess and G. O. Ceyhan (2012). "Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer." Front Physiol **3**: 97.
- Demir, I. E., K. Wang, E. Tieftrunk, N. A. Giese, B. Xing, H. Friess, T. Kehl and G. O. Ceyhan (2012). "Neuronal plasticity in chronic pancreatitis is mediated via the neurturin/GFR α 2 axis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **303**(9): G1017-1028.
- DiMagno, E. P., V. L. Go and W. H. Summerskill (1973). "Relations between pancreatic enzyme outputs and malabsorption in severe pancreatic insufficiency." N Engl J Med **288**(16): 813-815.
- Doi, R., M. Imamura, R. Hosotani, T. Imaizumi, T. Hatori, K. Takasaki, A. Funakoshi, H. Wakasugi, T. Asano, S. Hishinuma, Y. Ogata, M. Sunamura, K. Yamaguchi, M. Tanaka, S. Takao, T. Aikou, K. Hirata, H. Maguchi, K. Aiura, T. Aoki, A. Kakita, M. Sasaki, M. Ozaki, S. Matsusue, S. Higashide, H. Noda, S. Ikeda, S. Maetani and S. Yoshida (2008). "Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive

pancreatic cancer: Final results of a randomized multi-institutional trial." Surgery Today **38**(11): 1021-1028.

Duffy, M. J., C. Sturgeon, R. Lamerz, C. Haglund, V. L. Holubec, R. Klapdor, A. Nicolini, O. Topolcan and V. Heinemann (2010). "Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report." Ann Oncol **21**(3): 441-447.

Durbec, P., C. V. Marcos-Gutierrez, C. Kilkenny, M. Grigoriou, K. Wartiovaara, P. Suvanto, D. Smith, B. Ponder, F. Costantini and M. Saarma (1996). "GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase." Nature **381**(6585): 789-793.

Erkan, M., G. Adler, M. V. Apte, M. G. Bachem, M. Buchholz, S. Detlefsen, I. Esposito, H. Friess, T. M. Gress, H. J. Habisch, R. F. Hwang, R. Jaster, J. Kleeff, G. Kloppel, C. Kordes, C. D. Logsdon, A. Masamune, C. W. Michalski, J. Oh, P. A. Phillips, M. Pinzani, C. Reiser-Erkan, H. Tsukamoto and J. Wilson (2012). "StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research." Gut **61**(2): 172-178.

Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski, S. Deucker, D. Sauliunaite, S. Streit, I. Esposito, H. Friess and J. Kleeff (2009). "Cancer-Stellate Cell Interactions Perpetuate the Hypoxia-Fibrosis Cycle in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." Neoplasia (New York, N.Y.) **11**(5): 497-508.

Erkan, M., C. Reiser-Erkan, C. W. Michalski and J. Kleeff (2010). "Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer." Exp Oncol **32**(3): 128-131.

Ferrone, C. R., G. Marchegiani, T. S. Hong, D. P. Ryan, V. Deshpande, E. I. McDonnell, F. Sabbatino, D. D. Santos, J. N. Allen, L. S. Blaszkowsky, J. W. Clark, J. E. Faris, L. Goyal, E. L. Kwak, J. E. Murphy, D. T. Ting, J. Y. Wo, A. X. Zhu, A. L. Warshaw, K. D. Lillemoe and C. Fernandez-del Castillo (2015). "Radiological and surgical implications of neoadjuvant treatment with FOLFIRINOX for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer." Ann Surg **261**(1): 12-17.

Fielder, G. C., T. W.-S. Yang, M. Razdan, Y. Li, J. Lu, J. K. Perry, P. E. Lobie and D.-X. Liu (2018). "The GDNF family: A role in cancer?" Neoplasia **20**(1): 99-117.

Friess, H., Y. Yamanaka, M. Büchler, H. G. Beger, D. A. Do, M. S. Kobrin and M. Korc (1994). "Increased expression of acidic and basic fibroblast growth factors in chronic pancreatitis." The American Journal of Pathology **144**(1): 117-128.

Friess, H., Z. W. Zhu, F. F. di Mola, C. Kulli, H. U. Graber, A. Andren-Sandberg, A. Zimmermann, M. Korc, M. Reinshagen and M. W. Büchler (1999). "Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis." Ann Surg **230**(5): 615-624.

Funahashi, H., Y. Okada, H. Sawai, H. Takahashi, Y. Matsuo, H. Takeyama and T. Manabe (2005). "The role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and integrins for invasion and metastasis in human pancreatic cancer cells." Journal of surgical oncology **91**(1): 77-83.

Funahashi, H., H. Takeyama, H. Sawai, A. Furuta, M. Sato, Y. Okada, T. Hayakawa, M. Tanaka and T. Manabe (2003). "Alteration of integrin expression by glial cell line-

derived neurotrophic factor (GDNF) in human pancreatic cancer cells." Pancreas **27**(2): 190-196.

Gao, L., H. Bo, Y. Wang, J. Zhang and M. Zhu (2015). "Neurotrophic Factor Artemin Promotes Invasiveness and Neurotrophic Function of Pancreatic Adenocarcinoma In Vivo and In Vitro." Pancreas **44**(1): 134-143.

