

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Die Rolle der CXCL12-CXCR4/CXCR7-Achse in der pankreatischen Neuropathie

Kristina Reichert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Helmut Friess
2. Priv. -Doz. Dr. Rickmer Braren
3. Prof. Dr. Radu Roland Rad

Die Dissertation wurde am 05/11/2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10/11/2021 angenommen.

Für Matthias, Emil und Brigitte

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CSA	Catalyzed Signal Amplification
d	Tag/e
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	dorsal root ganglia
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GPCR	G-Protein coupled receptor
h	Stunde/n
hSC	human Schwann cell
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
mg	Milligramm
min.	Minute/n
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
Nr.	Nummer
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCa	Pankreaskarzinom
PCR	Polymerase chain reaction

RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	rounds per minute
SDF 1	Stromal cell-derived Factor 1
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween
µg	Microgramm
µl	Microliter
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Teile der vorgelegten Dissertation wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Demir IE*, **Kujundzic K***, Pfitzinger PL, Saricaoglu ÖC, Teller S, Kehl T, Reyes CM, Ertl LS, Miao Z, Schall TJ, Tieftrunk E, Haller B, Diakopoulos KN, Kurkowski MU, Lesina M, Krüger A, Algül H, Friess H, Ceyhan GO. Early pancreatic cancer lesions suppress pain through CXCL12-mediated chemoattraction of Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jan 3;114(1):E85-E94. doi: 10.1073/pnas.1606909114. Epub 2016 Dec 16. * **gleichgestellte Erstautorschaft**

Diese Publikation wurde im folgenden Editorial des Journals *Science Signaling* als „featured article“ diskutiert:

Gough NR. Tumor blocks pain with CXCL12. *Sci Signal.* 2017 Jan 10;10(461). pii: eaam7233. doi: 10.1126/scisignal.aam7233.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	9
Das Pankreaskarzinom.....	9
Die chronische Pankreatitis	11
Pankreatische Neuropathie.....	12
Chemokine und ihre Rezeptoren	13
CXCL12	14
CXCR4	15
CXCR7	17
Die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse in malignen Neoplasien	19
Die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse in inflammatorischen Prozessen	20
Die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse in der Neurologie.....	20
ZIELE DER ARBEIT	22
MATERIAL UND METHODEN	24
Geräte.....	24
Reagenzien	24
Puffer und Lösungen	27
Käuflich erwerbliche Kits.....	27
Verbrauchsmaterialien	27
Patienten und Gewebe	28
Tiere und operatives Prozedere	29
Zellkultur.....	30
Hypoxie.....	31
Chemotaxis Assay	31
Migration Assay.....	32

Ko-Kultur	32
Immunhistochemie	33
Immunfluoreszenz	34
Immunoblot	35
ELISA.....	36
Antikörper bzw. small molecule Inhibitoren:	36
Statistische Auswertung	37
ERGEBNISSE	38
Die Expression und Lokalisation von CXCR4 und CXCR7 im Pankreas.....	38
Expression der Rezeptoren in humanen Schwannschen Zellen.....	42
Rezeptorexpression in Zusammenhang mit Schmerz	43
Histopathologische Verteilung von CXCL12.....	44
Ligandenexpression in Zusammenhang mit Schmerz.....	48
Quantitative Rezeptorexpression in Zelllinien	49
Rezeptorexpression unter Hypoxie	50
CXCL12-Expression in Zelllinien	51
Einfluss von Ko-Kultivierung auf die Rezeptorexpression der Tumorzellen.....	53
Einfluss von Ko-Kultivierung auf die Rezeptorexpression der neuronalen und Schwannschen Zelle	54
CXCL12 wirkt chemoattraktiv auf Schwannsche Zellen.....	57
CXCR4 und CXCR7 beeinflussen die Migration Schwannscher Zellen.....	58
Einfluss der Rezeptoren auf die Migration der Karzinomzellen	62
DISKUSSION	65
ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	72
LITERATUR	73
DANKSAGUNG	82

Einleitung

Das Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas/ Pankreaskarzinom ist auch aufgrund der nur geringen diagnostischen und therapeutischen Fortschritte der letzten zwei Jahrzehnte die Krebsart mit der höchsten Letalität (Krebs in Deutschland 2009/2010; www.krebsdaten.de). Wenn keine kurative Resektion möglich ist, liegt das mittlere Überleben unter einem Jahr und das gesamte 5-Jahres-Überleben bei 5-9 % (Dangi-Garimella et al. 2012). Eine Erklärung hierfür liegt in der meist zu späten Diagnosestellung in einem metastasierten Stadium. 52 % der Patienten haben bei Diagnosestellung Fernmetastasen und 26 % zeigen eine regionale Metastasierung (Dangi-Garimella et al. 2012). Als wichtigster Prognosefaktor für das Überleben gilt daher die Resektabilität, doch selbst nach erfolgter chirurgischer Therapie liegt das 5-Jahres-Überleben nur bei 20-30 % (Dangi-Garimella et al. 2012; Krebs in Deutschland 2009/2010; www.krebsdaten.de).

Wegen des mittleren Erkrankungsalters von 70/76 Jahren bei Männern/Frauen steigt die Inzidenz der Neuerkrankungen mit der demographischen Entwicklung stetig an. Weitere Risikofaktoren für das Auftreten eines Pankreaskarzinoms sind aktives und passives Rauchen, Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2, Verwandte ersten Grades mit einem Pankreaskarzinom und chronische Pankreatitis (Krebs in Deutschland 2009/2010; www.krebsdaten.de; Tempero et al. 2010).

Man geht davon aus, dass mehrere Faktoren die Malignität der Zellen bestimmen. Der erste Schritt jeder malignen Neoplasie ist die genetische Transformation. Die sukzessive Akkumulation von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führt letztendlich zum Pankreaskarzinom. Das histologische Spiegelbild dieses Prozesses zeigt sich in der Progredienz exokriner Pankreasazinuszellen zu intraepithelialen Neoplasien des Pankreas (PanIN-Zellen) und schließlich entdifferenzierten Karzinomzellen (Gahneh et al. 2007; Algül et al. 2008; Bannasch et al. 1986). Zusätzlich besteht das

Pankreaskarzinom aus unterschiedlichen Kompartimenten. Ein Kompartiment wird von ausgereiften und relativ gut differenzierten Zellen gebildet. Ein weiteres, numerisch wesentlich kleineres Kompartiment, wird von Krebsstammzellen gebildet. Man vermutet das diese Zellen aufgrund ihrer niedrigen Chemo- und Radiosensitivität an der Metastasierung des Karzinoms und am konsekutiven Therapieversagen maßgeblich beteiligt sind (Gahneh et al. 2007; Algül et al. 2008; Bannasch et al. 1986). Bezeichnend für das Pankreaskarzinom ist weiterhin ein dichtes desmoplastisches Stroma. Dieses wird durch aktivierte Stellatumzellen gebildet. Diese sekretieren neben Kollagen und Matrix-Metalloproteinasen auch zahlreiche Integrine, Wachstumsfaktoren und Chemokine, unter anderem CXCL12, welche mit einer schlechteren Prognose und Therapieresistenz assoziiert sind (Hidalgo et al. 2012).

Anatomisch ergibt die retroperitoneale Lage des Pankreas, dass Patienten meist lange asymptomatisch bleiben und die Erkrankung erst spät erkannt wird. Da 75 % aller Pankreaskarzinome im Kopf oder Hals des Pankreas lokalisiert sind und somit in enger Nachbarschaft zum Gallengang stehen, fallen ca. 30 % aller Patienten klinisch primär durch einen schmerzlosen Ikterus auf (Tempero et al. 2010).

Der Goldstandard in der Diagnostik des Pankreaskarzinoms ist die Kontrastmittel-gestützte Computer Tomographie (CT). Weitere Optionen sind die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) und die Endosonographie (EUS) (Shrikhande et al. 2012; Fusaroli et al. 2012). Der einzige Biomarker, der Verwendung in der Klinik gefunden hat, ist das CA19-9. Serum-Werte von CA19-9 zeigen bei symptomatischen Patienten eine Sensitivität von 79-81 % und eine Spezifität von 82-90 % (Ballehaninna et al. 2011). Hierbei werden jedoch bei obstruktivem Ikterus in 10-60 % der Proben falsch positive Werte erzielt (Ballehaninna et al. 2011).

Die einzige potenziell kurative Therapie des Pankreaskarzinoms ist die chirurgische Resektion. Tumore im Kopfbereich des Pankreas werden durch eine partielle Duodeno-Pankreatektomie oder eine pyloruserhaltende partielle Duodeno-Pankreatektomie, mit Erhalt von Magenantrum und Pylorus, entfernt (Tempero et al. 2010). Bei Tumoren im Körper oder Schwanz des Pankreas ist die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie das Standardverfahren. Die perioperativen Letalität beträgt an spezialisierten Zentren 3-5 % und die 5-Jahres-Überlebensrate kann bei einer R0-Resektion auf über 40

% gesteigert werden (Krebs in Deutschland 2009/2010; www.krebsdaten.de; Tempero et al. 2010; Demir et al. 2018). Durch eine neoadjuvante Chemotherapie kann die 5-Jahres-Überlebensrate bei lokal fortgeschrittenen Tumoren ebenfalls signifikant gesteigert werden. Nicht nur die R0-Resektionsrate, sondern auch Mikrometastasen, werden über diese Therapieoption positiv beeinflusst (Conroy et al. 2011).

Palliative Therapieoptionen sind neben der häufig indizierten Chemotherapie, mittels FOLFIRINOX- oder Gemcitabine+nab-Paclitaxel (Conroy et al. 2011), die endoskopische Stenteinlage in den Ductus choledochus bei Ikterus mit Pruritus, und eine Stenteinlage in das Duodenum bei Duodenalstenose zur Wiederherstellung der Passage (Tempero et al. 2010). Eine computertomographisch gestützte Blockade des Plexus coeliacus kann bei ausgereizter medikamentöser Schmerztherapie erwogen werden (Tempero et al. 2010).

Die chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, bei der durch rezidivierende Entzündungsschübe das gesunde Pankreasparenchym durch fibrotisches Bindegewebe ersetzt wird.

Da die Inzidenz der chronischen Pankreatitis in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum der Bevölkerung steigt, stellt die chronische Pankreatitis und ihre Behandlung ein zunehmendes Problem der westlichen Welt dar. Weltweit wird die Inzidenz zwischen 1,6-23 pro 100.000 mit einer steigenden Prävalenz angegeben. Die Letalität in Folge einer chronischen Pankreatitis ist um ein 3,6-faches im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht (Hoffmeister et al. 2012).

Alkoholabusus ist der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Pankreatitis und fortgesetzter Alkoholkonsum führt zu signifikant verkürztem Überleben (Hoffmeister et al. 2012). Seltener Formen sind die idiopathische Pankreatitis (28 %) und die hereditäre Pankreatitis (1-4 %), sowie die in westlichen Ländern sehr seltene Autoimmunpankreatitis (Hoffmeister et al. 2012).

Die Folge des bindegewebigen Umbaus der Bauchspeicheldrüse ist ein fortschreitender Verlust der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion (Hoffmeister et al. 2012). Dies spiegelt sich klinisch in Malabsorption und Gewichtsverlust, Maldigestion mit Steatorrhoe, Übelkeit und Diabetes Mellitus wieder (Hoffmeister et al. 2012; Nakajima et al. 2012; Dite et al. 2012). Das Hauptsymptom sind rezidivierende, häufig schubweise verlaufende, starke Oberbauchschmerzen, welche oft schwierig zu behandeln sind (Hoffmeister et al. 2012; Nakajima et al. 2012; Dite et al. 2012).

In der Diagnostik wird neben Anamnese, klinischer Untersuchung und Laboruntersuchungen die Sonographie des Pankreas eingesetzt. Ergänzende bildgebende Verfahren sind die Endosonographie (EUS) oder Schnittbildgebung mittels CT oder MRCP (Hoffmeister et al. 2012). Auf funktionaler Ebene beleuchten der fäkale Pankreaselastase-Test und Sekretin-Pankreozymin-Test die exokrine und ein Glukosetoleranztest die endokrine Funktionalität des Gewebes (Hoffmeister et al. 2012).

Die Therapie der chronischen Pankreatitis ist hauptsächlich symptomatisch, eine kausale Therapie ist nicht möglich. Symptome der exokrinen Funktionsstörung werden mit Enzymsubstitution behandelt (Hoffmeister et al. 2012). Endokrine Funktionsstörungen werden mit einer Einstellung der diabetischen Stoffwechsellage behandelt (Hoffmeister et al. 2012).

Die medikamentöse analgetische Behandlung erfolgt gemäß dem WHO-Stufenschema. Therapieresistente Schmerzen können mit einer Plexus coeliacus Blockade oder mittels thorakoskopischer Splanchnektomie behandelt werden (Hoffmeister et al. 2012).

Pankreatische Neuropathie

Das Pankreaskarzinom ist histopathologisch durch eine intra- und extrapankreatische perineurale Invasion in bis zu 100 % der Fälle gekennzeichnet (Liebl et al. 2014; Bockman et al. 1994; Nakao et al. 1996; Ceyhan et al. 2009). Ausgeprägte Schmerzen, eine schlechtere Resektabilität und somit ein verkürztes Überleben ergeben sich aus der intra- und peripankreatischen neuralen Invasion von Pankreaskarzinomzellen (Ceyhan et al. 2009; Demir et al. 2012). Starke Schmerzen finden ihr

histopathologisches Korrelat im Ausmaß der neuralen Invasion und werden daher als neuropathische Schmerzen klassifiziert. Nicht nur Karzinomzellen, sondern auch Entzündungszellen infiltrieren intrapancreatische neuronale Strukturen. Diese endoneurale Neuritis kann in 62 % der Fälle nachgewiesen werden und korreliert mit einer gesteigerten Dichte an Nervenfasern im Pankreaskarzinom (Ceyhan et al. 2009). Im Rahmen der neuralen Beeinflussung durch das Pankreaskarzinom kommt es zu der oben erwähnten Zunahme der Nervendichte sowie zur Hypertrophie intrapancreatischer Nerven. Diese Phänomene werden durch den Begriff der „pancreatischen Neuroplastizität und Neuropathie“ beschrieben und korrelieren mit dem Schweregrad der neuralen Invasion (Ceyhan et al. 2009).

Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind 8-14 kDa große Proteine, welche die größte Untergruppe der Zytokin-Superfamilie bilden. Sowohl die Zugehörigkeit als auch die primäre Funktion ergeben sich aus der Ableitung des Namens von chemotaktischen Zytokinen. Chemotaxis beschreibt die durch Chemokine induzierte Wanderung von Zellen anhand eines Stoffgradienten (Zhu et al. 2012).

Mittlerweile werden über 50 verschiedene Chemokine unterschieden, die anhand der Position der ersten zwei Cystein-Aminosäuren zueinander in die CXC-, CC-, C-, und CX3C-Subfamilie klassifiziert werden (Sun et al. 2010; Zhu et al. 2012). CXCL12 gehört zu der Gruppe der CXC-Chemokine. Hierbei sind die Cysteine der CXC-Gruppe durch eine (nicht-Cystein) Aminosäure getrennt. Das L in CXCL12 steht für Ligand. Darauf folgt eine Nummer zur Identifikation (Fernandez et al. 2002; Zlotnik et al. 2000; Guerreiro et al. 2011; Zhu et al. 2012). Chemokine entfalten ihre vielfältigen Wirkungen im Körper über Bindung an heptahelikale Transmembranproteine (Guerreiro et al. 2011; Zhu et al. 2012).

Die über 20 verschiedenen Chemokinrezeptoren werden anhand ihrer Liganden in die bereits bekannten Subfamilien unterteilt. Wir unterscheiden die CXCR-, CCR-, CR- und CX3CR-Gruppe. Das Suffix R steht hierbei für Rezeptor. So erschließt sich schon aus dem Namen des Rezeptors CXCR7, dass er Mitglieder der CXC-Chemokine bindet (Zlotnik et al. 2000). In Falle von CXCR7 sind das CXCL11

und CXCL12. CXCL12 bindet weiterhin CXCR4. Das ein Chemokin mehrere Rezeptoren und ein Rezeptor mehrere Chemokine der jeweiligen Subfamilie bindet ist typisch für alle Chemokine (Zhu et al. 2012; Sun et al. 2010; Zlotnik et al. 2000).

Chemokine sind über Bindung an ihre Rezeptoren in viele physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert. Sie sind obligat für eine funktionierende Abwehr, da sie die Entstehung, Homöostase und Aktivierung des Immunsystems kontrollieren (Zlotnik et al. 2000; Fernandez et al. 2002). Aber auch außerhalb des Immunsystems regulieren sie komplexe Vorgänge, wie etwa die Hämatopoese und Angiogenese (Wang et al. 2012).

Im pathophysiologischen Spektrum können Chemokine Prozesse wie die Atherosklerose (Koltsova et al. 2012), aber auch die Proliferation und das Überleben von Karzinomzellen sowie Metastasierungsart und -lokalisierung beeinflussen (Fulton et al. 2009; Zhu et al. 2012; Sun et al. 2010; Rollins et al. 2006).

CXCL12

CXCL12, oder auch Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), wurde erstmals 1993 aus murinen Knochenmarksstromazellen isoliert (Tashiro et al. 1993). Es ist auf Chromosom 10.11q1 codiert und es sind sechs Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Nach dem heutigen Stand der Forschung geht man davon aus, dass alle Isoformen chemotaktisch aktiv sind (Zlotnik et al. 2000; Janowski et al. 2009; Davis et al. 2005; Pillarisetti et al. 2001).

Auf der Proteinebene zeigt CXCL12 das bereits bekannte Cystein-X-Cystein Muster. Die Disulfidbrücken zwischen diesen Cysteinen und zwei weiter C-terminal gelegenen Cysteinen sind essenziell für die räumliche Stabilität und funktionale Integrität des Chemokins. Im Anschluss daran befindet sich eine sehr flexible, als N- Schleife betitelte Struktur, über welche die Bindung an den Rezeptor

erfolgt. Über eine C-terminal gelegene α -Helix erfolgt die Modulation der Aktivität (Fernandez et al. 2002; Veldkamp et al. 2005; Zhu et al. 2012; Ohnishi et al. 2000; Crump et al. 1997).

Da die Oligomerisierung von CXCL12 sowohl vom pH-Wert, als auch von anwesenden Gegenionen und der Bindung an Glykosaminoglykane abhängt, war lange Zeit ungeklärt in welcher Form CXCL12 physiologisch vorliegt. Unter physiologischen Bedingungen werden Homodimere von Zellen sekretiert und binden sich extrazellulär. CXCR7 zeigt eine höhere Affinität zu Monomeren, wohingegen CXCR4 Mono- und Dimere binden kann, was allerdings unterschiedliche intrazelluläre Signalwege und kohärent auch unterschiedliche biologische Effekte zur Folge hat (Ray et al. 2012; Drury et al. 2011).

Hinweise für die essenzielle Rolle von CXCL12 im Organismus liefern die hohe evolutionäre Konservierung zwischen Wirbeltieren, die für die Subfamilie untypische genetische Position auf Chromosom 10, genetische Gemeinsamkeiten mit Housekeeping-Genen und die ubiquitäre Expression (Shirozu et al. 1995). Tatsächlich sind CXCL12- Knockout Mäuse nicht über den Zeitpunkt der Geburt hinaus lebensfähig (Nagasawa et al. 1996). In der Embryogenese reguliert CXCL12 viele Prozesse wie Lungen- (Chen et al. 2010) und Nierenreifung in Mäusen (Haege et al. 2012), die Urkeimzellwanderung (Boldajipour et al. 2011), Gastrulation und Myogenese in Zebrafärblingen (Nair et al. 2008; Chong et al. 2007), neuronale Migration (Stumm et al. 2007) und die anatomisch korrekte Anlage der Aorta (Siekman et al. 2009). Weitere funktionale Aspekte von CXCL12 werden in den folgenden Abschnitten. besprochen.

CXCR4

Nach seiner Entdeckung wurde CXCR4 primär dafür bekannt, dass es HI-Viren Typ 1 als Ko-Rezeptor auf CD4⁺ T-Lymphozyten dient. 1996 veröffentlichten zwei Arbeitsgruppen zeitnah und unabhängig voneinander die spezifische Bindung von CXCL12 an CXCR4 (Bleul et al. 1996; Oberlin et al. 1996).

Wie bei den meisten Chemokinrezeptoren handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). GPCRs gehören in die Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine. Sie

sind dementsprechend mit sieben Helices, welche über drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, in der Membran verankert. Die Bindung des Liganden erfolgt über den extrazellulär gelegenen N-Terminus und die extrazellulären Schleifen (Wu et al. 2010; Rodriguez et al. 2012). Die Signaltransduktion, Modulation der Aktivität und Internalisierung des Rezeptors werden über den intrazellulären C-Terminus und die intrazellulären Schleifen kontrolliert (Minina et al. 2007; Canals et al. 2012).