Gardell, L. R., R. Wang, C. Ehrenfels, M. H. Ossipov, A. J. Rossomando, S. Miller, C. Buckley, A. K. Cai, A. Tse, S. F. Foley, B. Gong, L. Walus, P. Carmillo, D. Worley, C. Huang, T. Engber, B. Pepinsky, R. L. Cate, T. W. Vanderah, J. Lai, D. W. Sah and F. Porreca (2003). "Multiple actions of systemic artemin in experimental neuropathy." Nat Med **9**(11): 1383-1389.

Gastroenterology, W. P. o. t. B. S. o., A. o. S. o. G. Britain, Ireland, P. S. o. G. Britain, Ireland, A. o. U. G. S. o. G. Britain and Ireland (2005). "UK guidelines for the management of acute pancreatitis." Gut **54 Suppl 3**: iii1-9.

Ghaneh, P., E. Costello and J. P. Neoptolemos (2007). "Biology and management of pancreatic cancer." Gut **56**(8): 1134-1152.

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.

Gill, S. S., N. K. Patel, G. R. Hotton, K. O'Sullivan, R. McCarter, M. Bunnage, D. J. Brooks, C. N. Svendsen and P. Heywood (2003). "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease." Nat Med **9**(5): 589-595.

Gillen, S., T. Schuster, C. Meyer Zum Buschenfelde, H. Friess and J. Kleeff (2010). "Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages." PLoS Med **7**(4): e1000267.

Glanemann, M., M. Bahra and P. Neuhaus (2008). "Pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion." Der Chirurg **79**(12): 1107-1114.

Goonetilleke, K. S. and A. K. Siriwardena (2007). "Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer." Eur J Surg Oncol **33**(3): 266-270.

Haas, S. L., N. Albiin and M. Löhr (2013). Evidenz der Tumormarker und molekularen Diagnostik beim Pankreaskarzinom. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 351-353.

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

Haas, S. L. and M. Löhr (2013). Therapie der Autoimmunpankreatitis. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 172-175.

Hackert, T. and W. Hartwig (2013). Indikation zur Resektion beim Pankreaskarzinom – Wann ist eine Resektion vorteilhaft für den Patienten? Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 363-367.

Hart, P. A., T. Kamisawa, W. R. Brugge, J. B. Chung, E. L. Culver, L. Czako, L. Frulloni, V. L. Go, T. M. Gress, M. H. Kim, S. Kawa, K. T. Lee, M. M. Lerch, W. C. Liao, M. Lohr, K. Okazaki, J. K. Ryu, N. Schleinitz, K. Shimizu, T. Shimosegawa, R. Soetikno, G. Webster, D. Yadav, Y. Zen and S. T. Chari (2013). "Long-term outcomes of autoimmune pancreatitis: a multicentre, international analysis." Gut **62**(12): 1771-1776.

He, S., C. H. Chen, N. Chernichenko, S. He, R. L. Bakst, F. Barajas, S. Deborde, P. J. Allen, E. Vakiani, Z. Yu and R. J. Wong (2014). "GFRalpha1 released by nerves enhances cancer cell perineural invasion through GDNF-RET signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(19): E2008-2017.

Heinrich, S., B. Pestalozzi, M. Lesurtel, F. Berrevoet, S. Laurent, J. R. Delpero, J. L. Raoul, P. Bachellier, P. Dufour, M. Moehler, A. Weber, H. Lang, X. Rogiers and P. A. Clavien (2011). "Adjuvant gemcitabine versus NEOadjuvant gemcitabine/oxaliplatin plus adjuvant gemcitabine in resectable pancreatic cancer: a randomized multicenter phase III study (NEOPAC study)." BMC Cancer **11**: 346.

Heldin, C.-H., K. Miyazono and P. ten Dijke (1997). "TGF-[beta] signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature **390**(6659): 465-471.

Herold, G. (2012). Innere Medizin. Köln, Herold, G.

Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh and R. Griffith (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences." Biotechnology (N Y) **10**(4): 413-417.

Hoffmeister, A., J. Mayerle, C. Beglinger, M. W. Büchler, P. Bufler, K. Dathe, U. R. Fölsch, H. Friess, J. Izbicki, S. Kahl, E. Klar, J. Keller, W. T. Knoefel, P. Layer, M. Loehr, R. Meier, J. F. Riemann, M. Rünzi, R. M. Schmid, A. Schreyer, B. Tribl, J. Werner, H. Witt, J. Mössner and M. M. Lerch (2012). "S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)." Z Gastroenterol **50**(11): 1176-1224.

Hohenberger, W., T. Brunner and H. Golcher (2013). Ist Radiochemotherapie beim Pankreaskarzinom effektiv? Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 384-388.

Honma, Y., T. Araki, S. Gianino, A. Bruce, R. Heuckeroth, E. Johnson and J. Milbrandt (2002). "Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons." Neuron **35**(2): 267-282.

Hotz, H. G., H. A. Reber, B. Hotz, P. C. Sanghavi, T. Yu, T. Foitzik, H. J. Buhr and O. J. Hines (2001). "Angiogenesis inhibitor TNP-470 reduces human pancreatic cancer growth." Journal of Gastrointestinal Surgery **5**(2): 131-138.

Ikejiri, N. (1990). "The vitamin A-storing cells in the human and rat pancreas." Kurume Med J **37**(2): 67-81.

Ito, Y., Y. Okada, M. Sato, H. Sawai, H. Funahashi, T. Murase, T. Hayakawa and T. Manabe (2005). "Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family members and their receptors in pancreatic cancers." Surgery **138**(4): 788-794.

Itzkowitz, S. H. and Y. S. Kim (1986). "New carbohydrate tumor markers." Gastroenterology **90**(2): 491-494.

Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu and M. J. Thun (2009). "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): 225-249.

Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, E. Krieghoff-Hening, B. Kunz, A. Penzkofer, K. Treml, K. Wittenberg, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke and U. Wolf (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. Berlin, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). **9. Ausgabe:** 150.

Kausch, W. (1912). "Das Carcinom der Papilla Duodeni und seine radikale Entfernung." Beiträge zur klinischen Chirurgie **78**: 439-486.

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.

Klöppel, G. (2013). Führt die rezidivierende akute Pankreatitis zur chronischen Verlaufsform? Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 67-70.

Klöppel, G., S. Detlefsen and B. Feyerabend (2004). "Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern." Virchows Archiv **445**(1): 1-8.

Klöppel, G. and B. Maillet (1992). "The morphological basis for the evolution of acute pancreatitis into chronic pancreatitis." Virchows Archiv A **420**(1): 1-4.

Klöppel, G., B. Sipos, G. Zamboni, M. Kojima and T. Morohoshi (2007). "Autoimmune pancreatitis: histo- and immunopathological features." J Gastroenterol **42 Suppl 18**: 28-31.

Konstantinidis, I. T., A. L. Warshaw, J. N. Allen, L. S. Blaszkowsky, C. F. Castillo, V. Deshpande, T. S. Hong, E. L. Kwak, G. Y. Lauwers, D. P. Ryan, J. A. Wargo, K. D. Lillemoe and C. R. Ferrone (2013). "Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a "true" R0 resection?" Ann Surg **257**(4): 731-736.

Koong, A. C., V. K. Mehta, Q. T. Le, G. A. Fisher, D. J. Terris, J. M. Brown, A. J. Bastidas and M. Vierra (2000). "Pancreatic tumors show high levels of hypoxia." International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics **48**(4): 919-922.

- Koprowski, H., Z. Steplewski, K. Mitchell, M. Herlyn, D. Herlyn and P. Fuhrer (1979). "Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies." Somatic Cell Genetics **5**(6): 957-971.
- Kotzbauer, P. T., P. A. Lampe, R. O. Heuckeroth, J. P. Golden, D. J. Creedon, E. M. Johnson Jr and J. Milbrandt (1996). "Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor." Nature **384**(6608): 467-470.
- Krug, S. and T. M. Gress (2013). Klinik des duktales Pankreaskarzinoms. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 346-350.
- Krüger, M. (2004, 10.04.2011). "Protein-Gelelektrophorese." Biologie in Übersichten, from <http://www.biozeugs.de/downloads/Protein-Gelelektrophorese.pdf>.
- Kupffer, C. (1876). "Ueber Sternzellen der Leber." Archiv für mikroskopische Anatomie **12**(1): 353-358.
- Kupffer, C. v. (1899). "Ueber die sogenannten Sternzellen der Säugethierleber." Archiv für mikroskopische Anatomie **54**(2): 254-288.
- Kuruwilla, R., L. S. Zweifel, N. O. Glebova, B. E. Lonze, G. Valdez, H. Ye and D. D. Ginty (2004). "A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling." Cell **118**(2): 243-255.
- Lacher, D. A. and J. P. Hughes (2015). "Total, free, and complexed prostate-specific antigen levels among US men, 2007-2010." Clin Chim Acta.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Langer, P. and D. K. Bartsch (2013). Familiäres Pankreaskarzinom. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 340-345.
- Lee, A. T., Z. Xu, S. P. Pothula, M. B. Patel, R. C. Pirola, J. S. Wilson and M. V. Apte (2015). "Alcohol and Cigarette Smoke Components Activate Human Pancreatic Stellate Cells: Implications for the Progression of Chronic Pancreatitis." Alcohol Clin Exp Res **39**(11): 2123-2133.
- Lee, K. M., D. Cao, A. Itami, P. M. Pour, R. H. Hruban, A. Maitra and M. M. Ouellette (2007). "Class III beta-tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraepithelial neoplasia." Histopathology **51**(4): 539-546.
- Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng and B. L. Hempstead (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-1948.
- Leitner, M. L., D. C. Molliver, P. A. Osborne, R. Vejsada, J. P. Golden, P. A. Lampe, A. C. Kato, J. Milbrandt and E. M. Johnson, Jr. (1999). "Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific." J Neurosci **19**(21): 9322-9331.