Die aktuelle Studienlage lässt darauf schließen, dass CXCR4 physiologisch sowohl als Monomer, als Homodimer und als Heterodimer mit CXCR7 vorliegt. Man vermutet ein 1:1 und 2:2 Verhältnis bei der Bindung von Ligand an Rezeptor, wobei durch die unterschiedlichen Bindungen unterschiedliche Signalwege ausgelöst werden (Szpakowska et al. 2012; Choi et al. 2012; Rodriguez et al. 2012; Wu et al. 2010; Drury et al. 2011; Ray et al. 2012; Decailot et al. 2011). Diskrepanzen zwischen Studien zu diesem Thema weisen darauf hin, dass die Art der Signaltransduktion nicht nur von der Quartärstruktur beeinflusst wird, sondern auch von der jeweiligen Zellart abhängen könnte.

CXCL12 ist der einzige bekannte physiologische Ligand von CXCR4. Bedenkt man dies, sind breite Übereinstimmungen in Expression und physiologischen Funktionen zu erwarten. Tatsächlich zeigen CXCR4- und CXCL12- Knockout Mäuse fast identische Entwicklungsfehler (Zou et al. 1998). Dennoch sind Differenzen in den Expressionsmustern der beiden Proteine zu beobachten, und nicht alle Funktionen von CXCL12 sind durch CXCR4 vermittelt. Rein CXCR4- vermittelt scheint CXCL12 während der Morphogenese des Gehirns die neuronale Chemotaxis zu induzieren (Schönemeier et al. 2008). Auch die Myogenese von Mäusen steuert CXCL12 über CXCR4 (Hunger et al. 2012). Im pathologischen Spektrum ist die CXCL12-CXCR4 Achse assoziiert mit einer gesteigerten Metastasierung des Mammakarzinoms (Hernandez et al. 2011) und gesteigertem Wachstum von Neuroblastomen (Lieberman et al. 2012). Prinzipiell scheint CXCL12 Chemotaxis vermehrt durch CXCR4 zu vermitteln (Schönemeier et al. 2008; Hunger et al. 2012; Liberman et al. 2012; Hernandez et al. 2011).

CXCR7

Da CXCL12 und CXCR4 Knockout Mäuse fast identische Entwicklungsfehler zeigen, nahm man lange an, dass CXCR4 der einzige Rezeptor von CXCL12 ist. Dies änderte sich erst 2005, als entdeckt wurde, dass CXCL12 auch CXCR7 spezifisch bindet. Darüber hinaus bindet CXCL12 mit signifikant höherer Affinität an CXCR7 als an CXCR4. Der zweite bekannte Ligand von CXCR7 ist CXCL11, auch „Interferon inducible T Cell α chemoattractant“ genannt. CXCR7 bindet CXCL11 mit geringerer Affinität als CXCL12 (Burns et al. 2006).

Das Chemokinrezeptor-untypische Verhalten von CXCR7 könnte die späte Entdeckung von CXCR7 erklären. So signalisiert CXCR7, trotz eines klassischen Aufbaus mit sieben transmembranen Helices, einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus, nicht wie klassische GPCRs über G-Protein-Untereinheiten (Canals et al. 2012). Es gibt mehrere Modelle, die beschreiben, was auf die Bindung von CXCL12 an CXCR7 folgt. Das älteste Modell beschreibt die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes nach erfolgter Bindung. Daraufhin rezirkuliert nur der Rezeptor wieder zur Zelloberfläche (Canals et al. 2012). Dieser Vorgang ist kohärent mit der Annahme, dass CXCR7 dazu dient unnötiges CXCL12 im Gewebe abzufangen, um so einen differenzierten Gradienten aufzubauen. Für diese These spricht weiterhin, dass CXCL12 CXCR7 mit höherer Affinität als CXCR4 bindet und dass die Oberflächenexpression von CXCR7 unabhängig von extrazellulären CXCL12 Konzentrationen ist (Canals et al. 2012).

Das zweite Modell postuliert, dass CXCR7 zwar nicht G-Protein gekoppelt signalisiert, aber nach Aktivierung durch einen Liganden β -Arrestin 1 oder 2 rekrutiert und so daran gekoppelte Signalwege, wie den ERK1/2, PKC ζ/λ , STAT3 und Akt Signalweg, aktiviert (Rajagopal et al. 2010; Zabel et al. 2009; Kumar et al. 2012; Graham et al. 2012; Ödemis et al. 2010).

Des Weiteren zeigte sich, dass CXCR4/CXCR7-Heterodimere ebenfalls nicht G-Protein gekoppelt, sondern über β -Arrestin gekoppelte MAP-Kinasen wie p38 MAPK, SAPK und ERK1/2 signalisieren (Decailot et al. 2011; Levoye et al. 2009). Welcher dieser Mechanismen zum Tragen kommt,

hängt wahrscheinlich sowohl von der Zellart und dem Aktivierungszustand der Zelle, dem extrazellulärem Milieu und der Quartärstruktur von Ligand wie auch Rezeptor ab.

Aus der Komplexität der Signaltransduktion von CXCR7 kann sein breites funktionales Spektrum abgeleitet werden. So zeigen CXCR7-Knockout Mäuse ähnliche Entwicklungsfehler wie CXCR4^{-/-} und CXCL12^{-/-} Genotypen mit kohärentem perinatalem Tod. An diesen Tieren konnte sowohl festgestellt werden wie wichtig direkt durch CXCR7-vermittelte Funktionen von CXCL12 sind, als auch, wie essentiell CXCR7 für die Regulation der CXCL12-CXCR4 Achse ist (Graham et al. 2012). In CXCR7^{-/-} Geweben steigen die extrazellulären CXCL12 Konzentrationen, was wiederum die Oberflächenexpression von CXCR4 stark hemmt (Graham et al. 2012). In der Embryogenese moduliert CXCR7 so die CXCR4-vermittelte Migration von Keimzellen und neuronalen und renalen Vorläuferzellen durch Bildung eines CXCL12-Gradienten (Schönemeier et al. 2008; Boldajipour et al. 2008; Haege et al. 2012). Auch im adulten Gewebe kommen diese Mechanismen noch zum Tragen. So ist der CXCL12 Konzentrationsabfall im periluminalen Gewebe von Blutgefäßen ein Auslöser der Infiltration von Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke. Der Konzentrationsabfall wiederum ist durch CXCR7 vermittelt (Cruz-Orengo et al. 2011).

Allerdings ist die Rolle von CXCR7 nicht rein modulierend. So gibt es Beispiele für rein CXCR7-vermittelte Migration in Keimzellen (Graham et al. 2012), Melanozyten (Lee et al. 2012) und Neuroblastomzellen (Ma et al. 2011). Mitunter die wichtigste Funktion von CXCR7 scheint der wachstumsfördernde Effekt auf seine Zielzellen zu sein. So wirkt es mitogen auf Schwannsche Zellen, Astrozyten (Ödemis et al. 2010) und endotheliale Vorläuferzellen (Yan et al. 2012). Auch im pathologischen Spektrum vermittelt CXCR7 primär proliferative und angiogene Effekte von CXCL12 auf verschiedene Krebszellarten und ihre Vorläufer (Hernandez et al. 2011; Burns et al. 2006; Miao et al. 2007; Raggio et al. 2005).

Die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse in malignen Neoplasien

Der erste Hinweis auf die Verbindung von Tumoren mit Chemokinen war die relative Überexpression von Chemokinrezeptoren im Mammakarzinom (Müller et al. 2001). Heute wissen wir, dass auch CXCL12 und seine Rezeptoren in vielen Karzinomgeweben, unter anderem im Pankreaskarzinom, überexprimiert werden (Domanska et al. 2012; Sun et al. 2010; Graham et al. 2012; Burns et al. 2006; Monnier et al. 2012; Hao et al. 2012; Heinrich et al. 2012; Zhi et al. 2012; Rogers et al. 2006). Darüber hinaus zeigten klinische Studien, dass die Stärke der Expression von CXCL12 im Pankreaskarzinom mit einer höheren Dichte an Blut- und Lymphgefäßen, positivem Lymphknotenstatus (Cui et al. 2011) und geringerem Überleben korreliert (Liang et al. 2010).

Auf experimenteller Ebene zeigte sich, dass CXCL12 sowohl über CXCR4 als auch über CXCR7 direkt antiapoptotisch und mitogen auf Pankreaskarzinomzellen wirkt (Heinrich et al. 2012). Indirekt unterstützt CXCL12 das Pankreaskarzinomwachstum durch Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition (Li et al. 2012) und der Angiogenese. Es rekrutiert Tumor-assoziierte Makrophagen, welche angiogen wirken und die Immunantwort des Patienten auf den Tumor inhibieren (Schmid et al. 2011). Über diese Mechanismen verringert CXCL12 die Chemosensitivität des Pankreaskarzinoms (Singh et al. 2010). Darüber hinaus korreliert die Inhibition von CXCR4 mit verringerter Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen in vitro (Yadav et al. 2010). Das CXCL12 in diesem Kontext stammt dabei sowohl aus der autokrinen Produktion des Tumors als auch aus aktivierten pankreatischen Stellatum-Zellen (Gao et al. 2010). Diese oder ähnliche Effekte von CXCL12, CXCR4 und CXCR7 wurden auch in anderen Krebsarten wie der chronisch lymphatischen Leukämie, dem Glio- und Neuroblastom, Schilddrüsenkarzinom, kleinzelligen Bronchialkarzinom, Ösophaguskarzinom, Colonkarzinom, Leberzellkarzinom, Nierenzellkarzinom, Prostatakarzinom, Ovarialkarzinom, Melanom und Osteosarkom beobachtet (Domanska et al. 2012; Hernandez et al. 2011; Miao et al. 2007; Sun et al. 2010; Lee et al. 2012; Singh et al. 2010; Hao et al. 2012; Rollins et al. 2006).

Die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse in inflammatorischen Prozessen

Da CXCL12 erstmalig aus Stroma-Zellen des Knochenmarks isoliert wurde, liegt eine enge Verknüpfung an das Immunsystem nahe. So zeigen CXCL12- Knockout Mäuse eine gestörte Myelopoese und B-Zell Lymphopoese (Nagasawa et al. 1996). Im adulten Organismus ist CXCL12 essenziell involviert in der Proliferation, Ausreifung und Chemotaxis verschiedener Zellen des Immunsystems, unter anderen hämatopoetischer Stammzellen (Noda et al. 2010; Sugiyama et al. 2012; Nagasawa et al. 1996). So ergibt eine Erhöhung des Plasmalevels von CXCL12 (zum Beispiel während eines ischämisch induzierten Nierenversagens, einer Hepatitis oder einer pulmonalen Fibrose) die Rekrutierung von Stammzellen, Fibroblasten und Lymphozyten und vermittelt deren Infiltration in das inflammatorische Gewebe (Bucala 2012; Momcilovic et al. 2012; Santiago et al. 2006; Kavanagh et al. 2011).

Einer der Mechanismen zur lokalen Erhöhung der CXCL12-Konzentrationen scheint die Förderung der Transkription durch hypoxia inducible factor 1α (HIF1 α) zu sein, welcher sowohl im Pankreaskarzinom, als auch in der akuten Pankreatitis erhöht ist (Kavanagh et al. 2011; Wang et al. 2012; Gomez et al. 2004). Kohärent zeigte die Inhibition von CXCR4 in Tiermodellen von rheumatoider Arthritis, Asthma, Uveitis und Colitis anti-inflammatorische Effekte (Santiago et al. 2006; Momcilovic et al. 2012). Die Rolle von CXCL12 in der chronischen Pankreatitis ist noch weitgehend unerforscht. Die spärlichen Daten zeigen eine Korrelation zwischen der Schwere des Krankheitsverlaufes und der Überexpression von CXCL12 im Pankreas (Song et al. 2010).

Die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse in der Neurologie

Die erste Verknüpfung von CXCL12 zum Nervensystem erfolgte 1998 als die Arbeitsgruppe um Yong-Rui Zou neuronale Defekte in CXCR4 Knockout Mäusen feststellte (Zou et al. 1998). Tatsächlich ist CXCL12 in den verschiedensten Zellen des fetalen und adulten peripheren und zentralen Nervensystems

exprimiert und stark involviert in der embryologischen Entwicklung des Gehirns (Schönemeier et al. 2008; Zhu et al. 2012; Kilpatrick et al. 2011; Melik-Parsadaniantz et al. 2008).

Auch im adulten zentralen Nervensystem geht man davon aus, dass die Wanderung von neuronalen Vorläuferzellen in geschädigtes Gewebe durch CXCL12 gesteuert wird (Zhu et al. 2012; Stumm et al. 2007). Im Rahmen akuter oder chronischer Verletzungen des zentralen Nervensystems ist CXCL12 an der Chemotaxis von Ependymzellen und oligodendritischen Vorläuferzellen beteiligt. Einmal am Ort der Verletzung angekommen differenzieren diese zu glialen Zellen, welche Narbengewebe bilden. Die Ausdifferenzierung und Proliferation dieser Zelltypen, sowie die darauffolgende Remyelinisierung der Wunde scheinen ebenfalls durch CXCL12 gefördert zu werden (Jaerve et al. 2012; Carbajal et al. 2010; Momcilovic et al. 2012).

Auch im neuropathologischen Spektrum vermittelt CXCL12 die Proliferation und Chemotaxis von Neuroblastomen (Ma et al. 2011), Hypophysenadenomen (Barbieri et al. 2007), Astrozytomen (Wang et al. 2012) und Glioblastomen (Najbauer et al. 2012; Rao et al. 2012).

CXCL12 ist darüber hinaus mit Schmerzsyndromen assoziiert. Inhibition von CXCL12 oder CXCR4 führte zur Schmerzlinderung in Tiermodellen von somatoviszeralem Schmerz, Opioid-induzierter Hyperalgesie und HIV-assoziiertes Polyneuropathie (Foster et al. 2011; Wilson et al. 2010; Bhangoo et al. 2009).

Ziele der Arbeit

In Bezug auf das Pankreaskarzinom werden zahlreiche Interaktionen zwischen Tumorzellen und Neuronen beobachtet. Hierzu gehören v.a. die neurale Invasion, die Neuritis, und die Hyperinnervation des Tumors (Ceyhan et al. 2009). Neurale Invasion ist in 100 % der Pankreaskarzinome zu finden und eigenständig an ein verkürztes Überleben, lokale Metastasierung und neuropathische Schmerzen gekoppelt. Hieraus ergibt sich der substantielle Einfluss der „pankreatischen Neuropathie“ auf die Prognose (Ceyhan et al. 2009; Demir et al. 2012). Studien belegen, dass Pankreaskarzinomzellen aufgrund ihrer Affinität zu Nerven diese als Mittel zur Streuung verwenden (Demir et al. 2012; Gil et al. 2010). Es wurde der umgekehrte Denkansatz aufgestellt, dass Nerven bereits zu Beginn der Erkrankung von Tumorzellen chemoattraktiv „angelockt“ werden (Demir et al. 2014). Die Rolle von Chemokinen im Rahmen der Interaktion zwischen Pankreaskarzinomzellen und neuronalen sowie Schwannschen Zellen war zu Beginn dieser Promotion noch nicht untersucht worden.

Das Chemokin CXCL12, auch stromal derived factor 1 α (SDF-1 α), ist ein Chemokin der CXC-Subfamilie. Für CXCL12 konnte die Expression in gut durchbluteten Geweben wie der Milz, Leber und den Nieren nachgewiesen werden. In diesen Geweben reguliert es die Rekrutierung, die Proliferation und das Überleben hämopoetischer, CD34-positiver Stammzellen und stromaler Zellen (Sun et al. 2010). CXCR4, der zugehörige Rezeptor, zeigt eine breit gefächerte Expression, unter anderem im zentralen Nervensystem und in Zellen des Immunsystems. In Bezug auf Letztere konnte gezeigt werden, dass CXCL12 die Migration von Leukozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen CXCR4 vermittelt steuert (Sun et al. 2010; Zou et al. 1998). Weitere Studien zeigten die Überexpression von CXCR4 und dessen Einfluss auf Tumorzellproliferation und Metastasierung in über 25 verschiedenen humanen Krebsarten, unter anderem im Pankreas-, Prostata-, Brust- und Ovarialkarzinom (Sun et al. 2010; Domanska et al. 2013).

Im Laufe der jüngeren Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass CXCL12 sowohl in Kombination mit CXCR4 als auch singulär über einen weiteren Rezeptor, CXCR7, Einfluss auf die

neuronal und gliale embryonale Migration, Angiogenese, Stammzellwanderung und Metastasierung von Krebszellen ausüben kann (Sun et al. 2010; Burns et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eruiert werden, ob die CXCL12-CXCR4/CXCR7-Achse an der Chemoattraktion zwischen glialen Zellen des peripheren Nervensystems (Schwannschen Zellen) und pankreatischen Tumorzellen involviert ist.

Im ersten Schritt wurde die Expression von CXCL12, CXCR4 und CXCR7 in Nerven, Schwannschen Zellen und Pankreaskarzinomzellen sowie in Gewebeproben gesunder Pankreata und Pankreaskarzinomen via Immunfluoreszenz, Immunhistochemie, Immunoblotting, ELISA und PCR untersucht. Die Effekte des karzinomatösen Mikromilieus auf Schwannsche Zellen und Neurone, vor allem dessen quantitative Effekte auf die Expression von CXCR4 und CXCR7, wurden durch Ko-Kultivierung von Schwannscher Zellen und Neuronen mit Pankreaskarzinomzellen untersucht. Die Effekte der CXCL12-CXCR4/CXCR7-Achse auf die Migration und die Chemoattraktion Schwannscher Zellen zu Pankreaskarzinomzellen wurden mit Migration- und Chemotaxis-Assays unter Normbedingungen sowie unter Blockade von CXCL12, CXCR4 und CXCR7 untersucht.

Material und Methoden

Geräte

CCD Kamera: ColorView XS, SiS (Münster, Tübingen, Deutschland)

Inkubator: Hera Cell 150, Thermo Science (Bonn, Deutschland)

Mikroskop: Axiovert 40, CFL, Zeiss (Jena, Deutschland)

Multiplex ELISA: MAGPIX Multiplex ELISA, Merck Millipore (Massachusetts, Vereinigte Staaten)

Paraffin-Einbettungsmaschine: EG1160, Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland)

Mixer: Roller Mixer, Stuart (Shaffordshire, England)

Stereomikroskop: SMZ1500, Nikon (Tokyo, Japan)

Sterile Werkbank: Hera Safe, Thermo Science (Bonn, Deutschland)

Thermomixer: Thermomixer Comfort 1,5ml, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

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

Western Blot Kammer: Biometra (Göttingen, Deutschland)

Zelllysator: Mikro-Dismembrator S, Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, Deutschland)

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

Zentrifuge: 5425 Eppendorf (Wesseling-Erzdorf, Deutschland)

Reagenzien

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

Alexa 488 anti-rabbit IgG Antikörper, Invitrogen (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

Antibody Diluent, Dako (Glostrup, Dänemark)

Anti-mouse IgG Antibody, 074-1806, KPL (Gaithersburg, Vereinigte Staaten)

Citronensäure-Monohydrat, 210,14 g/mol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Collagenase solution, CLS2, Worthington (Lakewood, Vereinigte Staaten)

CXCR4 Antagonist AMD 3100, Tocris (Missouri, Vereinigte Staaten)

CXCR7-neutralisierender Antikörper 9C4, MBL (Woburn, Vereinigte Staaten)

4',6-Diamidin-2-phenylindol, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Donkey-Anti-rabbit, GE-Healthcare, NA9340V (Buckinghamshire, England)

ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific (Waltham, Vereinigte Staaten)

ECM Gel, Sigma-Aldrich, E1270 (Taufkirchen, Deutschland)

Envision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-rabbit, Dako (Glostrup, Dänemark)

Ethanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Fetales Kälberserum, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

Fluorescent Mounting Medium, Dako (Glostrup, Dänemark)

Formaldehyd 4 %, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

GAPDH Antikörper, santa cruz, sc32233 (Dallas, Vereinigte Staaten)

Goat anti-mouse IgG Biotinylated Antibody, KPL (Gaithersburg, Vereinigte Staaten)

Goat anti-Mouse IgG-HRP, santa cruz, sc2005 (Dallas, Vereinigte Staaten)

Hank's BSS, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

Hoechst Stain solution, Sigma-Aldrich (St. Louis, Vereinigte Staaten)

Humane Schwannsche Zellen, ScienCell (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

Hydrogen peroxide 30 %, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

L-Glutamine solution, Sigma-Aldrich (St. Louis, Vereinigte Staaten)

Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako (Glostrup, Dänemark)

McCoy's 5A Medium, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

MEM-Medium, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

Methanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Milchpulver, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Monoclonal Anti-CXCL12/SDF-1 Antibody, MAB310, mouse, R&D Systems (Minneapolis, Vereinigte Staaten)

Monoclonal Anti-CXCL12/SDF-1 Antibody, MAB350, mouse, R&D Systems (Minneapolis, Vereinigte Staaten)

Mounting-Medium für die Immunhistochemie, Vecta Mount, Vector Laboratories (Burlingame, Vereinigte Staaten)

Natriumchlorid, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Negative Control Mouse IgG1 Antibody, Dako (Glostrup, Dänemark)

Neurobasal Medium, Gibco, Invitrogen (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

10 % Normal Goat Serum, Invitrogen (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

N-Universal Negative Control Rabbit, Dako (Glostrup, Dänemark)

Paraffin, TH. Geier GmbH (Renningen, Deutschland)

PBS Dulbecco, Biochrome AG (Berlin, Deutschland)

Penicillin, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

Penicillin/Streptomycin, Sciencell (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

Penicillin/Streptomycin, Sigma-Aldrich (St. Luis, Vereinigte Staaten)

Phosphate-buffered Saline (PBS), PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

Poly-D-Lysin Hydrobromid, Sigma Aldrich (St. Luis, Vereinigte Staaten)

Rabbit polyclonal to CXCR4, ab2074, Abcam (Cambridge, England)

Rabbit polyclonal to GPCR RDC1 (CXCR7), ab72100, Abcam (Cambridge, England)

Roticlear, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

Schwann cell growth supplement, Sciencell (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

Schwann Cell Medium, Sciencell (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

Streptavidin Peroxidase, KPL (Gaithersburg, Vereinigte Staaten)

Tris buffered Saline, ScienCell (Carlsbad, Vereinigte Staaten)

Triton X 100, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Trizma base, Sigma-Aldrich (St. Luis, Vereinigte Staaten)

Tween 20, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Puffer und Lösungen

Citrat-Puffer: 42 g Zitronensäure, 1 L destilliertes Wasser, titriert auf pH 6

PBS-Puffer: PBS Dulbecco + 1 L destilliertes Wasser

Radioimmunpräzipitations-Puffer: Tris 50 mM, Natriumchlorid 150 mM, SDS 0.1 %, Na-Deoxycholat 0.5 %, und NP-40 1 %

Tris buffered saline Puffer (10x): 22 g Trizma base, 87,66 g Natriumchlorid, 1 L destilliertes Wasser

Tris buffered saline Puffer mit Tween: TBS + 0,5 % Tween

Käuflich erwerbliche Kits

Catalyzed Signal Amplification System (Rabbit), Dako (Glostrup, Dänemark)

Quantikine ELISA for human CXCL12, R&D Systems (Minneapolis, Vereinigte Staaten)

Verbrauchsmaterialien

BD Falcon Cell Culture Inserts for 6 well plates mit 3.0 micron high pore density PET (Franklin Lakes, Vereinigte Staaten)

Cell culture dishes, Greiner Bio-one International AG (Kremsmünster, Österreich)

Cell culture flasks, Greiner Bio-one International AG (Kremsmünster, Österreich)

Co-Culture Inserts 1 µm Pore size 6-well: Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

Deckgläser, Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)

Einmal-Injektions-Kanüle, 20G, Braun (Melsungen, Deutschland)

Einmal-Injektions-Kanüle, 23G, Braun (Melsungen, Deutschland)

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

Greiner Cellstar multiwall culture plates, 6 well, Sigma-Aldrich (St. Luis, Vereinigte Staaten)

Injekt Spritzen, Braun (Melsungen, Deutschland)

MagPix Luminex® beads, Merck Millipore (Massachusetts, Vereinigte Staaten)

Pasteur-Pipette, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

PVDF Membran, Merck Millipore (Massachusetts, Vereinigte Staaten)

Safe-Lock Tubes, 1ml, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Serological Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml), Greiner Bio-one International AG (Kremsmünster, Österreich)

Tip One (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) Filter Tip, Starlab (Brüssel, Belgien)

Zellschaber 2-Positionen Klinge 25 mm, Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)

Patienten und Gewebe

Für die Untersuchungen wurden Gewebestücke von Pankreaskarzinompatienten im Rahmen von Pankreasresektionen gesammelt. Alle Patienten wurden über Ihre Teilnahme an klinischen Studien informiert und erklärten sich damit einverstanden. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München (Genehmigungsnummer 1926/07) und von der Ethikkommission der Universität Heidelberg (Genehmigungsnummer 301/2001) genehmigt. Alle Patienten machten präoperativ Angaben über ihr individuelles Schmerzniveau (kein Schmerz 0, milder Schmerz 1, starker Schmerz 2).

Gewebeproben aus gesunden Pankreata konnten von Organspendern, welche keinen medizinischen Einsatz finden konnten, akquiriert werden. Die Gewebesammlung wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg (Genehmigungsnummer 301/2001) und der Ethikkommission der Technischen Universität München (Genehmigungsnummer 1926/07) genehmigt.

Tiere und operatives Prozedere

Um periphere Nerven *in vitro* zu untersuchen, wurden die Spinalganglien aus neugeborenen Ratten in den ersten 14 Tagen nach ihrer Geburt entnommen. Nach der Dekapitation des Tieres wurde der Körper von ventral geöffnet, die Rippen wurden im dorsalen Drittel durchtrennt und die Organe des Brust- und Bauchraumes wurden entnommen. Der Spinalkanal wurde möglichst weit kaudal durchtrennt. Die Wirbelkörper wurden beidseitig am Wirbelbogen abgesetzt. Die nun unter dem Stereomikroskop gut sichtbaren Spinalganglien wurden sowohl medial von den Wurzeln als auch lateral von den Spinalnerven abgesetzt und in MEM-Medium auf Eis gesammelt. Nach der Entnahme aller Ganglien eines Tieres wurden die Spinalganglien mit Hilfe von Mikroscheren und –pinzetten gänzlich von Überresten der Wurzel oder des Spinalnervs befreit.

Zur enzymatischen Zersetzung der Kapsel wurden die Ganglien in einer Lösung aus 900 µl HBSS-medium ohne Kalzium und Magnesium und 100 µl Kollagenase transferiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgte die mechanische Zersetzung durch Aspiration mit immer feineren Nadeln, begonnen mit der Stärke 23 bis zu der Stärke 27 G. Um lebende Zellen von Kapselresten und toten Zellen zu trennen, wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. In der sterilen Werkbank wurde überschüssiges Medium abgenommen, die Zellen in 10 ml Neurobasal-Medium mit Zusatz von 10 % FCS, 2 % B27, 0,5 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert und in Zellkulturschalen oder -flaschen ausgesät.

Zellkultur

Pankreaskarzinomzellen

Die humanen Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, Capan-2, COLO-357, Mia PaCa-2, PANC-1, SU86.86, wurden von ATCC (Rockville/MD) gekauft. T3M4-Zellen wurden von Dr. R. Metzgar (Durham/NC) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden routinemäßig unter Normalbedingungen mit RPMI Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden in der sterilen Werkbank verrichtet.

Kolonkarzinomzellen

Die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 wurde unter Normalbedingungen mit McCoy's 5A-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Kolonkarzinomzelllinien wurden von Prof. Dr. K. P. Janssen (TUM) zur Verfügung gestellt.

Humane Schwannsche Zellen

Die humanen Schwannschen Zellen wurden von der Firma ScienCell (Carlsbad, CA, Vereinigte Staaten) aus humanen Spinalnerven isoliert, nach der 1. Passage kryokonserviert und in unser Labor verschickt. Die Schwannschen Zellen wurden unter Normalbedingungen mit Schwann-Zell-Medium mit 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % Schwann Cell Growth Serum in Flaschen bzw. Platten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Neurone

Die aus murinen Spinalganglien gewonnenen Neurone wurden unter Normalbedingungen mit Neurobasal-Medium mit Zusatz von 10 % FCS, 2 % B27, 0,5 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin auf Poly-D-Lysin beschichteten Flaschen bzw. Platten im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Hypoxie

1 Million humane Schwannsche Zellen wurden in Poly-D-Lysin beschichteten 10 cm Platten ausgesät. Nach 12 h erfolgte ein Mediumwechsel zu serumfreiem Schwannzellmedium. 1 Stunde nach dem Mediumwechsel wurde die Hypoxie-Exposition gestartet. In einer Hypoxiekammer wurden die Platten nach 5 Minuten Dauer-CO₂-Zufuhr für verschiedene Hypoxie-Zeitpunkte bei 37 °C kultiviert. Am Ende der gewünschten Hypoxie-Dauer wurden die Überstände entnommen, für 5 Minuten bei 1000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet verworfen. Die Zellen wurden zur Gewinnung von Proteinlysaten erst mit PBS gewaschen und dann mit RIPA-Puffer lysiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Chemotaxis Assay

Chemotaxis Assay mit CXCL12-Antikörper MAB310 (R&D Systems), CXCR4 Inhibitor AMD3100 (Tocris) und CXCR7-neutralisierender Antikörper 9C4 (MBL)

Zur Durchführung eines Chemotaxis Assays wurden 5.000 humane Pankreaskarzinomzellen (T3M4 oder Mia PaCa-2) je Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Sollte CXCL12 untersucht werden, wurde mit Schwann-Zell-Medium mit Zusatz von 0, 1, 5 oder 10 µl CXCL12 Antikörper MAB310 je 1 ml Medium kultiviert. Nach ca. 2 h (zu diesem Zeitpunkt konnte von der Adhärenz aller lebender Zellen ausgegangen werden) erfolgte je Well die Zugabe eines BD Cell Culture Inserts mit 3 µm großen Poren. In diese wurden je Insert 1.000 Schwannsche Zellen in Schwann-Zell-Medium gesät. Sollte CXCR4 oder CXCR7 untersucht werden, wurden die Zellen mit Schwann-Zell-Medium mit Zugabe von 0, 0,25, 0,5 und 1,25 µg CXCR4-Inhibitor AMD 3100, respektive von 0, 10, 30 µg CXCR7 Inhibitor 9C4 je 1 ml Medium kultiviert. Es erfolgte die Kultivierung unter Normalbedingungen für 21 h. Nach 21 h wurden die Inserts entnommen und die Innenseite mit Wattestäbchen gereinigt. Hierdurch konnte von der mechanischen Destruktion und Lösung nicht auf die Gegenseite migrierter Zellen ausgegangen werden. Nach Waschschritten wurden die Inserts in 4 % Paraformaldehyd fixiert, wiederum gewaschen, mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:2000)

angefärbt und mit Fluorescence Mounting Medium fixiert. Es erfolgte hiernach die Auszählung der Zellen, welche sich auf der Außenseite des Inserts gesammelt hatten, die also migriert hatten, unter dem Mikroskop.

Migration Assay

Zur Durchführung eines Migration Assay wurden 100.000 Zellen der T3M4 Pankreaskarzinomzelllinie, und je 50.000 humane Schwannsche Zellen oder murine Neurone im extrazellulären Matrix/ECM-Gel suspendiert, und im Abstand von ungefähr 1 mm auf die Böden von 3,5 cm Kulturschalen aufgetragen. Danach wurden sie 20 min inkubiert, so dass das Gel polymerisieren konnte. Danach wurden zwischen die Zell-Gel-Gemische „Brücken“ aus reinem Gel aufgetragen. Nach erneuter Inkubation wurden die Präparate mit Neurobasalmedium (falls keine Neurone, sondern nur Schwannsche- und Tumorzellen verwendet wurden mit Schwanzzellmedium) bedeckt und unter Normalbedingungen inkubiert. Nach 120 h wurden die Wells unter dem Mikroskop positioniert. Es erfolgte die Time-lapse-mikroskopische Dokumentation in den Bereichen von Interesse im Abstand von 5 min mit einem inversen Mikroskop, das zusätzlich mit einer CCD-Kamera ausgestattet war. Die Bewegung der Zellen wurde für 12 h verfolgt.

Ko-Kultur

Für die Kultivierung der humanen Schwannschen Zellen oder murinen peripheren Neuronen in Ko-Kultur mit Pankreaskarzinomzellen wurden 300.000 Schwannsche Zellen pro Well in Poly-D-Lysin beschichteten 6-Well-Platten ausgesät. Im Falle der Neurone wurden alle Zellen, die aus einer Ratte gewonnen wurden, auf 6 Wells einer Poly-D-Lysin beschichteten 6-Well-Platte verteilt. Nach 24 Stunden Kultivierung unter Normalbedingungen wurde ein PBS-Waschschritt durchgeführt und die Schwannschen Zellen durch Verwendung von Ko-Kultur-Inserts mit einer Porengröße von 1 μm mit je 200.000

Karzinomzellen in serumfreiem Medium kultiviert. Im Falle von Schwannschen Zellen handelte es sich hierbei um Schwann-Zell-Medium, im Falle von Neuronen um Neurobasal-Medium. Dabei wurden bei jedem Experiment auch Schwannsche Zellen/Neurone als Negativkontrolle einzeln kultiviert. 24, 48 und 72 h nach Beginn der Exposition zu Karzinomzellen wurden die Ko-Kultur-Inserts entfernt, die Überstände in Reagenzgefäße überführt, sowohl Platte als auch Inserts mit PBS gewaschen und auf Eis mit Radioimmunopräzipitations (RIPA)-Puffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers lysiert. Die so gewonnenen Proteinlysate und Überstände wurden bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Immunhistochemie

Immunhistochemie zum Nachweis von CXCL12, CXCR4 und CXCR7

Das Patientengewebe wurde nach Entwässerung in Paraffinblöcke eingebettet und zu 3 µm dicken Schnitten verarbeitet. Diese wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe gefolgt von destilliertem Wasser rehydriert. Nach einem Waschschrift in TBS-Puffer wurde die Detektierbarkeit intrazellulärer Antigene durch 15-minütiges Erhitzen im Citrat-Puffer und 5-minütige Inkubation in 0,5 % Triton X-100 (verdünnt mit PBS) erhöht. Zwischen diesen Schritten lag ein Waschschrift. Nach einem Waschschrift wurde Peroxidase-Aktivität durch 5-minütige Behandlung mit 3 % Wasserstoffperoxid, verdünnt mit Methanol, geblockt.

Im Fall von CXCL12 und CXCR4 wurden die Schnitte daraufhin für 1 h mit normalem Ziegen Serum (Normal Goat Serum) inkubiert. Danach wurden die Schnitte bei 4 °C über Nacht mit Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper Anti-CXCL12 (R&D-Systems, MAB350) wurde mit Dako Antibody Diluent auf 1:750 verdünnt. Negativkontrollen wurden mit nicht-immunosensibilisierten IgG1 Mäuse Antikörpern in derselben Konzentration inkubiert. Der Primärantikörper Anti-CXCR4 (Abcam, ab2074) wurde mit Dako Antibody Diluent auf 1:50 verdünnt. Negativkontrollen wurden mit nicht-immunosensibilisierten IgG Hasen Antikörpern in derselben Konzentration inkubiert.

CXCR7 wurde mit dem CSA Kit dargestellt. Es erfolgte die Inkubation der Schnitte für 5 Minuten mit Proteinblock-Lösung aus dem Kit anstelle des normalen Ziegenerums. Als Nächstes wurden die Schnitte für 15 Minuten mit Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper Anti-RDC1 (Abcam, ab72100) wurde mit Dako Antibody Diluent auf 1:600 verdünnt. Negativkontrollen wurden mit nicht-immunosensibilisierten IgG Hasen Antikörpern in derselben Konzentration inkubiert.

Nach Waschschritten erfolgte die Inkubation mit KPL anti-mouse (für CXCL12), respektive Dako anti-rabbit Antikörper (für CXCR4 und CXCR7) für 1 h (für CXCR7 15 Minuten).

Für CXCR7 folgten Waschschritte und die Inkubation mit einer Streptavidin-Biotin-Lösung aus dem Kit für 15 Minuten. Im nächsten Schritt wurde gewaschen und danach wurden die Schnitte mit einem Amplifikations-Reagenz aus dem Kit für 15 Minuten inkubiert. Darauf folgten Waschschritte und die Inkubation mit der Streptavidinperoxidase-Lösung des Kits für 15 Minuten.

Für CXCL12 und CXCR4 folgten Waschschritte und die Inkubation in Streptavidin-Peroxidase von KPL für 30 Minuten, weitere Waschritte und schließlich die Farbentwicklung mit DAB-Puffer in allen Protokollen. Die Farbentwicklung wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Nach anschließender Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe gefolgt von Entwässerung mittels Roticlear wurden die Schnitte mit Mounting-Medium eingedeckt.

Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden unter Normalbedingungen auf Immunfluoreszenz-Slides ausgesät und über Nacht im Inkubator bebrütet. Am nächsten Tag folgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd für 15 Minuten.

Das Patientengewebe wurde nach Entwässerung in Paraffinblöcke eingebettet und zu 3 µm dicken Schnitten verarbeitet. Diese wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe gefolgt von destilliertem Wasser rehydriert.

Das weitere Prozedere gilt für Zellen und Gewebe gleichermaßen. Nach einem weiteren Waschschritt in PBST wurde die Detektierbarkeit intrazellulärer Antigene durch 10-minütige Inkubation in

0,5 % Triton X-100 (verdünnt in TBS) erhöht. Anschließend folgte ein Waschschrift. Daraufhin wurden die Schnitte für 45 Minuten mit Normal Goat Serum geblockt. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper ab2074 (Anti-CXCR4) wurde mit Dako Antibody Diluent auf 1:50 verdünnt. Negativkontrollen wurden mit nicht-immunosensibilisierten IgG Antikörpern in derselben Konzentration inkubiert. Nach Waschschriften erfolgte die Inkubation mit Alexa® 488 anti-rabbit Antikörper in der Verdünnung 1:200 und Hoechst-Kernfärbung in der Verdünnung 1:1000 (beide verdünnt mit Dako Antibody-Diluent) für 45 Minuten. Darauf folgten Waschschriften und die Fixierung mit Immunfluoreszenz-mounting-Medium.

Immunoblot

Um Standard-Proteinlysate aus Zellen zu gewinnen wurden diese unter Normalbedingungen kultiviert und auf den Moment gewartet, zu dem die Zellen einen 75 % bis 100 % konfluenten Zellrasen gebildet hatten. Das normale Medium wurde entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dies wieder entfernt. Danach wurden die Zellen auf Eis mit Radioimmunopräzipitations-Puffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers lysiert. Die Lysate wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Der Proteingehalt wurde direkt vor Verwendung mit Hilfe des BCA-protein-assay ermittelt. Jeweils 30 µg Protein der Proteinlysate wurden in einem 7,5-prozentigem Trenngel aufgetrennt und in semitrockener Technik auf eine PVDF-Membran transferiert. Das Blocken erfolgte mit 7,5-prozentiger Milch. Die Erstantikörper inkubierten über Nacht bei 4 °C. Als Waschlösung wurde Milchpulver in destilliertem Wasser mit 0,1 % Tween-20 verwendet. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper, Maus bzw. Kaninchen, wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur bei einer Verdünnung von 1:2000 inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit ECL-Chemilumineszenz-Reagenz.

Folgende Antikörper wurden im Rahmen der Immunoblot-Analysen verwendet:

CXCR4: abcam, ab2074, 1:1000 Kaninchen

CXCR7: abcam, ab72100, 1:200 Kaninchen

GAPDH: santa cruz, sc32233, 1:5000 Maus

Donkey-Anti-rabbit, GE-Healthcare, NA9340V, 1:2000

Goat anti-Mouse IgG-HRP, santa cruz, sc2005, 1:2000

ELISA

Das ELISA wurde mit dem ELISA Kit für CXCL12 von R&D Systems nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Antikörper bzw. small molecule Inhibitoren:

Antigen	Methode	Katalog Nr.	Firma	Konzentration	Spezies
CXCL12	Chemotaxis Assay	MAB310	R&D Systems	1, 5, 10 µl/ml	Maus
CXCL12	Immunhistochemie	MAB350	R&D Systems	1:750	Maus
CXCR4	Chemotaxis Assay	AMD3100	Tocris	0,25, 0,5, 1,25 µg/ml	
CXCR4	Immunhistochemie	ab2074	Abcam	1:50	Kaninchen
CXCR4	Immunfluoreszens	ab2074	Abcam	1:50	Kaninchen
CXCR4	Immunoblot	ab2074	Abcam	1:1000	Kaninchen
CXCR7	Chemotaxis Assay	K0223-3	MBL	10, 30 µg/ml	Maus
CXCR7	Immunhistochemie	ab72100	Abcam	1:600	Kaninchen
CXCR7	Immunoblot	ab72100	Abcam	1:200	Kaninchen

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch Verwendung der GraphPad Prism 4-8 und der Ibbidi Software. Bei Analysen von mehr als zwei Gruppen kamen der one-way-ANOVA sowie der Bonferroni-post-hoc-Test, oder Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von dem Dunn's Vergleich Test, zum Einsatz. Zwei-Gruppen-Analysen wurden durch Verwendung des Mann-Whitney-U-Test oder des unabhängigen t-Test ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts ausgedrückt. Errechnet wurden immer die zweiseitigen P-Werte. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Die Expression und Lokalisation von CXCR4 und CXCR7 im Pankreas

Obwohl mehrere Studien eine Überexpression von CXCR4 im Pankreaskarzinomgewebe zeigten (Domanska et al. 2012; Sun et al. 2010; Graham et al. 2012; Burns et al. 2006; Monnier et al. 2012; Hao et al. 2012; Heinrich et al. 2012; Zhi et al. 2012; Rogers et al. 2006), gab es keine Studie, welche die Verteilung von CXCL12 mit seinen beiden Rezeptoren in Gewebeproben von humanem gesundem Pankreas und Pankreaskarzinomen untersuchte. Daher erfolgte primär die immunhistochemische Färbung von CXCL12, CXCR4 und CXCR7 in Pankreaskarzinomgewebeproben und gesundem pankreatischem Gewebe.