- Levy, P., M. Barthelet, B. R. Mollard, M. Amouretti, A. M. Marion-Audibert and F. Dyard (2006). "Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications." Gastroenterol Clin Biol **30**(6-7): 838-844.
- Levy, P., E. Dominguez-Munoz, C. Imrie, M. Lohr and P. Maisonneuve (2014). "Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences." United European Gastroenterol J **2**(5): 345-354.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." Lancet **363**(9414): 1049-1057.
- Liao, W. C., K. L. Chien, Y. L. Lin, M. S. Wu, J. T. Lin, H. P. Wang and Y. K. Tu (2013). "Adjuvant treatments for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis." Lancet Oncol **14**(11): 1095-1103.
- Liebig, C., G. Ayala, J. Wilks, G. Verstovsek, H. Liu, N. Agarwal, D. H. Berger and D. Albo (2009). "Perineural Invasion Is an Independent Predictor of Outcome in Colorectal Cancer." Journal of Clinical Oncology **27**(31): 5131-5137.
- 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." Annals of Surgery **260**(5): 900-908.
- Lin, L. F., D. H. Doherty, J. D. Lile, S. Bektesh and F. Collins (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." Science **260**(5111): 1130-1132.
- Liu, B. and K. Y. Lu (2002). "Neural invasion in pancreatic carcinoma." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **1**(3): 469-476.
- Liu, H., X. Li, Q. Xu, S. Lv, J. Li and Q. Ma (2012). "Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in perineural invasion of pancreatic cancer." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1826**(1): 112-120.
- Liu, H., Q. Ma and J. Li (2011). "High glucose promotes cell proliferation and enhances GDNF and RET expression in pancreatic cancer cells." Molecular and cellular biochemistry **347**(1-2): 95-101.
- Liu, H., Q. Ma, Q. Xu, J. Lei, X. Li, Z. Wang and E. Wu (2012). "Therapeutic Potential of Perineural Invasion, Hypoxia and Desmoplasia in Pancreatic Cancer." Current pharmaceutical design **18**(17): 2395-2403.
- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg and L. Domellof (1993). "Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group." N Engl J Med **328**(20): 1433-1437.
- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. DiMagno, A. Andrén-Sandberg, L. Domellöf and V. Di Francesco

- (1994). "Prognosis of chronic pancreatitis: an international multicenter study. International Pancreatitis Study Group." Am J Gastroenterol **89**(9): 1467-1471.
- Luttenberger, T., A. Schmid-Kotsas, A. Menke, M. Siech, H. Beger, G. Adler, A. Grünert and M. G. Bachem (2000). "Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis." Laboratory investigation **80**(1): 47.
- Macarulla, T., T. Fernandez, M. E. Gallardo, O. Hernando, A. M. Lopez and M. Hidalgo (2017). "Adjuvant treatment for pancreatic ductal carcinoma." Clin Transl Oncol **19**(10): 1199-1204.
- Maisonneuve, P. and A. B. Lowenfels (2014). "Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies." Int J Epidemiol.
- Maisonneuve, P., A. B. Lowenfels, B. Müllhaupt, G. Cavallini, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andrén-Sandberg, L. Domellöf, L. Frulloni and R. W. Ammann (2005). "Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis." Gut **54**(4): 510-514.
- Makary, M. A., J. M. Winter, J. L. Cameron, K. A. Campbell, D. Chang, S. C. Cunningham, T. S. Riall and C. J. Yeo (2006). "Pancreaticoduodenectomy in the very elderly." J Gastrointest Surg **10**(3): 347-356.
- Malka, D., P. Hammel, A. Sauvanet, P. Rufat, D. O'Toole, P. Bardet, J. Belghiti, P. Bernades, P. Ruszniewski and P. Lévy (2000). "Risk factors for diabetes mellitus in chronic pancreatitis." Gastroenterology **119**(5): 1324-1332.
- Masamune, A., K. Kikuta, T. Watanabe, K. Satoh, M. Hirota and T. Shimosegawa (2008). "Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **295**(4): G709-G717.
- Masamune, A. and T. Shimosegawa (2009). "Signal transduction in pancreatic stellate cells." Journal of gastroenterology **44**(4): 249-260.
- McCarroll, J. A., P. A. Phillips, N. Santucci, R. C. Pirola, J. S. Wilson and M. V. Apte (2006). "Vitamin A inhibits pancreatic stellate cell activation: implications for treatment of pancreatic fibrosis." Gut **55**(1): 79-89.
- McCarroll, J. A., G. Sharbeen, J. Liu, J. Youkhana, D. Goldstein, N. McCarthy, L. F. Limbri, D. Dischl, G. O. Ceyhan, M. Erkan, A. L. Johns, A. V. Biankin, M. Kavallaris and P. A. Phillips (2014). "betaIII-Tubulin: A novel mediator of chemoresistance and metastases in pancreatic cancer." Oncotarget.
- Mews, P., P. Phillips, R. Fahmy, M. Korsten, R. Pirola, J. Wilson and M. Apte (2002). "Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis." Gut **50**(4): 535-541.
- Michl, P., S. Pauls and T. M. Gress (2006). "Evidence-based diagnosis and staging of pancreatic cancer." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **20**(2): 227-251.