CXCR4 und CXCR7 sind in gesundem pankreatischem Gewebe hauptsächlich in Azini und duktalem Zellen nachweisbar. Im Pankreaskarzinomgewebe reagierten vor allem die Tumorzellen auf Antikörper der beiden Rezeptoren. Allerdings war beachtlich, dass sowohl in gesundem Gewebe als auch im Pankreaskarzinom intrapankreatische Nerven stark auf CXCR4- und CXCR7-Antikörper reagierten (Abbildung 1).

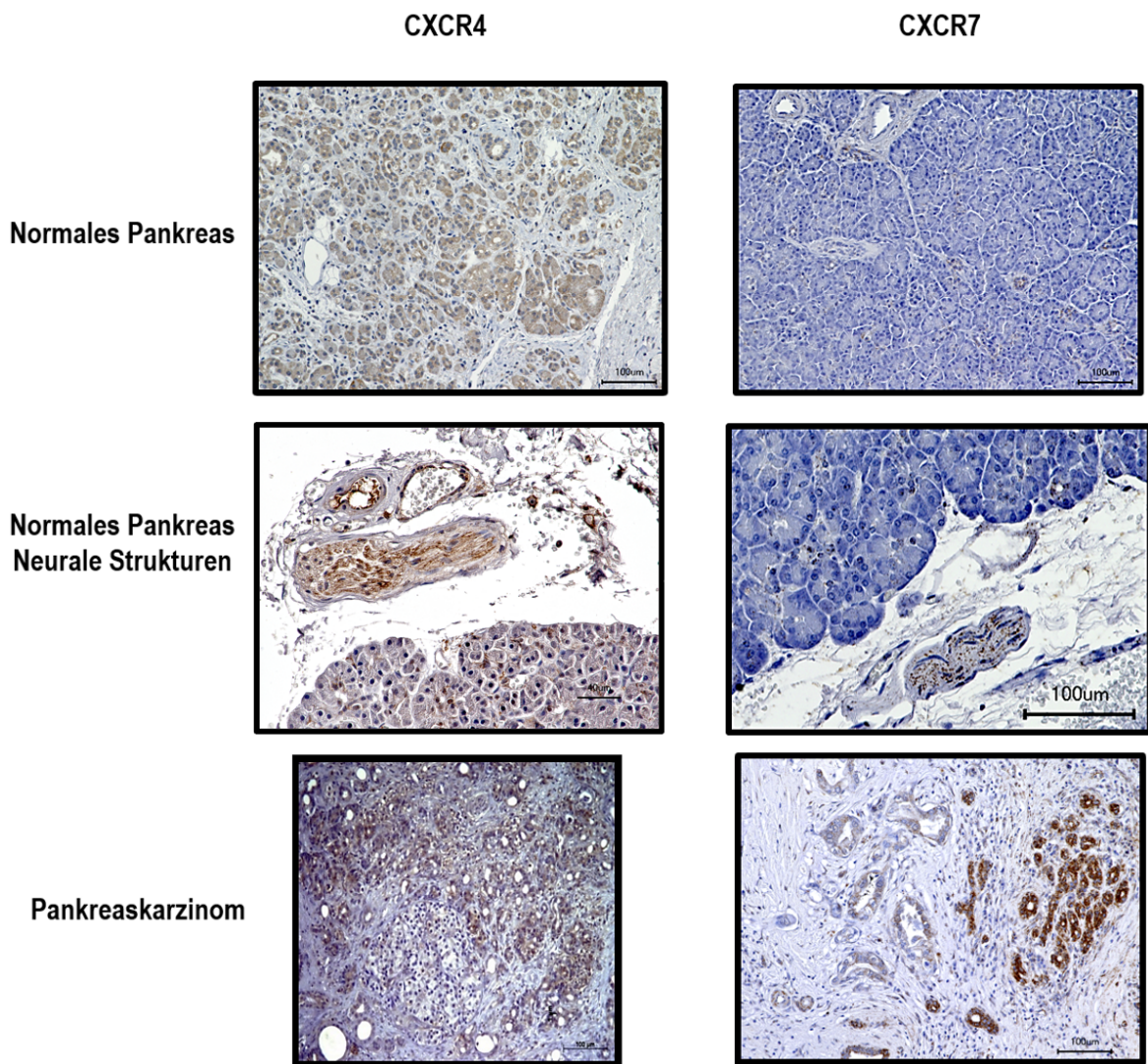
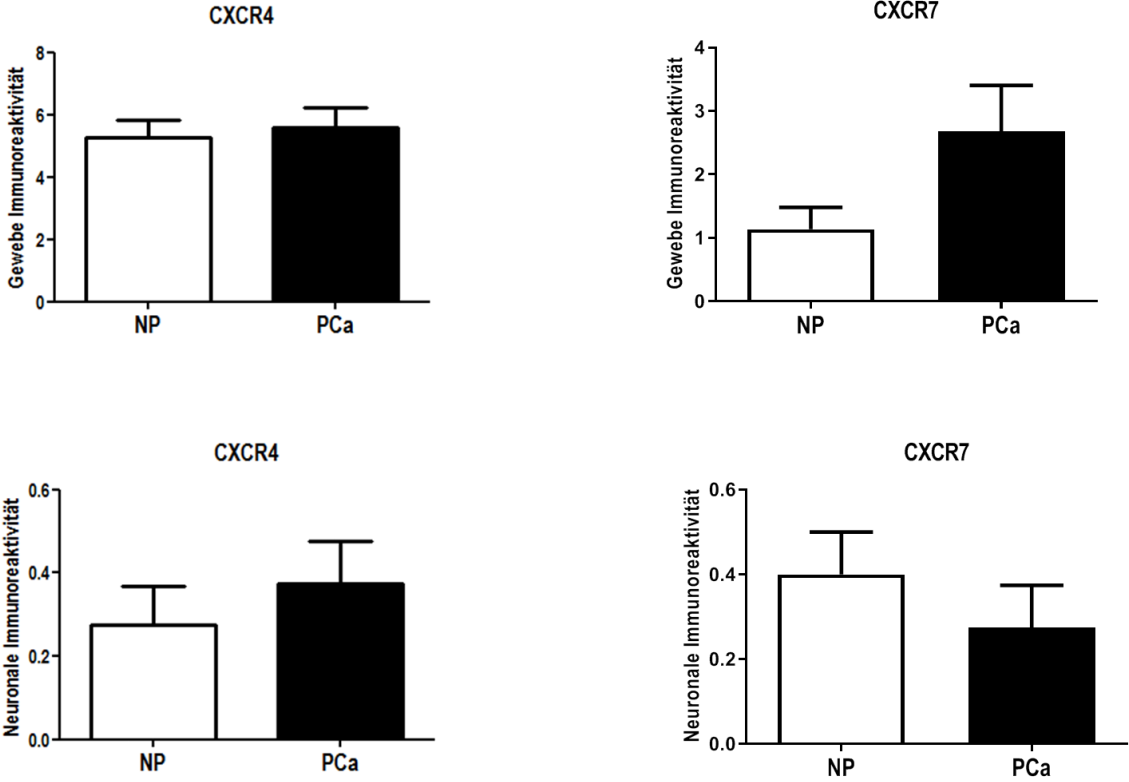


Abbildung 1: Immunhistochemischer Nachweis der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 im gesundem Pankreas, im Pankreaskarzinom sowie in neuralen Strukturen. Im gesunden Pankreas zeigte sich eine geringe Immunoreaktivität in Azini und duktalem Zellen. Im Pankreaskarzinom ließen sich die Rezeptoren in Tumorzellen nachweisen. Sowohl in gesundem als auch in Karzinomgewebe zeigten neurale Strukturen eine starke Immunoreaktivität.

Es erfolgte die semiquantitative Analyse, bei welcher die Immunoreaktivität des mit CXCR4/CXCR7 gefärbten Gewebes, bzw. der neuralen Strukturen (Nerven und Ganglien) zwischen gesundem und Pankreaskarzinom-Gewebe verglichen wurde. Es zeigte sich keine signifikanten Differenzen (CXCR4 Gewebe Immunoreaktivität NP: $5,2 \pm 0,5$ %, PCa: $5,5 \pm 0,6$ %; CXCR7 Gewebe Immunoreaktivität NP:

1,1 ± 0,3 %, PCa: 2,7 ± 0,7 %; CXCR4 Neuronale Immunoreaktivität NP: 0,27 ± 0,1 %, PCa: 0,37 ± 0,1 %; CXCR7 Neuronale Immunoreaktivität NP: 0,4 ± 0,1 %, PCa: 0,27 ± 0,1 % (Abbildung 2 A-C).

A



B

CXCR4

	Azini	azinäre Atrophie	Gang	Tubuläre Komplexe	Inseln	Gefäße	Nerven	Ganglion	Krebszellen	ECM	Immunzellen	Gesamtwert
NP												
M198	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	2.00	7.00
M644	2.00	0.00	2.00	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	2.00	9.00
M150	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	x	0.00	0.00	2.00	5.00
M2212	1.50	0.00	1.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	5.50
M267	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	2.00
M1229	1.50	0.00	1.50	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	2.00	6.00
M282	0.50	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	3.50
M296	1.50	0.00	1.50	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	2.00	6.00
M283	1.00	0.00	1.00	0.00	0.50	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	2.00	5.00
M690	1.00	0.00	1.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	4.50
Durchschnitt	1,10		1,15		0,55	0,00	0,35			0,00	2,00	4,46
Pca												
HD765	1,50	1,50	1,50	1,50	0,50	0,00	0,50	0,50	1,50	0,00	2,00	11,00
HD176	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,50	1,50	0,00	2,00	6,50
HD151	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	2,00	6,00
HD280	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	4,00
HD112	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	3,50
HD242	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	2,00	0,00	1,50	5,00
HD148	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,50	0,00	0,00	0,00	2,50
HD646	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	2,00	0,00	1,50	4,00
HD653	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	0,00	3,00
HD464	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	0,00	2,50
HD78	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	0,00	0,50	0,00	2,00	0,00	2,00	9,00
HD502	0,50	1,00	0,50	1,00	0,50	0,00	0,50	0,00	1,50	0,00	2,00	7,50
HD698	0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	1,00	0,00	2,00	5,50
M334	1,50	1,50	1,50	1,50	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	8,50
Durchschnitt	0,50		0,50	0,46	0,32	0,00	0,39		1,18	0,00	1,36	5,38

C

CXCR7

	Azini	Gang	Inseln	Gefäße	Nerven	Ganglion	Krebszellen	ECM	Immunzellen	Gesamtwert
NP										
BP1576	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	x	x	0,00	0,00	0,00
HD1516-2	1,50	1,00	0,00	0,00	0,50	x	x	0,50	0,50	2,50
HD256-1	0,50	0,00	0,00	0,00	1,00	x	x	0,00	0,00	1,00
HD1303	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	x	x	0,00	0,00	0,50
BP442	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00	x	0,00	1,00	2,50
HD388-6	0,50	0,00	0,00	0,50	0,50	0,50	x	0,00	0,00	1,50
HD1768-1	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	x	x	1,00	0,00	1,50
BN1005	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	x	0,00	0,00	0,00
HD846-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	x	0,00	0,00	0,00
HD1611-2	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	x	x	0,00	0,00	0,00
Durchschnitt	0,50	0,10	0,00	0,05	0,40	0,75	x	0,15	0,15	3,00
PCa										
HD282-1	x	x	x	0,00	1,00	x	0,50	0,00	0,00	1,50
HD1650-1	x	x	x	0,00	0,00	x	0,50	0,50	1,00	2,00
BP2422	0,00	0,50	x	0,00	0,00	x	0,50	1,00	2,00	4,00
3824/09	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	1,00	2,00
HD644-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	x	0,50	1,00	2,00	4,00
HD502-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	x	0,00	0,00	0,00	0,00
HD599-1	x	x	x	0,00	0,00	x	0,00	0,00	0,00	0,00
HD176-1	x	x	x	0,00	0,50	x	0,00	0,50	1,00	2,00
HD545-1	x	x	x	0,00	0,00	x	1,00	1,00	2,00	4,00
HD562-1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	x	0,00	0,50	1,00	2,00
HD1642-1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	x	0,50	1,50	3,00	6,00
HD151	x	x	x	0,00	0,00	x	0,00	0,00	0,00	0,00
HD746-1	x	x	x	0,00	1,50	x	1,50	3,00	6,00	12,00
HD484-1	x	x	x	0,00	0,00	x	1,50	1,50	3,00	6,00
HD257-1	x	x	x	00001	0,50	x	1,00	2,00	4,00	8,00
HD263	x	x	x	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	4,00	8,00
Durchschnitt	0,00	0,17	0,00	0,03	0,34	1,00	0,47	0,59	1,18	2,15

Abbildung 2 A-C: Semiquantitative Analyse der Immunreaktivität des gesunden Pankreas und Pankreaskarzinomgewebes auf CXCR4- und CXCR7-Antikörper. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von CXCR4 und CXCR7 in gesundem und Pankreaskarzinomgewebe in der semiquantitativen Analyse der Immunhistochemie. Auch für neuronale Strukturen wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression von CXCR4 und CXCR7 in gesundem und im Pankreaskarzinomgewebe festgestellt.

Expression der Rezeptoren in humanen Schwannschen Zellen

Nachdem die Rezeptoren, CXCR4 und CXCR7, in pankreatischem Gewebe in neuronalen Strukturen nachgewiesen wurden, war von Interesse welche neuronalen Strukturen CXCR4 exprimieren. Es erfolgte

daher die Immunofluoreszenz-Färbung des Rezeptors in humanen Schwannschen Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Expression mit Verteilung des Rezeptors entlang des Zytoskeletts (Abbildung 3).

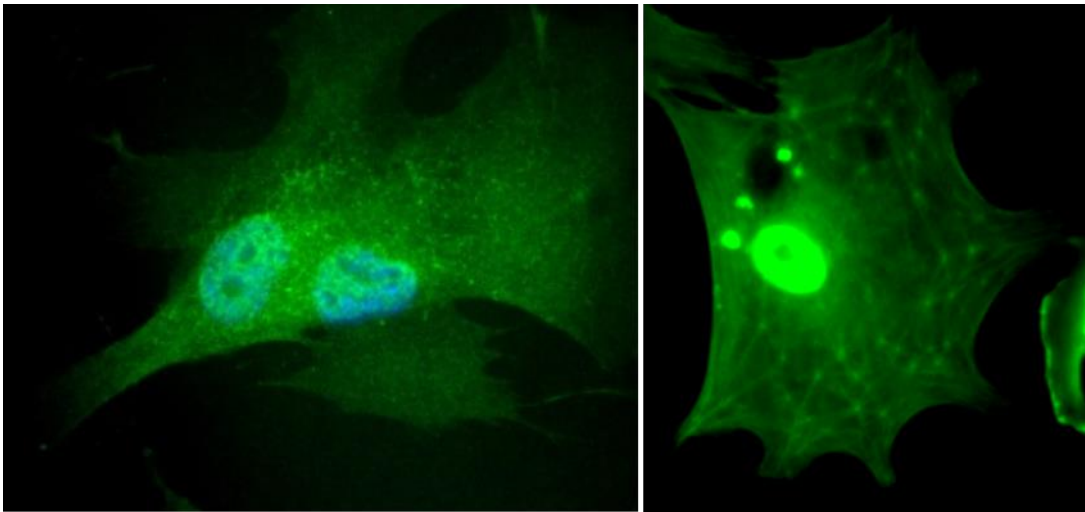


Abbildung 3: Immunofluoreszenz Färbung von CXCR4 in humanen Schwannschen Zellen. Im linken Bild sind Zellkerne mit DAPI markiert. CXCR4 zeigt eine Verteilung entlang des Zytoskeletts der Schwannschen Zelle.

Rezeptorexpression in Zusammenhang mit Schmerz

Ein kennzeichnendes Merkmal des Pankreaskarzinoms sind ausgeprägte neuropathische Schmerzen. Um die Zusammenhänge zwischen dem Schmerzempfinden der Patienten und der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse zu untersuchen, wurden Pankreaskarzinomgewebeprouben gefärbt, welche vor Entnahme mit Patientenfragebögen anhand des Schmerzempfindens klassifiziert wurden. Eine Verminderung der Immunoreaktivität für CXCR7 sowie für CXCR4 im Gewebe, bzw. in den intrapancreatischen Nerven von Patienten mit Schmerzen im Vergleich zu Patienten ohne Schmerzen wurde dargestellt (Gewebe-Immunoreaktivität für CXCR4 Schmerz vs. kein Schmerz $p=0,27$, kein Schmerz: $6,2 \pm 1,3$ %, Schmerz: $4,9 \pm 0,8$ %; Gewebe Immunoreaktivität für CXCR7 Schmerz vs. kein Schmerz $p=0,067$, kein Schmerz: $4,0 \pm 1,1$ %, Schmerz: $1,3 \pm 0,4$ %; Neuronale Immunoreaktivität für CXCR4 Schmerz vs. kein Schmerz $p= 0,12$, kein Schmerz: $0,5 \pm 0,3$ %, Schmerz: $0,02 \pm 0,01$ %;

Neuronale Immunoreaktivität für CXCR7 kein Schmerz vs. Schmerz $p=0,05$, kein Schmerz: $0,4 \pm 0,1$ %, Schmerz: $0,05 \pm 0,05$ % (Abbildung 4).

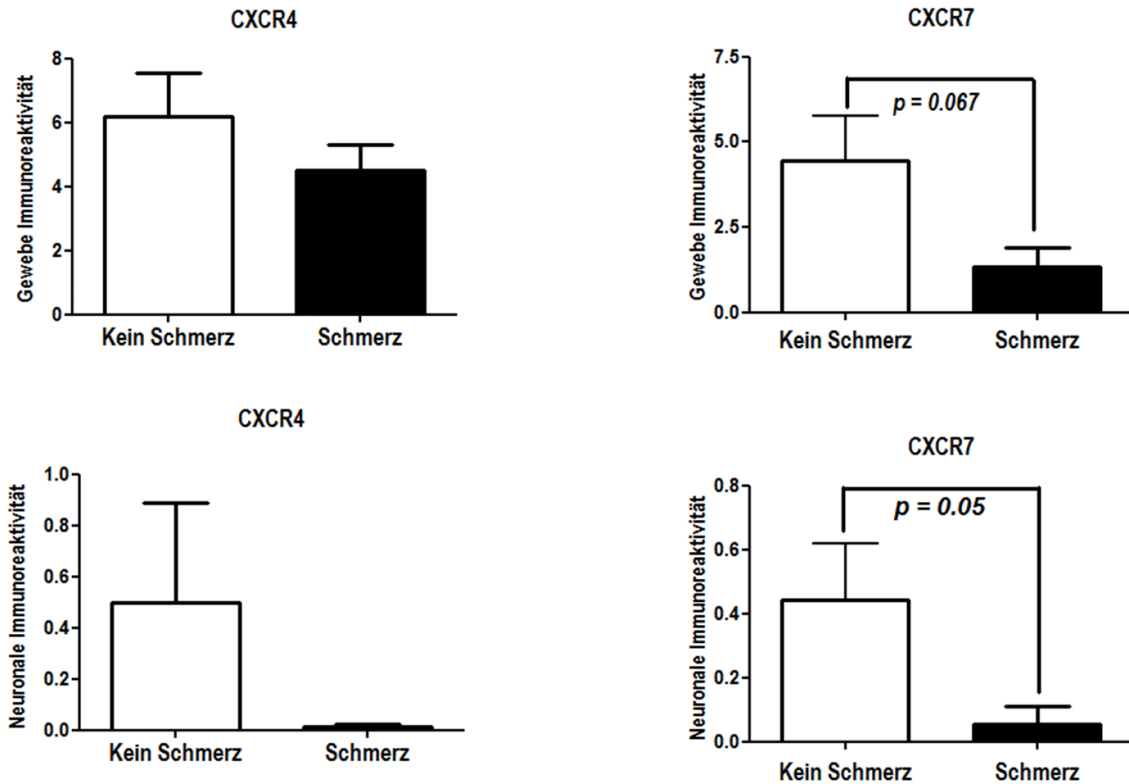


Abbildung 4: Semiquantitative Analyse der Immunoreaktivität für CXCR4 und CXCR7 in Pankreaskarzinomgewebe mit neuropathischen Schmerzen und ohne neuropathische Schmerzen. Es zeigt sich in der semiquantitativen Analyse der Immunoreaktivität für CXCR4 und CXCR7 eine teils signifikante Abnahme der Expression der Rezeptoren in Nerven aus Gewebe von Patienten mit Schmerzen.

Histopathologische Verteilung von CXCL12

Das Verteilungsmuster des Liganden, CXCL12, im Gewebe präsentierte sich grundsätzlich unterschiedlich. In Pankreaskarzinomgewebe zeigt sich eine breit gefächerte Immunoreaktivität von CXCL12 in Tumorzellen, PanINs und duktalem Zellen. Nerven zeigten nur eine schwache

Immunoreaktivität für CXCL12. In gesundem pankreatischem Gewebe wurde nur in duktalem Zellen und Inselzellen eine geringe Immunoreaktivität für CXCL12 nachgewiesen (Abbildung 5 und 6).

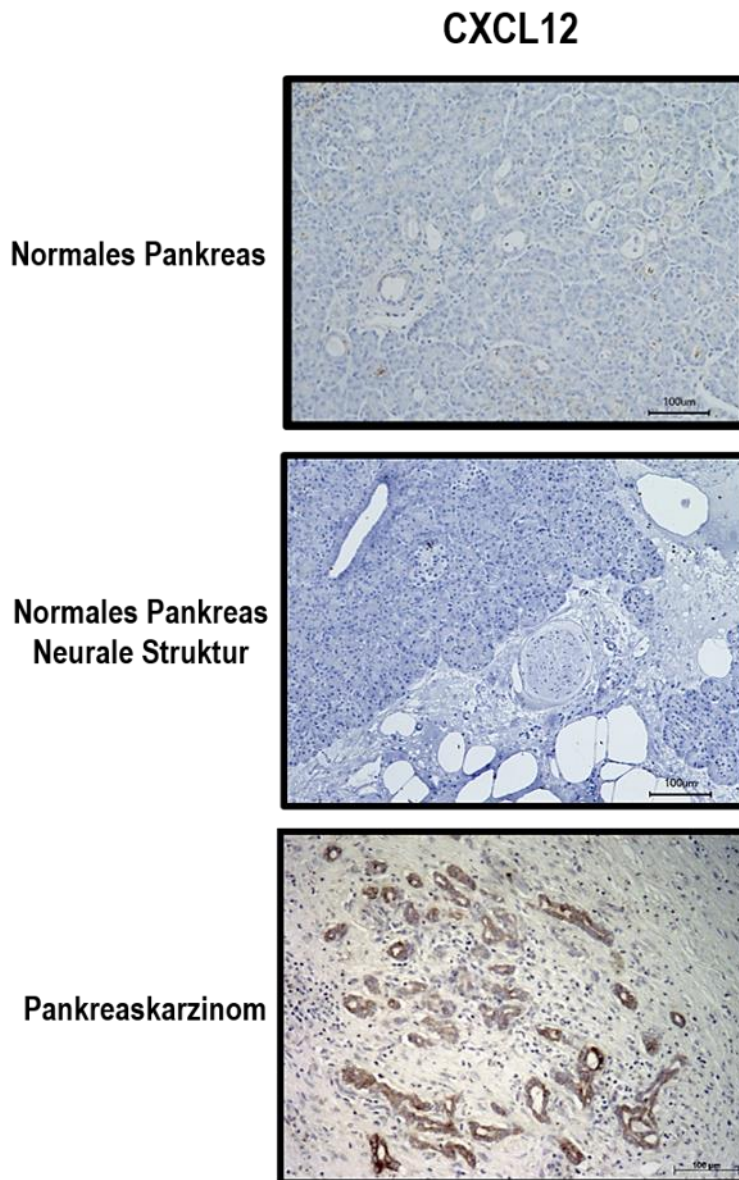


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von CXCL12

CXCL12 ist im gesunden Pankreas schwach in duktalem- und Inselzellen nachweisbar. In Karzinomgewebe ist CXCL12 stark in den Tumorzellen exprimiert.

CXCL12

Gewebe	Azini	Azinäre Atrophie	Gang	Tubuläre Komplexe	Inseln	Gefäße	Nerven	Ganglion	PanIN 1	PanIN 1B	PanIN 2	PanIN 3	Krebszellen	ECM	Immunzellen	Gesamtwert
NP																
BD 2376	0.0	X	0.5	X	0.5	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	1.0
HD 1413-1	0.0	X	0.0	X	0.5	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.5
BN 2016	0.0	X	0.0	X	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.0
HD 1242-1	0.0	X	0.0	X	1.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	1.0
HD 1207-1	0.0	X	0.0	X	0.5	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.5
HD 804-1	0.0	X	0.0	X	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.0
HD 1234-3	0.0	X	0.0	X	0.5	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.5
HD 1434-1	0.0	X	0.0	X	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.0
HD 1417-1	0.0	X	0.0	X	1.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	1.0
HD 1611-2	0.0	X	0.0	X	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.0
BN 1245 F	0.0	X	0.0	X	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.0
BN 1309F	0.0	X	0.0	X	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.0
BN 1608	0.0	X	0.5	X	0.5	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	1.0
HD 2024-1																
Durchschnitt	0.0	X	0.1	X	0.4	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	0.5
PCa																
HD 282-1	0.0	0.5	0.5	0.5	X	0.0	0.0	X	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	2.5
BP 2422	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	X	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	3.0
HD 653-1	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	X	X	X	X	X	X	0.0	0.0	1.5
HD 502-1	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	X	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	2.5
3824/09	0.0	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.0	0.0	4.5
HD 562-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
26806/04	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0
22915/03	0.5	0.5	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	X	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.0	0.0	5.5
HD 555-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	X	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3173/09	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	X	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5
17259/09	0.0	0.5	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	X	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.0	12.5
15754/09	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	X	0.5	0.5	0.5	1.0	1.5	0.0	0.0	7.0
17329/09	0.0	0.5	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	5.0
Durchschnitt	0.0	0.3	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.5	0.5	0.8	0.0	0.0	3.7

Abbildung 6: Semiquantitative Analyse der Verteilung von CXCL12 im gesundem pankreatischem Gewebe und im Pankreaskarzinom. Im Tumorgewebe zeigte CXCL12 eine breite Verteilung in malignen Zellen als auch in physiologischen Strukturen, wobei sich die stärkste Immunreaktivität in Krebszellen findet. In gesundem pankreatischem Gewebe war CXCL12 in duktalem- und Inselzellen nachweisbar.

Kohärent zu der Untersuchung der Rezeptoren erfolgte nun auch für den Liganden die semiquantitative Analyse. Aufgrund der starken Immunoreaktivität von CXCL12 in Tumorzellen zeigte sich die Gesamt-Immunoreaktivität im Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe deutlich erhöht (CXCL12 Gewebe Immunoreaktivität von gesundem Gewebe vs. Karzinomgewebe $p = 0,0022$, normaler Pankreas: $0,4 \pm 0,1$ %, Pankreaskarzinom: $3,6 \pm 0,9$ %) (Abbildung 7).

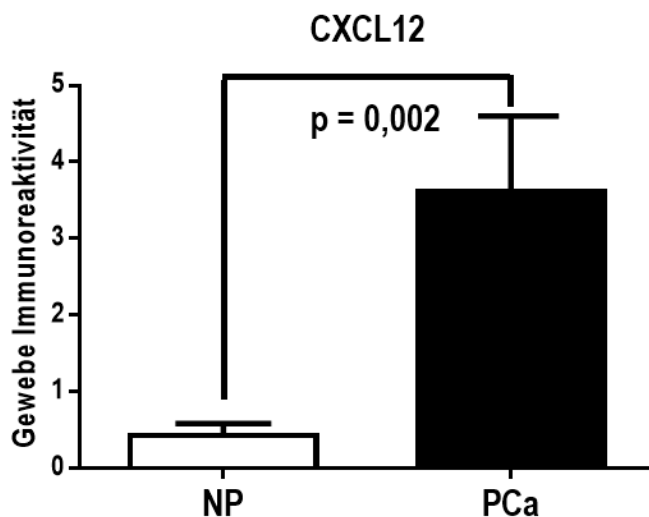


Abbildung 7: Semiquantitative Analyse der Immunoreaktivität von CXCL12 in gesundem pankreatischem Gewebe und im Pankreaskarzinom. Die semiquantitative Analyse der CXCL12 Expression zeigt eine signifikante Überexpression von CXCL12 im Pankreaskarzinomgewebe.

Ligandenexpression in Zusammenhang mit Schmerz

Ebenfalls kohärent zu den Rezeptoren erfolgte auch für den Liganden die immunhistochemische Färbung von Gewebeproben, welche zuvor nach dem Schmerzempfinden der Patienten unterteilt worden waren. Es zeigte sich keine signifikante Differenz in der Expression (CXCL12 Gewebe Immunoreaktivität Pankreaskarzinom mit Schmerz vs. ohne Schmerz p 0,6; kein Schmerz: $2,8 \pm 1,5$ %, Schmerz: $2,3 \pm 0,3$ %) (Abbildung 8).

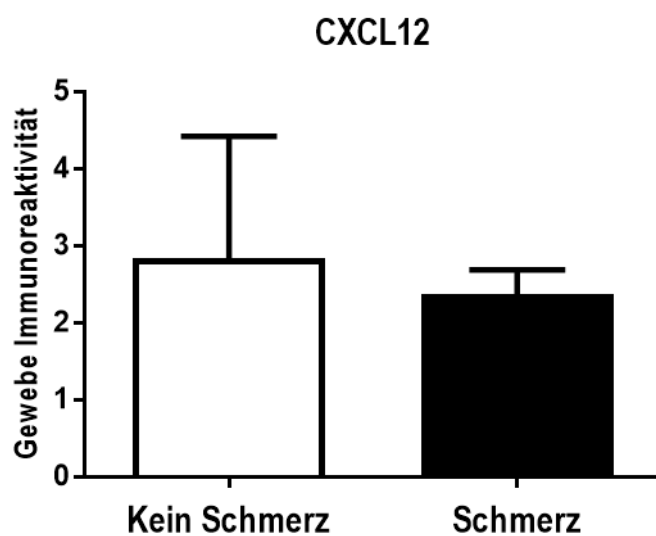


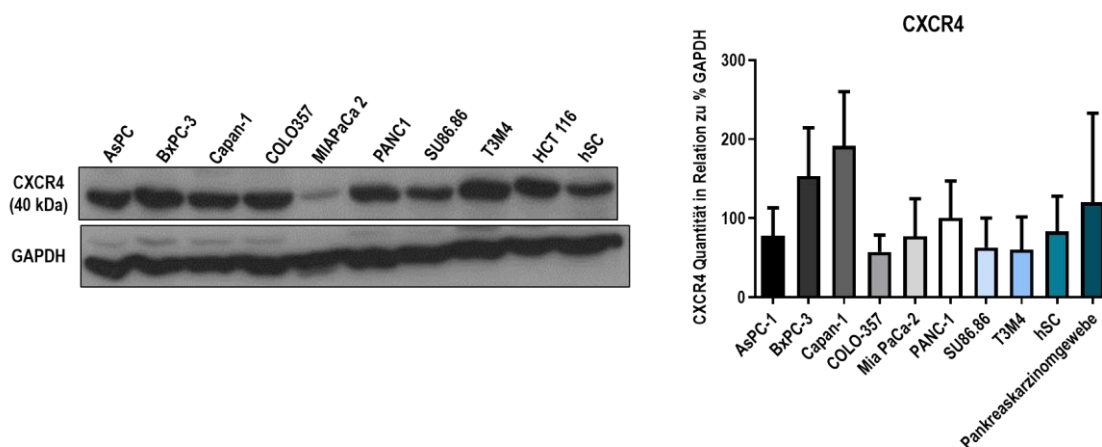
Abbildung 8: Semiquantitative Analyse der CXCL12 Expression in Bezug auf das Schmerzempfinden der Patienten. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von CXCL12 und dem Schmerzempfinden der Patienten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Immunhistochemie eine signifikante Hochregulation der Expression von CXCL12 im Pankreaskarzinomgewebe. Intrapankreatische Nerven im gesunden Pankreas als auch im Pankreaskarzinomgewebe enthalten CXCR4 und CXCR7. In Pankreaskarzinomgewebe von Patienten mit Schmerzen wird signifikant weniger CXCR4 und CXCR7 exprimiert als in Proben von Patienten ohne Schmerzen.

Quantitative Rezeptorexpression in Zelllinien

Um die bisher erworbenen Ergebnisse zu verifizieren, erfolgte die Immunoblot-Analyse beider Rezeptoren in Zellkulturlysaten. Es wurden acht verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien und humane Schwannsche Zellen untersucht. CXCR4 und CXCR7 wurden auf Proteinebene in Pankreaskarzinomzelllinien, humanen Schwannschen Zellen und murinen Nervenzellen detektiert. CXCR4 und CXCR7 wurden in vergleichbarer Stärke und kohärent zu den immunhistochemischen Ergebnissen detektiert (CXCR4 Quantität in Relation zu GAPDH, Kombination aus 3-4 unabhängigen Sets, AsPC-1: $77,6 \pm 35,5$ %, BxPC-3: $153,3 \pm 60,9$ %, Capan-1: $191,5 \pm 68,5$ %, COLO-357: $57,5 \pm 21,1$ %, Mia PaCa-2: $77,0 \pm 47,6$ %, PANC-1: $100,5 \pm 46,5$ %, SU86.86: $62,7 \pm 37,4$ %, T3M4: $60,2 \pm 41,3$ %, hSC: $79,9 \pm 77,6$ %, humanes Pankreaskarzinomgewebe: $120,3 \pm 112,5$ %) (Abbildung 9 A) (CXCR7 Quantität in Relation zu GAPDH, Kombination aus 3 bzw. 4 unabhängigen Sets, AsPC-1: $100,9 \pm 63,4$ %, BxPC-3: $22,4 \pm 14,0$ %, Capan-1: $710,6 \pm 615,0$ %, COLO-357: $577,7 \pm 560,6$ %, Mia PaCa-2: $5,6 \pm 2,7$ %, PANC-1: $11,8 \pm 6,7$ %, SU86.86: $39,5 \pm 4,1$ %, T3M4: $7,9 \pm 4,5$ %, HCT-116: $18,7 \pm 9,8$ %, hSC: $5,4 \pm 4,0$ %, Jurkat: $130,9 \pm 50,4$ %) (Abbildung 9 B).

A



B

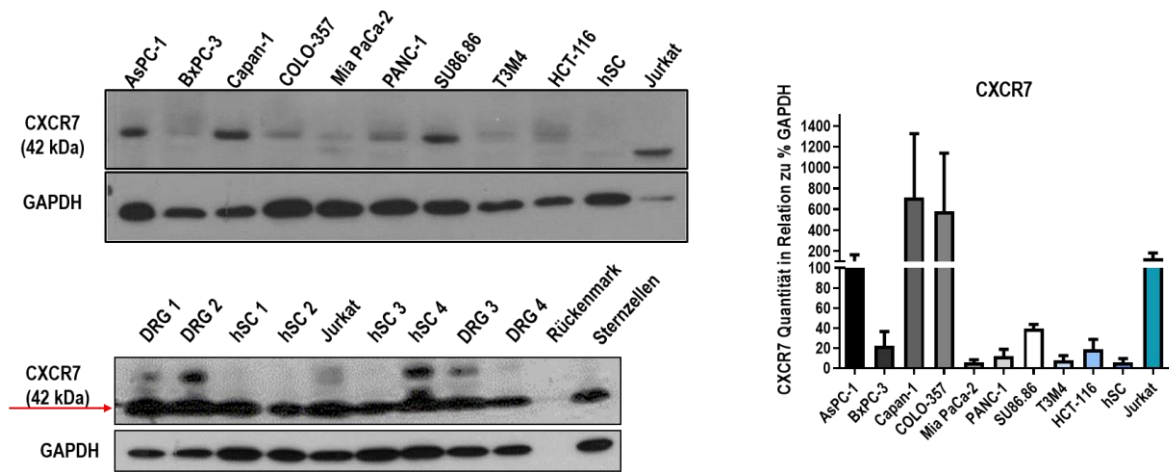


Abbildung 9 A-B: Nachweis der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 via Immunoblot. Sowohl in Karzinomzelllinien als auch in humanen Schwannschen Zellen wurden die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 in vergleichbarer Menge, kohärent mit den immunhistochemischen Ergebnissen, detektiert. Die Graphen zeigen Mittelwerte aus jeweils 3 bzw. 4 Sets an eigenständig gewonnenen Lysaten.

Rezeptorexpression unter Hypoxie

Da das Pankreaskarzinom ein hypoxisches Milieu induziert, wurde als nächstes die Expression von CXCR7 in humanen Schwannschen Zellen unter Hypoxie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hypoxie, unabhängig von der Expositionsdauer, die CXCR7-Expression hochreguliert wurde (CXCR7 Quantität in Relation zu GAPDH, Kombination aus 3 unabhängig gewonnenen Sets, 0 h: 31958 ± 5716 %, 2 h: 74238 ± 4271 %, 6 h: 77039 ± 6653 %, 12 h: 65388 ± 5531 %, 24 h: 76083 ± 6305 %, 48 h: 72827 ± 5516 %, Jurkat: 92219 ± 7537 %) (Abbildung 10).

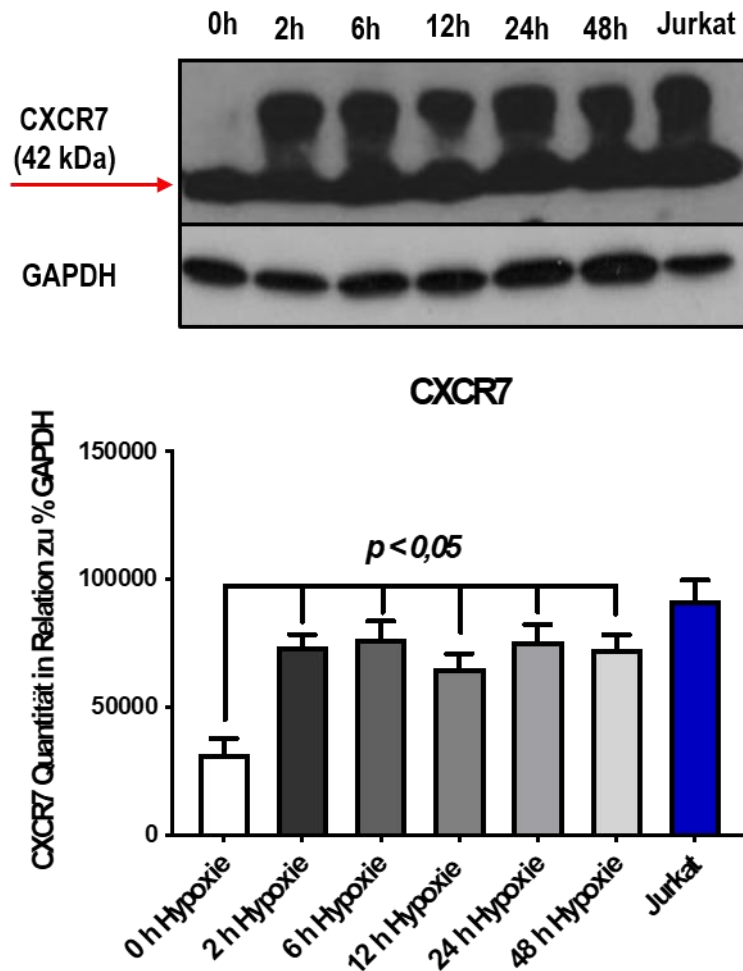


Abbildung 10: Veränderung der CXCR7 Expression in humanen Schwannschen Zellen unter Hypoxie. Unter Hypoxie zeigte sich eine Hochregulation von CXCR7 in Schwannschen Zellen. Gezeigt sind ein beispielhafter Blot und die Ergebnisse der semiquantitativen Analyse dreier, separat gewonnener, Replikate.