- Mihaljevic, A. L. and H. Friess (2011). "Operatives Vorgehen bei zystischen Pankreastumoren: Radikale Resektion und organerhaltende Resektion." Viszeralmedizin **27**(3): 214-224.
- Milbrandt, J., F. J. de Sauvage, T. J. Fahrner, R. H. Baloh, M. L. Leitner, M. G. Tansey, P. A. Lampe, R. O. Heuckeroth, P. T. Kotzbauer, K. S. Simburger, J. P. Golden, J. A. Davies, R. Vejsada, A. C. Kato, M. Hynes, D. Sherman, M. Nishimura, L.-C. Wang, R. Vandlen, B. Moffat, R. D. Klein, K. Poulsen, C. Gray, A. Garces, C. E. Henderson, H. S. Phillips and E. M. Johnson Jr (1998). "Persephin, a Novel Neurotrophic Factor Related to GDNF and Neurturin." Neuron **20**(2): 245-253.
- Mohr, S. B., C. F. Garland, E. D. Gorham, W. B. Grant and F. C. Garland (2010). "Ultraviolet B irradiance and vitamin D status are inversely associated with incidence rates of pancreatic cancer worldwide." Pancreas **39**(5): 669-674.
- Mullady, D. K., D. Yadav, S. T. Amann, M. R. O'Connell, M. M. Barmada, G. H. Elta, J. M. Scheiman, E.-J. Wamsteker, W. D. Chey, M. L. Korneffel, B. M. Weinman, A. Slivka, S. Sherman, R. H. Hawes, R. E. Brand, F. R. Burton, M. D. Lewis, T. B. Gardner, A. Gelrud, J. DiSario, J. Baillie, P. A. Banks, D. C. Whitcomb, M. A. Anderson and N. Consortium (2011). "Type of pain, pain-associated complications, quality of life, disability and resource utilisation in chronic pancreatitis: a prospective cohort study." Gut **60**(1): 77-84.
- Muller, M. W., H. Friess, J. Kleeff, R. Dahmen, M. Wagner, U. Hinz, D. Breisch-Girbig, G. O. Ceyhan and M. W. Buchler (2007). "Is there still a role for total pancreatectomy?" Ann Surg **246**(6): 966-974; discussion 974-965.
- Muñoz-Bravo, J. L., M. Hidalgo-Figueroa, A. Pascual, J. López-Barneo, A. Leal-Cerro and D. A. Cano (2013). "GDNF is required for neural colonization of the pancreas." Development **140**(17): 3669-3679.
- Nakao, A., T. Imamura, S. Souchelnytskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C. H. Heldin, K. Miyazono and P. ten Dijke (1997). "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." The EMBO Journal **16**(17): 5353-5362.
- Neesse, A., P. Michl, D. A. Tuveson and V. Ellenrieder (2014). "nab-Paclitaxel: novel clinical and experimental evidence in pancreatic cancer." Z Gastroenterol **52**(4): 360-366.
- Neoptolemos, J. P., J. Kleeff, P. Michl, E. Costello, W. Greenhalf and D. H. Palmer (2018). "Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **15**(6): 333-348.
- 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. Anthoney, 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 and M. W. Buchler (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.

Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R. Padbury, M. J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M. N. Wente, J. R. Izbicki, H. Friess, M. M. Lerch, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, R. Doi, P. A. Lind, D. Smith, J. W. Valle, D. H. Palmer, J. A. Buckels, J. Thompson, C. J. McKay, C. L. Rawcliffe and M. W. Buchler (2010). "Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial." Jama **304**(10): 1073-1081.

Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr and M. W. Buchler (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." N Engl J Med **350**(12): 1200-1210.

Nitsche, U., P. Wenzel, J. T. Siveke, R. Braren, K. Holzapfel, A. M. Schlitter, C. Stoss, B. Kong, I. Esposito, M. Erkan, C. W. Michalski, H. Friess and J. Kleeff (2015). "Resectability After First-Line FOLFIRINOX in Initially Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Single-Center Experience." Ann Surg Oncol **22 Suppl 3**: S1212-1220.

Oettle, H., P. Neuhaus, A. Hochhaus, J. T. Hartmann, K. Gellert, K. Ridwelski, M. Niedergethmann, C. Zulke, J. Fahlke, M. B. Arning, M. Sinn, A. Hinke and H. Riess (2013). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial." Jama **310**(14): 1473-1481.

Oettle, H., S. Post, P. Neuhaus, K. Gellert, J. Langrehr, K. Ridwelski, H. Schramm, J. Fahlke, C. Zuelke, C. Burkart, K. Gutberlet, E. Kettner, H. Schmalenberg, K. Weigang-Koehler, W. O. Bechstein, M. Niedergethmann, I. Schmidt-Wolf, L. Roll, B. Doerken and H. Riess (2007). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial." Jama **297**(3): 267-277.

Ohnishi, H., T. Miyata, H. Yasuda, Y. Satoh, K. Hanatsuka, H. Kita, A. Ohashi, K. Tamada, N. Makita and T. Iiri (2004). "Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor- β 1 regulation of pancreatic stellate cellular functions." Journal of Biological Chemistry **279**(10): 8873-8878.