CXCL12-Expression in Zelllinien

Kohärent zu dem Nachweis der Rezeptoren via Immunoblotting wollten wir auch die Expression von CXCL12 ergänzend zu den immunhistochemischen Befunden verifizieren. Aufgrund der geringen molekularen Größe von wenigen Kilodalton erfolgte dies nicht über einen Immunoblot, sondern über ein ELISA. Es zeigten sich vergleichbare Mengen an CXCL12 in den acht untersuchten humanen Pankreaskarzinomzelllinien sowie in humanen Schwannschen Zellen. Das ELISA wurde mit drei separat

gewonnenen Zelllysaten wiederholt (CXCL12 Konzentration in ng/ml BxPC-3: $0,21 \pm 0,02$ %, Capan-1: $0,21 \pm 0,01$ %, COLO-357: $0,21 \pm 0,02$ %, Mia PaCa-2: $0,19 \pm 0,02$ %, PANC-1: $0,21 \pm 0,02$ %, SU86.86: $0,18 \pm 0,01$ %, T3M4: $0,19 \pm 0,02$ %, Colonkarzinomzelllinie HCT-116: $0,22 \pm 0,02$ %, Mammakarzinomzelllinie MCF-7: $0,24 \pm 0,02$ %, hSC: $0,27 \pm 0,02$ %) (Abbildung 11).

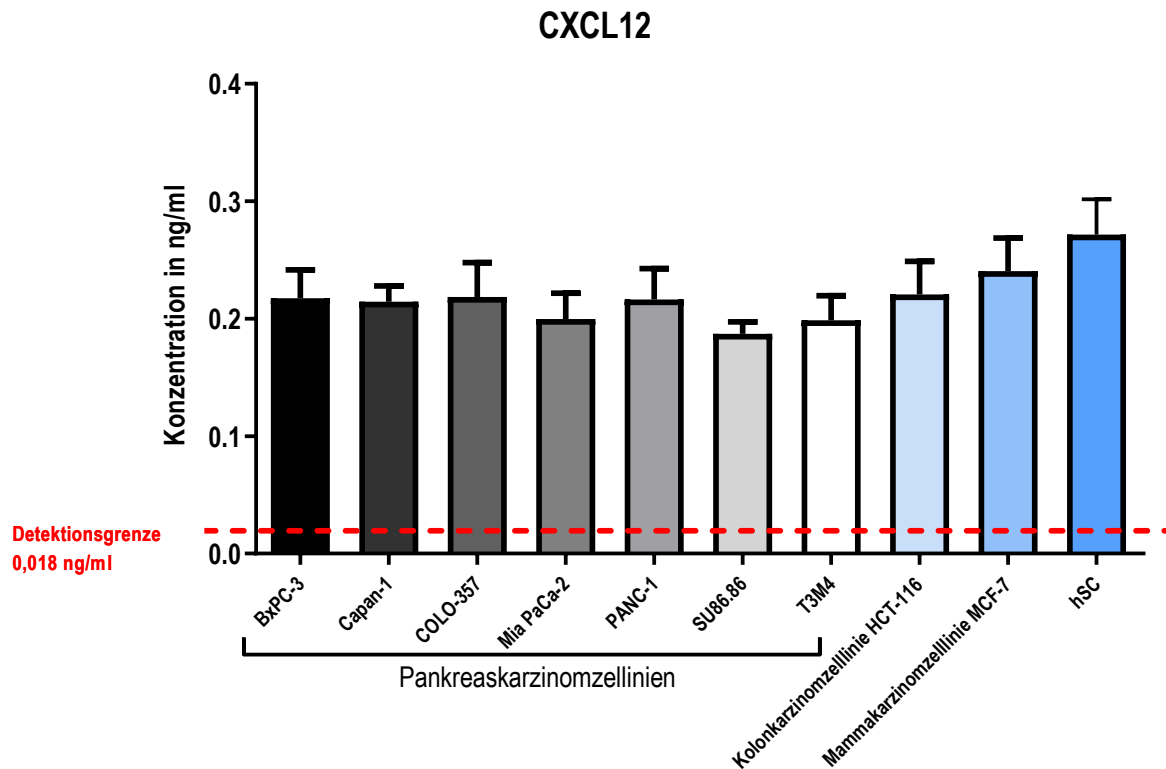


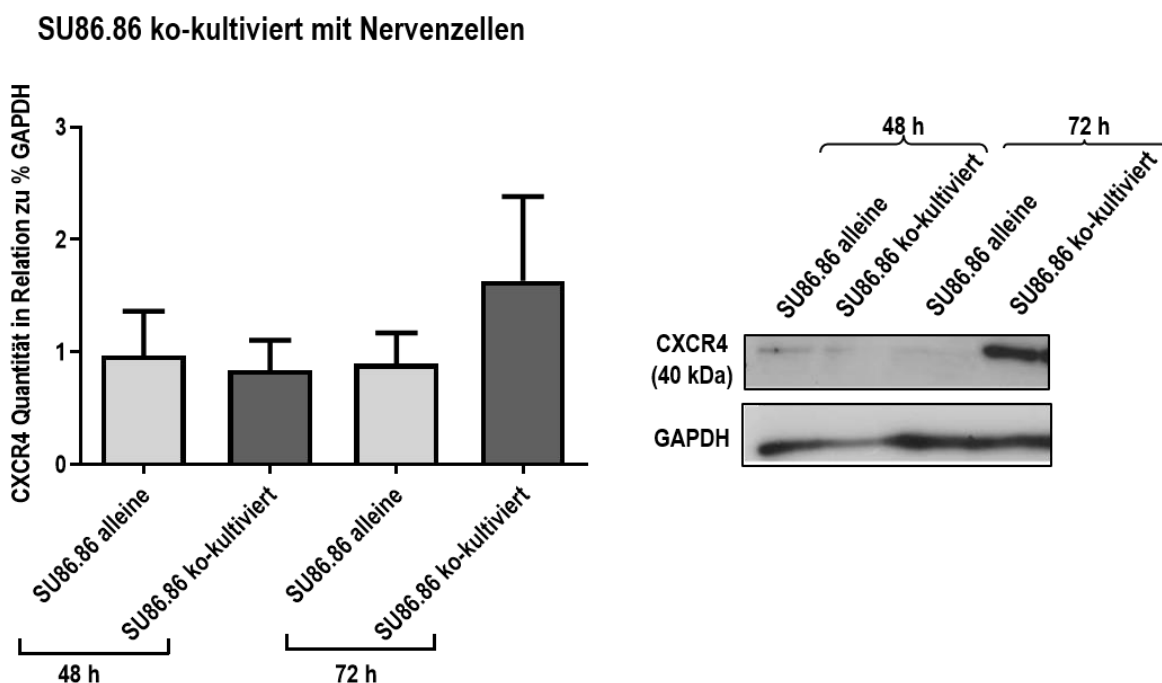
Abbildung 11: Antikörper vermittelter Nachweis von CXCL12 via ELISA. CXCL12 wurde in 7 Pankreaskarzinomzelllinien und in humanen Schwannschen Zellen nachgewiesen

Die Hypothese einer CXCL12 Expression in Pankreaskarzinomen, welche wir aufgrund unserer immunhistochemischen Ergebnisse formulierten, wurde durch die Ergebnisse der Assays bestätigt.

Einfluss von Ko-Kultivierung auf die Rezeptorexpression der Tumorzellen

Um unsere Ergebnisse fundiert zu erweitern erfolgte die Untersuchung der verschiedenen Zellgruppen in vitro. Um die Interaktion der verschiedenen Zellgruppen zu untersuchen, wurden Pankreaskarzinomzellen, Schwannsche Zellen und Neurone ko-kultiviert. In den hieraus gewonnenen Lysaten wurde die Expression der Rezeptoren, CXCR4 und CXCR7, untersucht und mit der Expression aus singulärer Kultivierung unter denselben Umständen verglichen. In der semiquantitativen Analyse dreier separat gewonnener Replikate zeigte sich keine statistisch signifikante Differenz in der quantitativen CXCR4-Expression in den Pankreaskarzinomzelllinien SU86.86 und T3M4 im Vergleich von singulär zu ko-kultivierten Pankreaskarzinomzellen (CXCR4-Quantität in Relation zu GAPDH, SU86.86 ko-kultiviert mit Nervenzellen, SU86.86 alleine 48 h: $0,96 \pm 0,39$ %; SU86.86 ko-kultiviert 48 h: $0,83 \pm 0,26$ %; SU86.86 alleine 72 h: $0,89 \pm 0,27$ %; SU86.86 ko-kultiviert 72 h: $1,6 \pm 0,74$ %) (CXCR4 Quantität in Relation zu GAPDH, T3M4 ko-kultiviert mit Nervenzellen, T3M4 alleine 48 h: $1,0 \pm 0,39$ %; T3M4 ko-kultiviert 48 h: $0,8 \pm 0,26$ %; T3M4 alleine 72 h: $0,9 \pm 0,27$ %; T3M4 ko-kultiviert 72 h: $1,5 \pm 0,71$ %) (Abbildung 12 A-B).

A



B

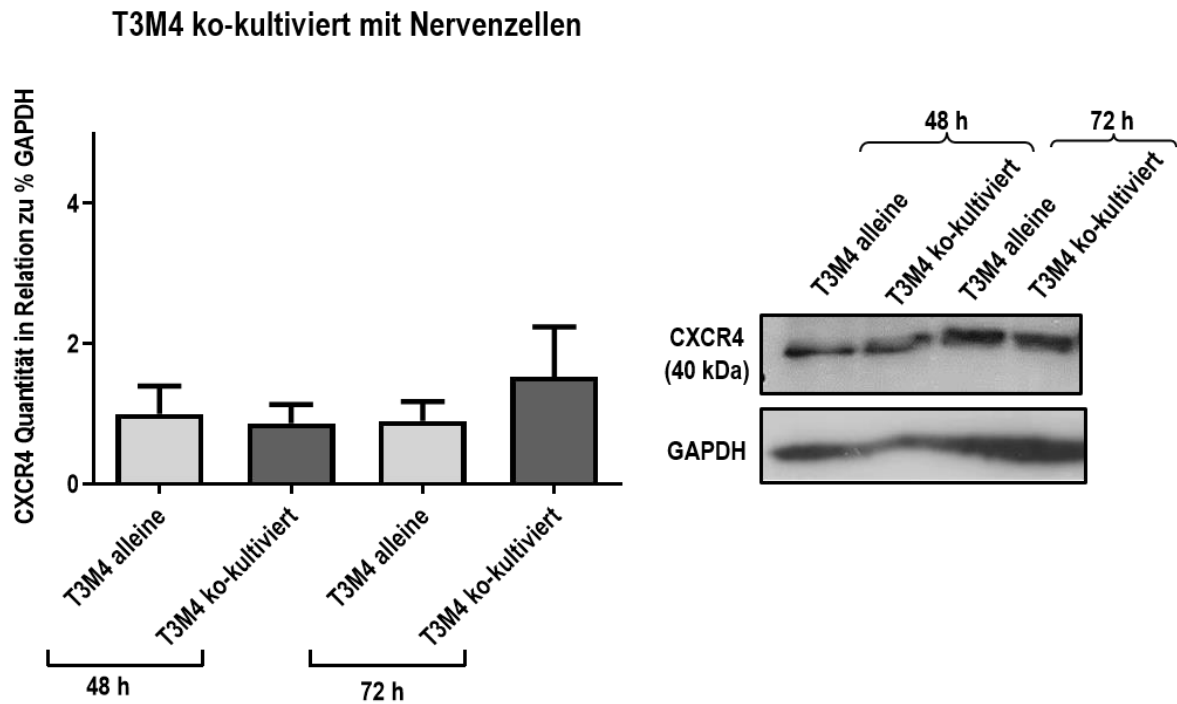


Abbildung 12 A-B: Quantitative CXCR4 Bestimmung in Karzinomzellen, welche mit Neuronen ko-kultiviert wurden.

Die Ko-Kultivierung von Pankreaskarzinomzellen mit murinen peripheren Neuronen zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die CXCR4 Expression. Die Graphen zeigen die zusammengefassten Ergebnisse dreier Replikate der Ko-Kultur.

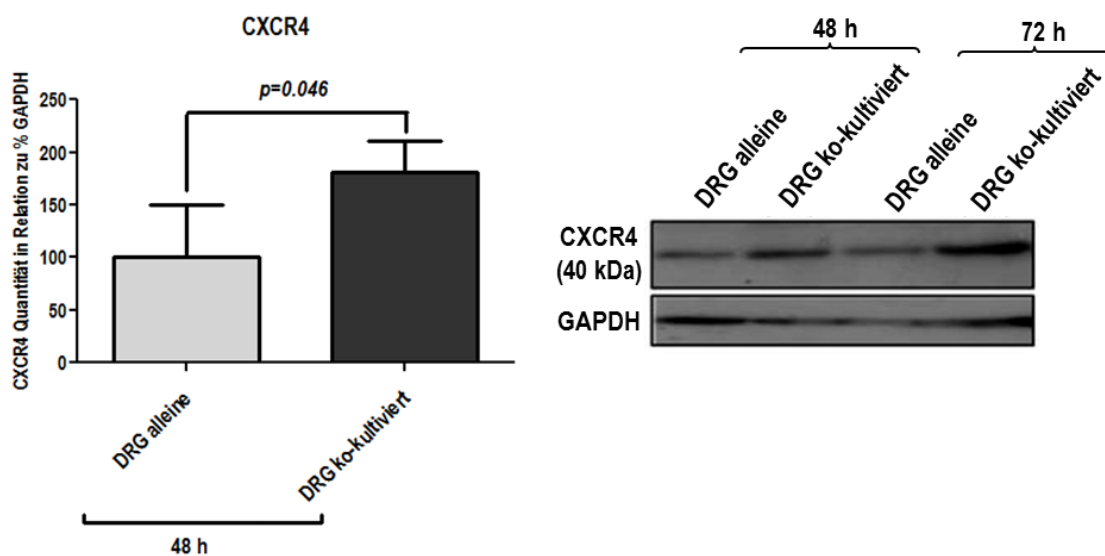
Einfluss von Ko-Kultivierung auf die Rezeptorexpression der neuronalen und Schwannschen Zelle

Die Hochregulation der CXCR7-Expression in Schwannschen Zellen unter Hypoxie lässt eine Einflussnahme des kanzerösen Mikromilieus auf Schwannsche Zellen vermuten. Um diesen Ergebnissen weiter nachzugehen, erfolgte nun, kohärent zu den oben genannten Versuchen, die Ko-Kultivierung von Neuronen und Schwannschen Zellen mit Karzinomzellen. Wie in Abbildungen 13 und 14 dargestellt, zeigte sich in diesen Experimenten eine Expressionssteigerung des Rezeptors CXCR4 in Neuronen und Schwannschen Zellen bei Ko-Kultivierung mit den Pankreaskarzinomzelllinien SU86.86, T3M4 und

Capan 1 (CXCR4 Quantität in Relation zu GAPDH, Nervenzellen ko-kultiviert mit SU86.86 vs. Nervenzellen singulär: $p = 0,046$, DRG alleine 48 h: $100 \pm 20,3 \%$; DRG ko-kultiviert 48 h: $181,5 \pm 53,1 \%$) (CXCR4 Quantität in Relation zu GAPDH, Nervenzellen ko-kultiviert mit T3M4, DRG alleine 48 h: $100 \pm 30,2 \%$; DRG ko-kultiviert 48 h: $329 \pm 222,2 \%$) (CXCR4 Quantität in Relation zu GAPDH, Nervenzellen ko-kultiviert mit Capan-1, DRG alleine 24 h: $70,3 \pm 13,0 \%$; DRG ko-kultiviert 24 h: $72,1 \pm 7,9 \%$; DRG alleine 48 h: $77,8 \pm 29,7 \%$; DRG ko-kultiviert 48 h: $112,3 \pm 40,5 \%$; DRG alleine 72 h: $111,1 \pm 91,7 \%$; DRG ko-kultiviert 72 h: $182,0 \pm 154,8 \%$) (CXCR4 Quantität in Relation zu GAPDH, hSC ko-kultiviert mit SU86.86, hSC alleine 24 h: $100,0 \pm 0,1 \%$; hSC ko-kultiviert 24 h: $133,1 \pm 9,9 \%$) (Abbildung 13 A-C und 14).

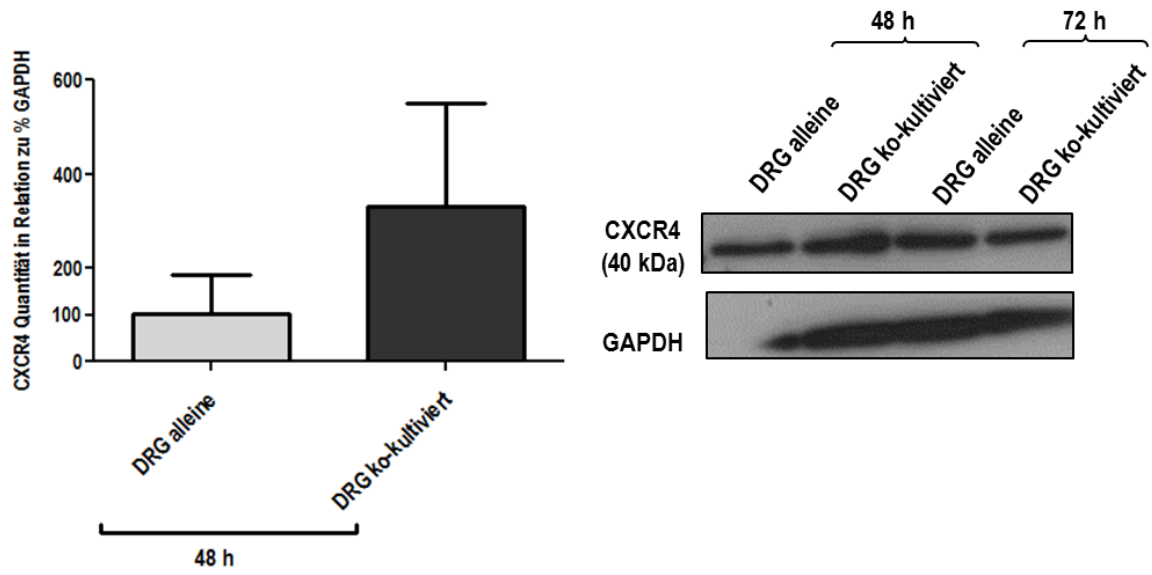
A

Nervenzellen ko-kultiviert mit SU86.86



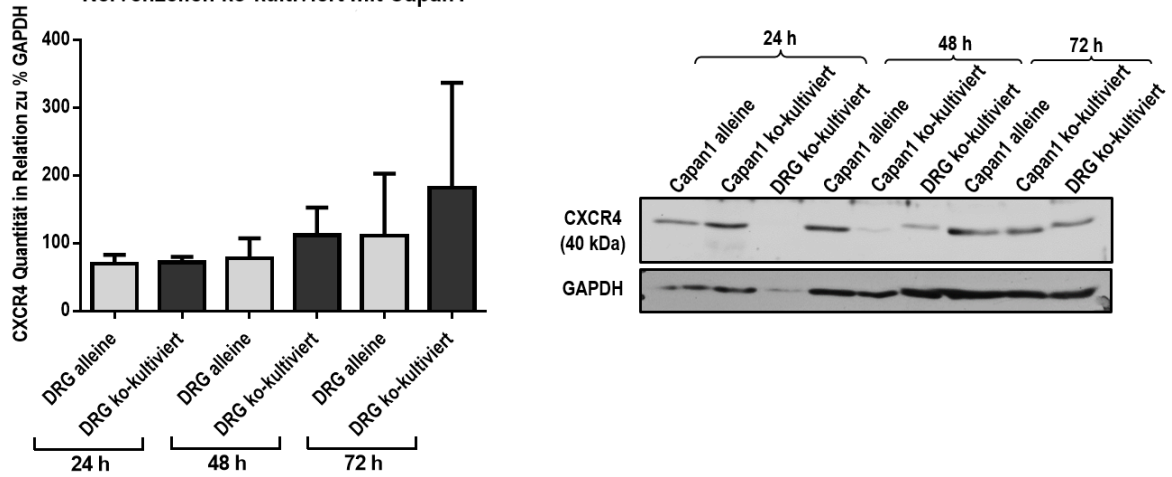
B

Nervenzellen ko-kultiviert mit T3M4



C

Nervenzellen ko-kultiviert mit Capan1



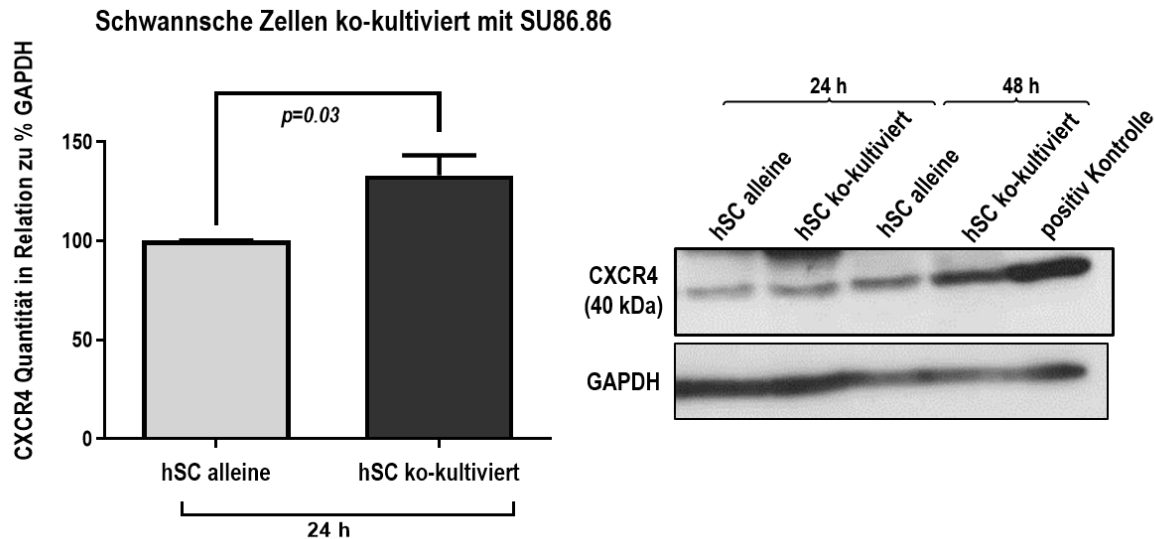


Abbildung 13 A-C und 14: Quantitative CXCR4 Expression in neuronalen Zellen nach Ko-Kultivierung mit Karzinomzellen. Nach Ko-Kultivierung mit Karzinomzellen zeigten periphere murine Neurone und humane Schwannsche Zellen in Immunoblots eine Expressionssteigerung von CXCR4. Der Graph zeigt die semiquantitative Analyse dreier Replikate.