Okada, Y., H. Takeyama, M. Sato, M. Morikawa, K. Sobue, K. Asai, T. Tada, T. Kato and T. Manabe (1999). "Experimental implication of celiac ganglionotropic invasion of pancreatic-cancer cells bearing c-ret proto-oncogene with reference to glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF)." Int J Cancer **81**(1): 67-73.

Okazaki, K., K. Uchida, M. Ohana, H. Nakase, S. Uose, M. Inai, Y. Matsushima, K. Katamura, K. Ohmori and T. Chiba (2000). "Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response." Gastroenterology **118**(3): 573-581.

Omary, M. B., A. Lugea, A. W. Lowe and S. J. Pandol (2007). "The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases." J Clin Invest **117**(1): 50-59.

Ornstein, L. (1964). "Disc electrophoresis. I. Background and theory." Ann. NY Acad. Sci **121**(2): 321-349.

- Pakzad, F., A. M. Groves and P. J. Ell (2006). "The role of positron emission tomography in the management of pancreatic cancer." Semin Nucl Med **36**(3): 248-256.
- Palazon, A., A. W. Goldrath, V. Nizet and R. S. Johnson (2014). "HIF transcription factors, inflammation, and immunity." Immunity **41**(4): 518-528.
- Paratcha, G., F. Ledda, L. Baars, M. Couplier, V. Besset, J. Anders, R. Scott and C. F. Ibanez (2001). "Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts." Neuron **29**(1): 171-184.
- Permeth-Wey, J. and K. Egan (2009). "Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis." Familial Cancer **8**(2): 109-117.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Phillips, P. A., J. A. McCarroll, S. Park, M.-J. Wu, R. Pirola, M. Korsten, J. S. Wilson and M. V. Apte (2003). "Rat pancreatic stellate cells secrete matrix metalloproteinases: implications for extracellular matrix turnover." Gut **52**(2): 275-282.
- Pinzani, M. (2006). "Pancreatic stellate cells: new kids become mature." Gut **55**(1): 12-14.
- Porter, M. R. (1958). "Carcinoma of the Pancreatico-Duodenal Area : Operability and Choice of Procedure." Annals of Surgery **148**(4): 711-723.
- Pschyrembel, W. (2007). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Berlin, New York, de Gruyter.
- Pungpapong, S., M. B. Wallace, T. A. Woodward, K. W. Noh and M. Raimondo (2007). "Accuracy of endoscopic ultrasonography and magnetic resonance cholangiopancreatography for the diagnosis of chronic pancreatitis: a prospective comparison study." J Clin Gastroenterol **41**(1): 88-93.
- Raimondi, S., P. Maisonneuve and A. B. Lowenfels (2009). "Epidemiology of pancreatic cancer: an overview." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **6**(12): 699-708.
- Rassow, J., K. Hauser, R. Netzker and R. Deutzmann (2008). Duale Reihe Biochemie. Stuttgart, Thieme.
- Ross, D. E. (1954). "Cancer of the pancreas: A plea for total pancreatectomy." The American Journal of Surgery **87**(1): 20-33.
- Sawai, H., Y. Okada, K. Kazanjian, J. Kim, S. Hasan, O. J. Hines, H. A. Reber, D. S. B. Hoon and G. Eibl (2005). "The G691S RET polymorphism increases glial cell line-derived neurotrophic factor-induced pancreatic cancer cell invasion by amplifying mitogen-activated protein kinase signaling." Cancer Res **65**(24): 11536-11544.
- Schmied, B., F. Schmitz-Winnenthal, A. Tempia-Caliera, M. Büchler and K. Zgraggen (2004). "Das Pankreaskarzinom: aktuelle Therapiekonzepte." Schweiz Med Forum **04**(22): 579-584.

Schneider, E., A. Schmid-Kotsas, J. Zhao, H. Weidenbach, R. M. Schmid, A. Menke, G. Adler, J. Waltenberger, A. Grünert and M. G. Bachem (2001). "Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells." Am J Physiol Cell Physiol **281**(2): C532-543.

Schorn, S., I. E. Demir, N. Sann, F. Scheufele, L. Calavrezos, M. Sargut, R. M. Schirren, H. Friess and G. O. Ceyhan (2018). "Meta-analysis of the impact of neoadjuvant therapy on patterns of recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma." BJO Open **2**(2): 52-61.

Schulte, N. (2013). Epidemiologie und Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 334-339.

Schütte, K., A. Waldthaler and P. Malfertheiner (2013). Klinik der chronischen Pankreatitis mit Spektrum der alkoholischen, idiopathischen, hereditären und tropischen Genese. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 92-94.

Seicean, A. and S. Vultur (2015). "Endoscopic therapy in chronic pancreatitis: current perspectives." Clin Exp Gastroenterol **8**: 1-11.

Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." Journal of applied physiology **88**(4): 1474-1480.

Seufferlein, T. (2013). "Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Kurzversion 1.0." from <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>.

Shek, F. W.-T., R. C. Benyon, F. M. Walker, P. R. McCrudden, S. L. F. Pender, E. J. Williams, P. A. Johnson, C. D. Johnson, A. C. Bateman and D. R. Fine (2002). "Expression of transforming growth factor- β 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis." The American journal of pathology **160**(5): 1787-1798.

Sherman, M. H., R. T. Yu, D. D. Engle, N. Ding, A. R. Atkins, H. Tiriac, E. A. Collisson, F. Connor, T. Van Dyke, S. Kozlov, P. Martin, T. W. Tseng, D. W. Dawson, T. R. Donahue, A. Masamune, T. Shimosegawa, M. V. Apte, J. S. Wilson, B. Ng, S. L. Lau, J. E. Gunton, G. M. Wahl, T. Hunter, J. A. Drebin, P. J. O'Dwyer, C. Liddle, D. A. Tuveson, M. Downes and R. M. Evans (2014). "Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy." Cell **159**(1): 80-93.

Shi, Y.-F., C.-C. Fong, Q. Zhang, P.-Y. Cheung, C.-H. Tzang, R. S. S. Wu and M. Yang (2007). "Hypoxia induces the activation of human hepatic stellate cells LX-2 through TGF- β signaling pathway." FEBS Letters **581**(2): 203-210.

Sidorova, Y. A., K. Matlik, M. Paveliev, M. Lindahl, E. Piranen, J. Milbrandt, U. Arumae, M. Saarna and M. M. Bessalov (2010). "Persephin signaling through GFR α 1: the potential for the treatment of Parkinson's disease." Mol Cell Neurosci **44**(3): 223-232.

- Singh, M. and A. Maitra (2007). "Precursor lesions of pancreatic cancer: molecular pathology and clinical implications." Pancreatology **7**(1): 9-19.
- Sohal, D. P., P. B. Mangu, A. A. Khorana, M. A. Shah, P. A. Philip, E. M. O'Reilly, H. E. Uronis, R. K. Ramanathan, C. H. Crane, A. Engebretson, J. T. Ruggiero, M. S. Copur, M. Lau, S. Urba and D. Laheru (2016). "Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline." J Clin Oncol **34**(23): 2784-2796.
- Strobel, O. (2013). Ätiologie und Pathogenese der chronischen Pankreatitis. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 81-85.
- Tovey, E. R. and B. A. Baldo (1987). "Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes." ELECTROPHORESIS **8**(9): 384-387.
- Tran, K. T. C., H. G. Smeenk, C. H. J. van Eijck, G. Kazemier, W. C. Hop, J. W. G. Greve, O. T. Terpstra, J. A. Zijlstra, P. Klinkert and H. Jeekel (2004). "Pylorus Preserving Pancreaticoduodenectomy Versus Standard Whipple Procedure: A Prospective, Randomized, Multicenter Analysis of 170 Patients With Pancreatic and Periampullary Tumors." Annals of Surgery **240**(5): 738-745.
- Traverso, L. W. and W. P. Longmire, Jr. (1978). "Preservation of the pylorus in pancreaticoduodenectomy." Surg Gynecol Obstet **146**(6): 959-962.
- Trupp, M., R. Scott, S. R. Whitemore and C. F. Ibanez (1999). "Ret-dependent and -independent mechanisms of glial cell line-derived neurotrophic factor signaling in neuronal cells." J Biol Chem **274**(30): 20885-20894.
- Ueno, H., T. Kosuge, Y. Matsuyama, J. Yamamoto, A. Nakao, S. Egawa, R. Doi, M. Monden, T. Hatori, M. Tanaka, M. Shimada and K. Kanemitsu (2009). "A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer." Br J Cancer **101**(6): 908-915.
- Vastag, B. (2010). "Biotechnology: Crossing the barrier." Nature **466**(7309): 916-918.
- Veit, C., F. Genze, A. Menke, S. Hoeffert, T. M. Gress, P. Gierschik and K. Giehl (2004). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells." Cancer Res **64**(15): 5291-5300.
- Versteijne, E., C. H. van Eijck, C. J. Punt, M. Suker, A. H. Zwinderman, M. A. Dohmen, K. B. Groothuis, O. R. Busch, M. G. Besselink, I. H. de Hingh, A. J. Ten Tije, G. A. Patijn, B. A. Bonsing, J. de Vos-Geelen, J. M. Klaase, S. Festen, D. Boerma, J. I. Erdmann, I. Q. Molenaar, E. van der Harst, M. B. van der Kolk, C. R. Rasch and G. van Tienhoven (2016). "Preoperative radiochemotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer (PREOPANC trial): study protocol for a multicentre randomized controlled trial." Trials **17**(1): 127.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N.