CXCL12 wirkt chemoattraktiv auf Schwannsche Zellen

Die Immunhistochemie zeigte eine starke Expression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 im gesunden und im neoplastisch veränderten Pankreas. Immunhistochemisch und via Immunoblot wurde eine Hochregulation von CXCL12 in Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe gezeigt. In bereits veröffentlichten Studien war eine Migration von Schwannschen Zellen zu Tumorzellen demonstriert worden (Demir et al. 2014). Es stellte sich die Frage, ob die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse einen Einfluss auf das migratorische Verhalten der Schwannschen Zellen hat und eine Erklärung für die Migration von Schwannschen Zellen zu Tumorzellen liefert. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein Chemotaxis Assay mit steigenden Konzentrationen an CXCL12 erstellt. Es zeigte sich eine signifikante, Dosis-abhängige Steigerung der Migration Schwannscher Zellen bei Zugabe von CXCL12 (% Chemoattraktion Schwannscher Zellen zu CXCL12 bei Zugabe von rekombinantem CXCL12, die Zahl der gewanderten Zellen wurde in Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt daher gilt für 0 ng/ml ein mean

von 100 % Chemoattraktion mit 0 SEM; 10 ng rekombinantes CXCL12 pro 1 ml Serum: $156,4 \pm 27,3$ %; 50 ng/ml: $160,4 \pm 21,0$ %; 100 ng/ml: $193,8 \pm 34,9$ %).

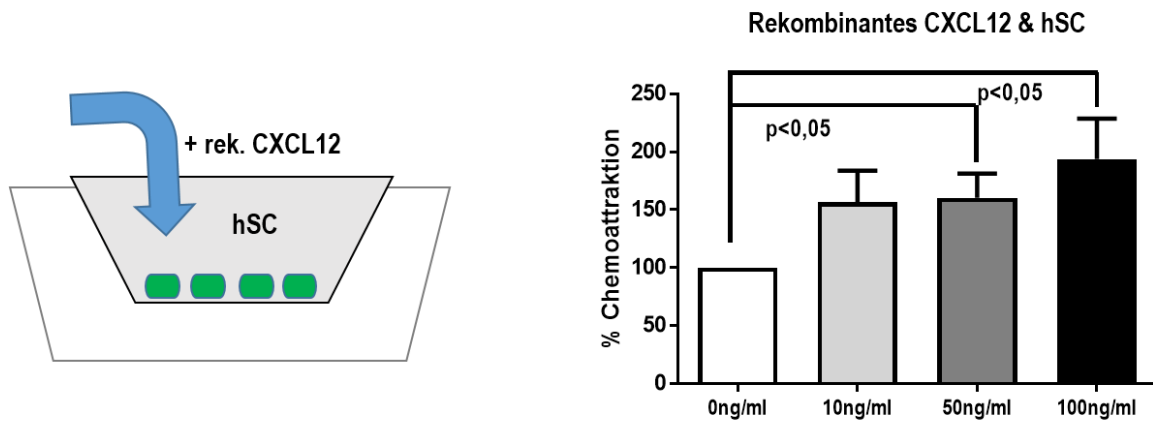


Abbildung 15: Veränderung der Migration Schwannscher Zellen bei Zugabe von rekombinatem CXCL12. Es zeigt sich eine signifikante dosisabhängige Steigerung der Migration Schwannscher Zellen bei Zugabe von rekombinatem CXCL12. Der Graph zeigt die Kombination dreier separater Replikate des Settings. Hierbei wurde die Zahl der gewanderten Zellen jeweils in Verhältnis zur Negativkontrolle gesetzt. Daher zeigt die Negativkontrolle keinen Fehlerbalken.

CXCR4 und CXCR7 beeinflussen die Migration Schwannscher Zellen

In einer Erweiterung dieses Settings wurden Schwannsche Zellen mit den Pankreaskarzinomzelllinien Mia PaCa-2 und T3M4 im Rahmen eines Migration Assays in Kontakt gebracht. Hierbei wurden neben den Kontrollen auch Settings untersucht, in denen CXCL12 oder CXCR4 geblockt waren. Es zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Migration Schwannscher Zellen durch Blockade von CXCL12 oder CXCR4 (die Anzahl migrierter Schwannscher Zellen wurde in Bezug zur Negativkontrolle, 0 μ g/ml, gesetzt, daher ergibt sich für die Negativkontrolle kein Fehlerbalken. % Chemoattraktion humaner Schwannscher Zellen unter CXCL12-Blockade zu Mia PaCa-2, 10 μ g CXCL12-Inhibitor/ml: $147,0 \pm 30,5$ %, 30 μ g anti-CXCL12/ml: $117,2 \pm 23,7$ %; % Chemoattraktion humaner Schwannscher Zellen zu T3M4, 10 μ g anti-CXCL12/ml: $184,9 \pm 53,8$ %, 30 μ g anti-CXCL12/ml: $151,4 \pm 42,2$ %) (% Chemoattraktion

humaner Schwannscher Zellen zu T3M4 unter 1,25 µg CXCR4-Inhibitor/ml: $134,2 \pm 23,2$ %; zu Mia PaCa-2 unter 1,25 µg CXCR4 Inhibitor/ml: $98,62 \pm 11,8$ %; zu PANC-1 unter 1,25 µg CXCR4-Inhibitor/ml: $98,7 \pm 15,2$ %) (Abbildung 16).

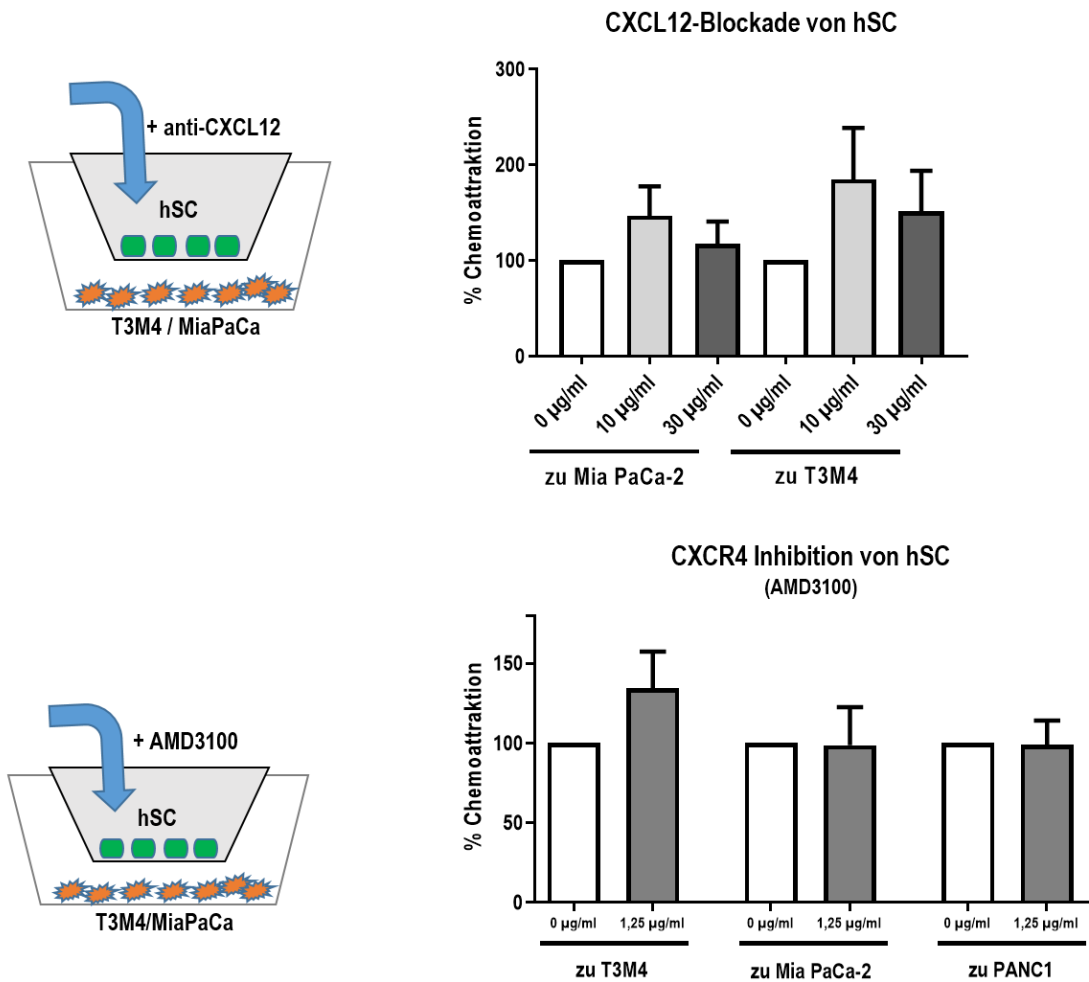


Abbildung 16: Veränderung der Migration Schwannscher Zellen bei Blockade von CXCL12 oder CXCR4

Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen in der Chemotaxis Schwannscher Zellen zu Karzinomzellen unter Inhibition von CXCL12 oder des Rezeptors CXCR4.

Blockierte man allerdings CXCR7, zeigte sich eine dosisabhängige Verringerung der Migration Schwannscher Zellen zu den Karzinomzelllinien (Chemoattraktion humaner Schwannscher Zellen unter CXCR7 Blockade zu T3M4, Negativkontrolle: $113,1 \pm 24,8$ %, mit 30 µg CXCR7-Inhibitor/ml: $56,1 \pm 8,3$ %; zu Mia PaCa-2, Negativkontrolle: $100 \pm 10,1$ %, mit 30 µg CXCR7-Inhibitor/ml: $58,4 \pm 14,5$ %; zu

PANC-1, Negativkontrolle: $100,6 \pm 11,7$ %, mit $30 \mu\text{g CXCR7-Antikörper/ml}$: $60,7 \pm 2,4$ % bezüglich der Kontrolle) (Abbildung 17).

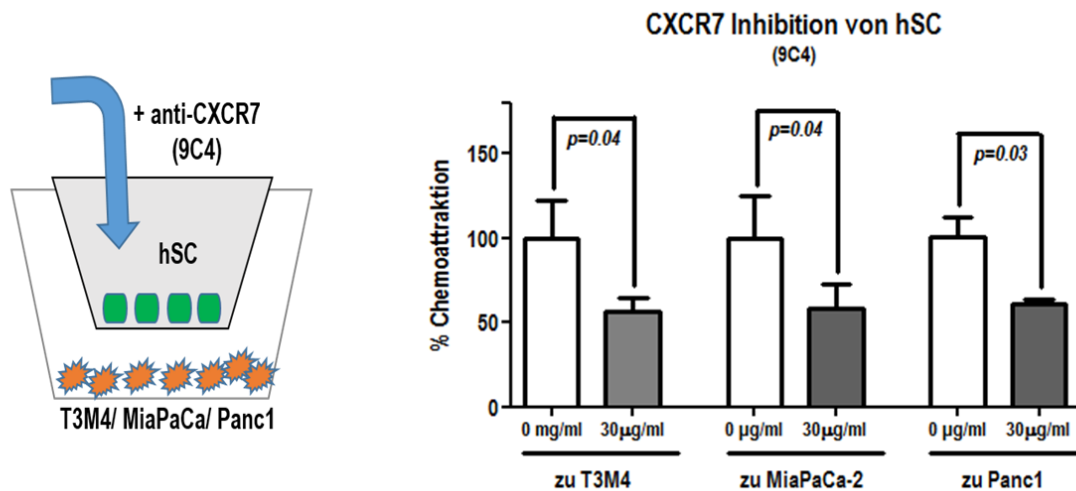


Abbildung 17: Veränderung der Migration Schwannscher Zellen zu Karzinomzellen bei Inhibition von CXCR7

Schwannsche Zellen zeigten eine dosisabhängige signifikante Abnahme der Chemotaxis zu Karzinomzellen bei Inhibition von CXCR7.

Um diese Ergebnisse in einem anderen Setting zu validieren und näher zu untersuchen, wurde ein 3D Migration Assay erstellt. Hierbei wurde die Migration unbehandelter, CXCR4- (via AMD3100) oder CXCR7- (via 9C4) blockierter Schwannscher Zellen zu Karzinomzellen untersucht. Die Rezeptor-blockierten Zellen präsentierten im Vergleich zu nativen Schwannschen Zellen eine langsamere, ungerichtete und kürzere Migration in Richtung der Karzinomzelllinien T3M4 und SU86.86 (Forward Migration Index/FMI der hSC+AMD3100: $0,20 \pm 0,004$ % vs. Kontroll-hSC: $0,30 \pm 0,04$ %; euklidischer Abstand der hSC+AMD3100: $28,8 \mu\text{m} \pm 4,0$ % vs. Kontroll-hSC: $70,4 \mu\text{m} \pm 10,4$ %; Geschwindigkeit hSC+AMD3100: $0,15 \mu\text{m/min} \pm 0,02$ % vs. Kontroll-hSC: $0,29 \mu\text{m/min} \pm 0,04$ %) (FMI der hSC+9C4: $0,15 \pm 0,03$ % vs. Kontroll-hSC: $0,35 \pm 0,02$ %; euklidischer Abstand hSC+9C4: $28,6 \mu\text{m} \pm 3,2$ % vs.

Kontroll-hSC: $43,4 \mu\text{m} \pm 4,6 \%$; Geschwindigkeit hSC+9C4: $0,11 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,01 \%$ vs. Kontroll-hSC: $0,08 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,007 \%$ (Abbildung 18-21).

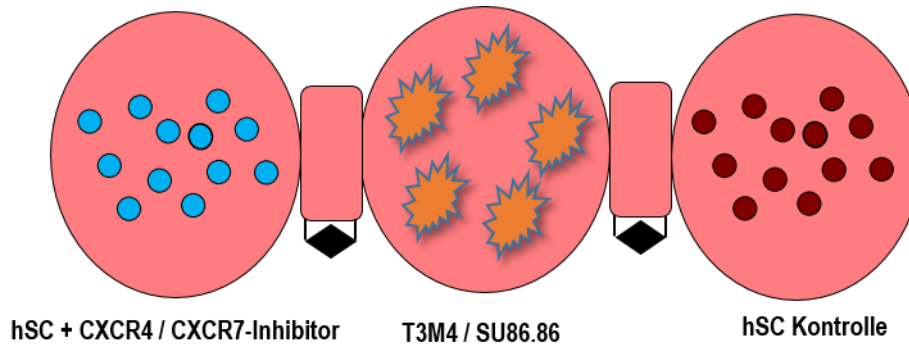
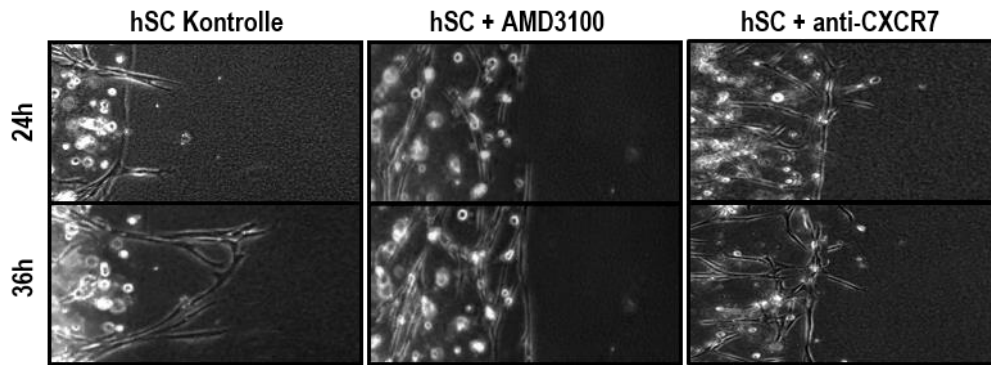


Abbildung 18 und 19: Migration Schwannscher Zellen im Rahmen eines Migration Assay und schematischer Aufbau

Die verschiedenen Zellen wurden in Gel suspendiert und mit leeren Gel-Brücken verbunden. Die dargestellten Fotos entstanden mittels Time-lapse Fotografie und wurden statistisch ausgewertet (Demir et al. 2017).

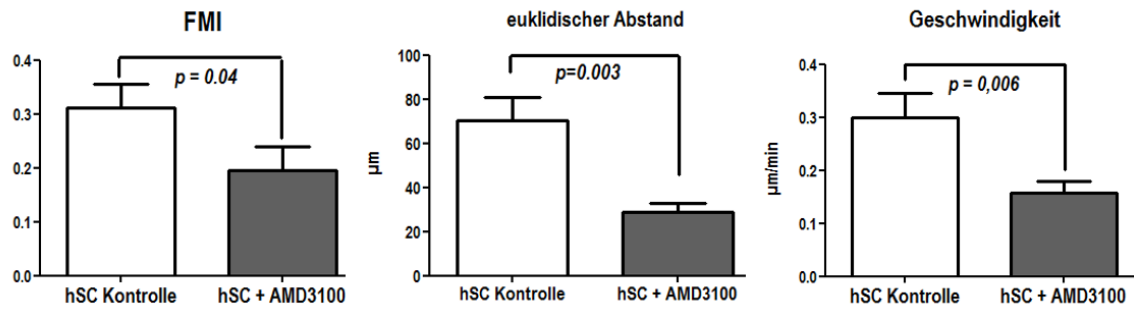


Abbildung 20: Inhibition von CXCR4 in Schwannschen Zellen reduziert ihre Migration zu Tumorzellen

CXCR4 inhibierte Schwannsche Zellen zeigten eine signifikante Abnahme ihrer Migration zu PCa-Zellen. Es zeigt sich eine langsamere, kürzere und weniger zielgerichtete Migration unter CXCR4-Blockade im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt sind der Forward-Migration-Index/FMI, der euklidische Abstand und die Geschwindigkeit.