- Bahary, R. K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias and M. F. Renschler (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." N Engl J Med **369**(18): 1691-1703.
- Vonlaufen, A., P. A. Phillips, L. Yang, Z. Xu, E. Fiala-Beer, X. Zhang, R. C. Pirola, J. S. Wilson and M. V. Apte (2010). "Isolation of quiescent human pancreatic stellate cells: a promising in vitro tool for studies of human pancreatic stellate cell biology." Pancreatology **10**(4): 434-443.
- Wake, K. (1971). "'Sternzellen' in the liver: Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A." American Journal of Anatomy **132**(4): 429-461.
- Wake, K. (2004). "Karl Wilhelm Kupffer And His Contributions To Modern Hepatology." Comp Hepatol **3 Suppl 1**: S2.
- Wang, K., I. E. Demir, J. G. D'Haese, E. Tieftrunk, K. Kujundzic, S. Schorn, B. Xing, T. Kehl, H. Friess and G. O. Ceyhan (2014). "The neurotrophic factor neurturin contributes toward an aggressive cancer cell phenotype, neuropathic pain and neuronal plasticity in pancreatic cancer." Carcinogenesis **35**(1): 103-113.
- Wang, M. C., L. D. Papsidero, M. Kuriyama, L. A. Valenzuela, G. P. Murphy and T. M. Chu (1981). "Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer." Prostate **2**(1): 89-96.
- Wang, Y., Y. Huang, F. Guan, Y. Xiao, J. Deng, H. Chen, X. Chen, J. Li, H. Huang and C. Shi (2013). "Hypoxia-inducible factor-1alpha and MAPK co-regulate activation of hepatic stellate cells upon hypoxia stimulation." PLoS One **8**(9): e74051.
- Watari, N., Y. Hotta and Y. Mabuchi (1982). "Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration." Okajimas Folia Anat Jpn **58**(4-6): 837-858.
- Weitz, J., M. Koch, J. Kleeff, M. W. Müller, J. Schmidt, H. Friess and M. W. Büchler (2004). "Operation nach Kausch-Whipple." Der Chirurg **75**(11): 1113-1119.
- Wells, S. A., Jr. and M. Santoro (2009). "Targeting the RET pathway in thyroid cancer." Clin Cancer Res **15**(23): 7119-7123.
- Whipple, A. O., W. B. Parsons and C. R. Mullins (1935). "TREATMENT OF CARCINOMA OF THE AMPULLA OF VATER." Ann Surg **102**(4): 763-779.
- Whitcomb, D. C. (2012). "Genetics of alcoholic and nonalcoholic pancreatitis." Curr Opin Gastroenterol **28**(5): 501-506.
- Witt, H. (2014). "Pathogenese der chronischen Pankreatitis." Der Gastroenterologe **9**(1): 6-13.
- Wittekind, C. (2013). Pathohistologische Klassifikation, Tumorstaging und R-Klassifikation des Pankreaskarzinoms. Erkrankungen des Pankreas. H. G. Beger, M. W. Büchler, H. Dralle et al., Springer Berlin Heidelberg: 327-333.
- Xu, Z., S. P. Pothula, J. S. Wilson and M. V. Apte (2014). "Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory." World J Gastroenterol **20**(32): 11216-11229.

Yadav, D., M. L. Eigenbrodt, M. J. Briggs, D. K. Williams and E. J. Wiseman (2007). "Pancreatitis: prevalence and risk factors among male veterans in a detoxification program." Pancreas **34**(4): 390-398.

Yadav, D., L. Timmons, J. T. Benson, R. A. Dierkhising and S. T. Chari (2011). "Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study." Am J Gastroenterol **106**(12): 2192-2199.

Yang, J., P. Runeberg-Roos, V. M. Leppanen and M. Saarma (2007). "The mouse soluble GFRalpha4 receptor activates RET independently of its ligand persephin." Oncogene **26**(26): 3892-3898.

Zeng, Q., Y. Cheng, Q. Zhu, Z. Yu, X. Wu, K. Huang, M. Zhou, S. Han and Q. Zhang (2008). "The relationship between over-expression of glial cell-derived neurotrophic factor and its RET receptor with progression and prognosis of human pancreatic cancer." Journal of International Medical Research **36**(4): 656-664.

Zha, M., F. Li, W. Xu, B. Chen and Z. Sun (2014). "Isolation and characterization of islet stellate cells in rat." Islets **6**(2): e28701.

Zhang, L., S. Chari, T. C. Smyrk, V. Deshpande, G. Klöppel, M. Kojima, X. Liu, D. S. Longnecker, M. Mino-Kenudson, K. Notohara, M. Rodriguez-Justo, A. Srivastava, G. Zamboni and Y. Zen (2011). "Autoimmune pancreatitis (AIP) type 1 and type 2: an international consensus study on histopathologic diagnostic criteria." Pancreas **40**(8): 1172-1179.

Zhang, L. and T. C. Smyrk (2010). "Autoimmune pancreatitis and IgG4-related systemic diseases." Int J Clin Exp Pathol **3**(5): 491-504.

Zhu, Z., H. Friess, F. F. diMola, A. Zimmermann, H. U. Graber, M. Korc and M. W. Büchler (1999). "Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer." J Clin Oncol **17**(8): 2419-2428.

Zhu, Z., J. Kleeff, H. Kaye, L. Wang, M. Korc, M. W. Büchler and H. Friess (2002). "Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells." Mol Carcinog **35**(3): 138-147.

Zhu, Z. W., H. Friess, L. Wang, T. Bogardus, M. Korc, J. Kleeff and M. W. Büchler (2001). "Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells." Clin Cancer Res **7**(1): 105-112.