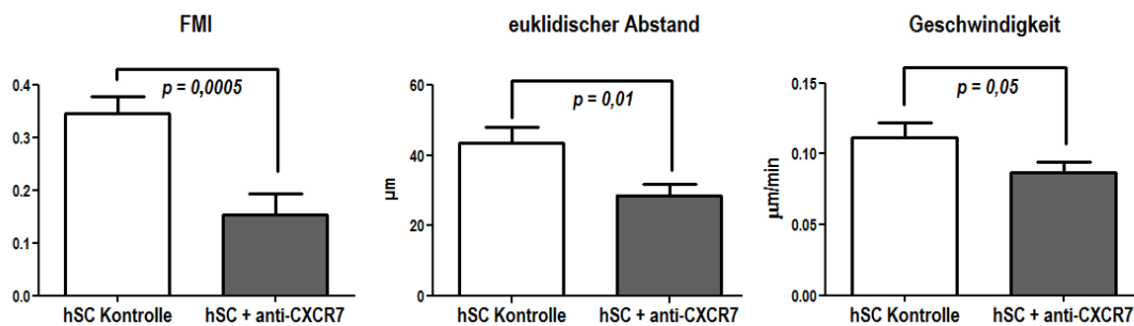


Abbildung 21: Inhibition von CXCR7 auf Schwannschen Zellen reduziert ihre Migration zu Tumorzellen

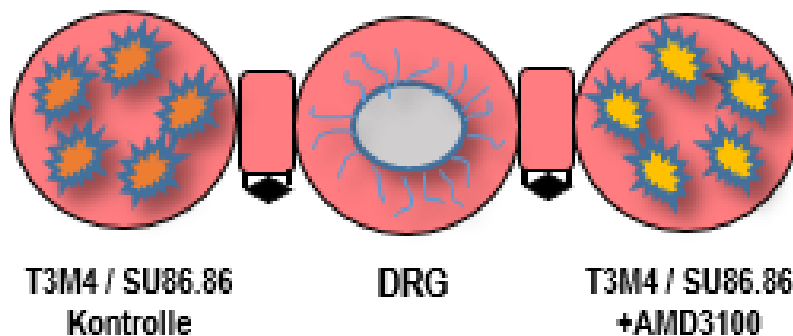
Kohärent zu den Ergebnissen des Chemotaxis Assay zeigten CXCR7-inhibierte Schwannsche Zellen eine statistisch signifikante Abnahme der Migration zu Tumorzellen. Es zeigte sich eine langsamere, kürzere und weniger zielgerichtete Migration unter CXCR7-Blockade im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt sind der Forward-Migration-Index/FMI, der euklidische Abstand und die Geschwindigkeit.

Einfluss der Rezeptoren auf die Migration der Karzinomzellen

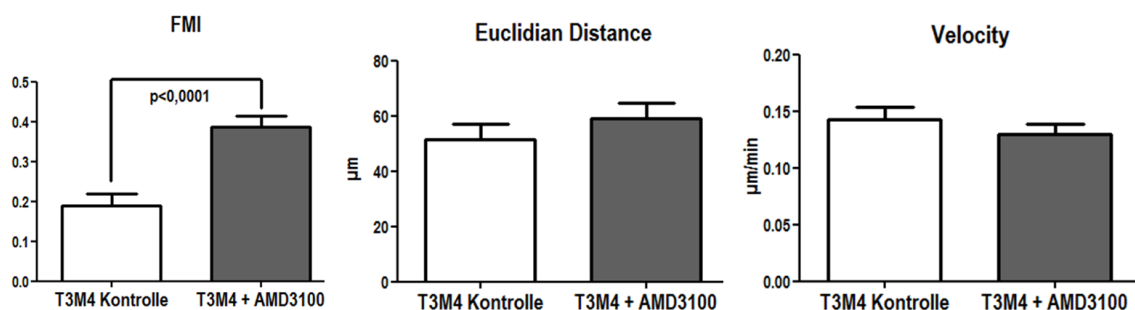
Zusätzlich wurde in einem ähnlichen Setting der Einfluss von CXCR4 auf die Migration von Karzinomzellen zu Neuronen untersucht. Hierzu wurden die Pankreaskarzinomzelllinien SU86.86 und

T3M4 mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3100 behandelt und ihre Migration in Richtung der Neurone dokumentiert. Wie in Abbildung 22 ersichtlich zeigte sich kein eindeutig hemmender Einfluss der Rezeptorinhibition auf die Tumorzellmigration in Richtung der Neurone. Es war sogar nach CXCR4-Inhibition eine vermehrte Migration der T3M4-Zellen zu Neuronen zu beobachten (FMI T3M4: $0,18 \pm 0,03$ %, FMI T3M4 unter CXCR4 Inhibition durch AMD3100: $0,38 \pm 0,002$ %; euklidischer Abstand T3M4: $51,6 \mu\text{m} \pm 5,2$ %, T3M4 unter CXCR4 Inhibition durch AMD3100: $59,0 \mu\text{m} \pm 5,3$ %; Geschwindigkeit T3M4: $0,14 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,01$ %, T3M4 unter CXCR4 Inhibition durch AMD3100: $0,13 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,008$ %) (FMI SU86.86: $0,15 \pm 0,04$ %, SU86.86 unter CXCR4 Inhibition durch AMD3100: $0,19 \pm 0,03$ %; euklidischer Abstand SU86.86: $133,5 \mu\text{m} \pm 14,5$ %, SU86.86 unter CXCR4 Inhibition durch AMD3100: $154,7 \mu\text{m} \pm 25,5$ %; Geschwindigkeit SU86.86: $0,32 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,03$ %, SU86.86 unter CXCR4 Inhibition durch AMD3100: $0,36 \mu\text{m}/\text{min} \pm 0,02$ %) (Abbildung 22 A-C).

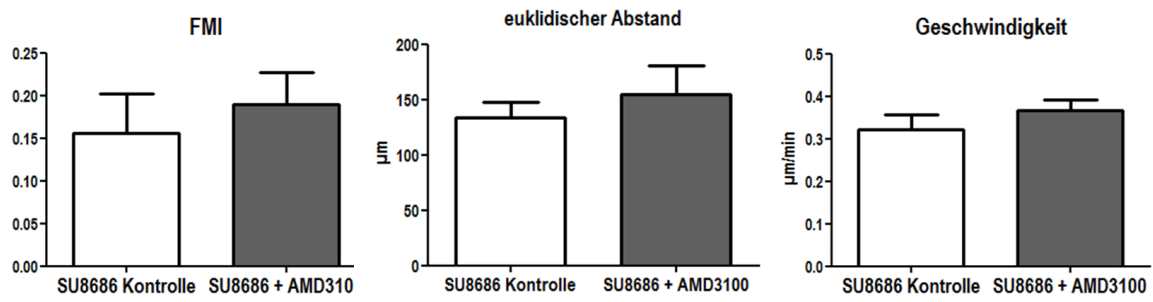
A



B



C



Abbildungen 22. Schematische Darstellung des Migration Assay-Setting und Quantifizierung der Karzinomzellmigration

A. Der Aufbau des 3D Migrationassay unter CXCR4-Blockade mittels AMD3100. B. Die Inhibition von CXCR4 steigerte die Migration der T3M4-Zellen in Richtung der Neurone. C. Die Inhibition von CXCR7 auf T3M4-Zellen hatte keinen Einfluss auf ihre Migration in Richtung der Neurone.

Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurde die Rolle der Schwannschen Zellen als interaktiver Partner im kanzerösen Mikromilieu des Pankreaskarzinomes untersucht. Wir stellten die Hypothese auf, dass Pankreaskarzinomzellen und ihre präkanzerösen Vorläuferzellen (PanIN-Läsionen) Schwannsche Zellen über die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse durch Chemoattraktion rekrutieren. Tatsächlich zeigte sich im Rahmen der oben geschilderten Experimente eine deutlich hochregulierte Expression von CXCL12 in Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. Die beiden zugehörigen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 wurden in neuronalen Strukturen (Schwannsche Zellen, DRGs, Nerven, Perineurium) nachgewiesen. Korrelierend zur Hochregulation des Liganden im Pankreaskarzinom zeigte sich eine Hochregulation der Rezeptorexpression in neuronalen Strukturen, insbesondere den Schwannscher Zellen, im kanzerösen Mikromilieu. Es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Migration Schwannscher Zellen durch CXCL12, welche durch Inhibition der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 verringert werden konnte.

Das Pankreaskarzinom ist histopathologisch in bis zu 100 % der Fälle durch eine intra- und extrapankreatische perineurale Invasion gekennzeichnet (Bockman et al. 1994; Nakao et al. 1996; Ceyhan et al. 2009, Liebl et al. 2014). Die neurale Invasion des Pankreaskarzinom erschwert häufig eine R0-Resektion, ist vielfach mit schwer beherrschbaren Schmerzen assoziiert und korreliert mit einem reduzierten Gesamtüberleben (Ceyhan et al. 2009; Demir et al. 2012). Bei genauer Untersuchung der neuralen Invasion zeigte sich eine Auswirkung des kanzerösen Mikromileus auf die neuronalen Strukturen des Pankreas im Rahmen der pankreatischen Neuroplastizität und Neuropathie (Ceyhan et al 2009). Anders als primär angenommen resultiert die neurale Invasion nicht aus einer niedrigen anatomischen Resistenz der neuronalen Strukturen, sondern aus einem veränderten perineuralen Mikromilieu, welches auch mit dem Begriff „perineurale Nische“ beschrieben wurde (Chen et al. 2019). Die neurale Invasion ergibt sich also nicht aus einer Invasion der Nervenzellen durch die Pankreaskarzinomzellen, sondern

umgekehrt durch eine Reaktion der perineuralen Strukturen auf das kanzeröse Mikromileu (Demir et al. 2014; Chen et al. 2019; Na'ara et al. 2019).

CXCL12 ist ein seit 1993 bekanntes Chemokin, das 2001 durch seine Überexpression in Mammakarzinomgewebe aufgefallen ist (Tashiro et al. 1993; Müller et al. 2001). Daraufgehend wurde die Rolle von CXCL12 im Pankreaskarzinom untersucht. Mehrere Studien zeigten eine Überexpression von CXCL12 im Pankreaskarzinomgewebe (Domanska et al. 2012; Sun et al. 2010; Graham et al. 2012; Burns et al. 2006; Monnier et al. 2012; Hao et al. 2012; Heinrich et al. 2012; Zhi et al. 2012; Rogers et al. 2006). Darüber hinaus korreliert in klinischen Studien die Quantität der CXCL12-Expression mit einer vermehrten Metastasierung und erhöhten Mortalität (Gebauer et al. 2011; Liang et al. 2009; Marcheal et al. 2009). Über den AKT-, ERK- und Sonic Hedghog Signalweg werden durch die Aktivierung der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Chemokin-Rezeptor-Achse eine vermehrte Invasivität, Migration, Proliferation und Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen induziert (Gebauer et al. 2011; Koshiba et al. 2000; Liang et al. 2010; Marchesi et al. 2004; Marcheal et al. 2009; Mori et al. 2009; Saur et al. 2005; Shen et al. 2010; Singh et al. 2012). Obwohl diese Ergebnisse den Einfluss von CXCR4 auf die Aggressivität von Tumoren darstellen, stand CXCL12 nicht im unmittelbaren Fokus dieser Studien. Im Rahmen dieser Studien waren nur wenige Pankreaskarzinomzelllinien untersucht worden, in welchen CXCL12 nicht detektiert wurde (Koshiba et al. 2000; Roy et al. 2014), wohingegen andere Studien CXCL12 in Pankreaskarzinomzellen im Gewebe und in Pankreaskarzinomzelllinien detektierten (Marchesi et al. 2004; Zhong et al. 2012). Zusammenfassend weisen diese scheinbar konträren Ergebnisse auf die Heterogenität der CXCL12-Expression zwischen den verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien hin (Marchesi et al. 2004).

Verschiedene Arbeiten belegen den Einfluss der CXCL12-CXCR4 Achse auf die astrozytäre und mikrogliale Migration und ihr Überleben (Dziembowska et al. 2005), die neuronale Heilung nach Ischämie oder Verletzungen (Lazarini et al. 2003; Schönemeier et al. 2008), sowie die Kommunikation zwischen Neuronen und glialen Zellen (Lazarini et al. 2003). Zusammenfassend kann daher gefolgert werden, dass CXCL12 über CXCR4 und CXCR7 einen starken Einfluss auf die Nerv-Tumor-Interaktion im

Pankreaskarzinom ausübt und bei der Aktivierung intrapankreatischer Schwannscher Zellen eine wesentliche Rolle spielt.

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse erstellte unsere Arbeitsgruppe die Hypothese, dass CXCL12 mit seinen Rezeptoren an der Chemoattraktion Schwannscher Zellen durch Pankreaskarzinomzellen beteiligt ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von CXCL12, CXCR4 und CXCR7 in gesundem Pankreasgewebe als auch in Pankreaskarzinomgewebe untersucht. In der semiquantitativen Analyse der Immunhistochemie zeigte sich eine gesteigerte Expression von CXCL12 in Tumorzellen im Vergleich zu einer geringeren Expression in gesundem Pankreasgewebe. Die Expression von CXCL12 in Pankreaskarzinomzelllinien zeigte sich auch in den durch uns durchgeführten ELISAs. In der Literatur als auch in unseren Experimenten zeigte sich eine Expression von CXCL12 in PanIN-Läsionen (Thomas et al. 2008). Die Rezeptorexpression (CXCR4 und CXCR7) wurde sowohl im gesundem Pankreas als auch im Pankreaskarzinom in neuronalen Strukturen detektiert. Auch in kultivierten humanen Schwannschen Zellen und murinen peripheren Nervenzellen wiesen wir die Expression von CXCR4 und CXCR7 im Immunoblot nach. Dieses Verteilungsmuster mit Expression des Liganden im Karzinom und Expression der entsprechenden Rezeptoren in perineuralen und neuralen Zellen legte eine Interaktion der Pankreaskarzinomzellen mit Schwannschen Zellen über die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse nahe.

Die vermutete Interaktion von Pankreaskarzinomzellen mit Schwannschen Zellen wurde durch Untersuchung der Wirkung des kanzerösen Mikromilieus auf Schwannsche Zellen genauer erforscht. Sowohl in Ko-Kultur mit Pankreaskarzinomzellen als auch unter Hypoxie zeigten Schwannsche Zellen eine Hochregulation der Expression von CXCR4 und CXCR7. Hierdurch wird die Hypothese unterstützt, dass Schwannzellen im Pankreaskarzinom CXCR4 und CXCR7 überexprimieren und so mit CXCL12 exprimierenden Pankreaskarzinomzellen interagieren.

Nachdem die Hypothese aufgestellt worden war, dass Pankreaskarzinomzellen CXCL12 exprimieren untersuchten wir die Wirkung von CXCL12 auf Schwannsche Zellen. Schwannsche Zellen zeigten im Rahmen von Chemotaxisassays eine durch rekombinantes CXCL12 induzierte

dosisabhängige Steigerung der Migration. Da Schwannsche Zellen CXCR4 und CXCR7 exprimieren, ist von einer CXCR4 und CXCR7 vermittelten Wirkung von CXCL12 auf Schwannsche Zellen auszugehen.

Die Inhibition von CXCR7 (nicht aber CXCR4) führte in Chemotaxis Assays zu einer Verminderung der Migration Schwannscher Zellen zu Pankreaskarzinomzellen. In Migration Assays führte sowohl die Inhibition von CXCR7 als auch von CXCR4, also beider Rezeptoren, zu einer verminderten Migration Schwannscher Zellen zu Tumorzellen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und den genannten Studien kann gefolgert werden, dass CXCR4 und CXCR7 exprimierende Schwannsche Zellen durch CXCL12 chemoattraktiv von Pankreaskarzinomzellen und den Vorläuferzellen des Pankreaskarzinoms rekrutiert werden.

Ähnlich der Schwannzell-Funktion im Rahmen der Nervenregeneration könnte so das Wachstum der Nerven in Richtung des Chemokingradienten gelenkt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie über Mikroglia im zentralen Nervensystem (Pukrop et al. 2013). Wurde Gehirngewebe in Ko-Kultur mit Mammakarzinomzellen kultiviert, „zogen“ die glialen Zellen Tumorzellen durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn hinein, bevor Tumorzellen aktiv das Gehirngewebe eindringen. (Pukrop et al. 2013).

Eine weitere Hypothese legt dem Phänomen der neuralen Invasion einen anderen Pathomechanismus zugrunde (Deborde et al. 2016); Hier wurde nach Kontakt mit Schwannschen Zellen eine Veränderung der Morphologie und der Aktivität von Pankreaskarzinomzellen beobachtet. Die Karzinomzellen verjüngten sich in Richtung des Schwannzellkontaktes und bildeten Ausläufer im Sinne einer beginnenden Migration. Darüber hinaus „zerteilten“ Schwannsche Zellen Krebszellcluster und förderten so die Migration einzelner Krebszellen in Richtung der Schwannschen Zellen (Deborde et al. 2016). Ein ähnliches Verhalten präsentieren Schwannsche Zellen im physiologischen Spektrum im Rahmen der Embryogenese, wo einzelne Astrozyten durch Schwannsche Zellen aus einem Konglomerat ausgelöst werden (Deborde et al. 2016).

Unabhängig von chemotaktischen Wirkungen untersuchten wir die Rolle der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse im Bezug auf Schmerzen. Hierzu wurde das Ausmaß der Schmerzen von Patienten mit einem Pankreaskarzinom über standardisierte Fragebögen erfasst und nach

Tumorresektion in den Pankreaskarzinomgewebeproben die Expression von CXCR4 und CXCR7 immunhistochemisch untersucht. Pankreaskarzinomgewebe von Patienten mit geringerem Schmerzempfinden zeigten eine gesteigerte CXCR4- und CXCR7-Expression im Vergleich zu Gewebeproben von Patienten mit einem höheren Schmerzscore. Pankreaskarzinomzellen könnten also über die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse analgetische Effekte ausüben. Diese Hypothese wurde durch weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gestützt. Hier zeigten Schwannsche Zellen unter Hypoxie eine verringerte Expression Nozizeptions-fördernder Rezeptoren (Demir et al. 2016). Darüber hinaus zeigten Schwannsche Zellen nach Behandlung mit rekombinantem CXCL12 eine gesteigerte Expression von Genen, welche analgetische Effekte fördern, und eine verminderte Expression von Genen, welche hyperalgetische Effekte codieren (Demir et al. 2016).

Konträr zu diesen Ergebnissen ist in der Literatur die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse häufig mit gesteigerten Schmerzen assoziiert (Shen et al. 2014). So bewirkte die intrathekale Gabe von CXCL12 eine Hyperalgesie im gesunden Tier (Liu et al. 2019). In Modellen unterschiedlicher Krankheitsentitäten zeigte die Blockade von CXCR4 eine Abnahme von neuropathischen Schmerzen, welche durch Ligation von spinalen Nerven (Liu et al. 2019) oder durch eine chronische- (Zhu et al. 2017) oder akute Pankreatitis induziert worden waren (Irie et al. 2017). Eine weitere Arbeit untersuchte die CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse bei Karzinom-getriggerten Schmerzen. Die Arbeitsgruppe um Shen erzeugte in Ratten artifizielle Knochenmetastasen. Diese verursachten eine Allodynie, welche durch die intrathekale Blockade von CXCL12 verringert wurde (Shen et al. 2014).

Eine mögliche Erklärung für die konträren Ergebnisse dieser Arbeit zu anderen Studien liegt potenziell in der dezidierten Untersuchung des Pankreaskarzinoms in dieser Arbeit. Die differenzierte wechselseitige Beeinflussung von Pankreaskarzinomzellen und humanen Schwannschen Zellen könnte eine andere intrazelluläre Signaltransduktion bedingen als im ZNS oder im Rahmen einer chronischen Pankreatitis. Die intrazelluläre Signaltransduktion der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse ist äußerst komplex. CXCR4 kann physiologisch sowohl als Monomer, als Homodimer und als Heterodimer mit CXCR7 vorliegen. Die verschiedenen Konstellationen aktivieren unterschiedliche intrazelluläre

Signalwege und somit Effekte (Szapowska et al. 2012; Choi et al. 2012; Rodriguez et de Teran. 2012; Wu et al. 2010; Drury et al. 2011; Ray et al. 2012; Decailot et al. 2011). Diskrepanzen verschiedener Arbeiten zu diesem Thema weisen darauf hin das die Art der Signaltransduktion nicht nur von der Quartärstruktur beeinflusst wird, sondern auch von der jeweiligen Zellart abhängt (Szapowska et al. 2012; Choi et al. 2012; Rodriguez et de Teran. 2012; Wu et al. 2010; Drury et al. 2011; Ray et al. 2012; Decailot et al. 2011). Die kontären Ergebnisse unserer Untersuchung des Pankreaskarzinom im Vergleich zu Studien des ZNS oder der Pankreatitis sind wahrscheinlich eine Folge der unterschiedlichen Signalwege, welche CXCL12 in verschiedenen Zelltypen und unter unterschiedlichen extrazellulären Zuständen induziert.

Unabhängig davon welche Prozesse dem primären Schwannzell-Karzinom-Kontakt folgen, zeigt diese Arbeit eine deutliche Beteiligung der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse an der Chemoattraktion von Schwannschen Zellen zu Pankreaskarzinomzellen. Zusammenfassend kann man feststellen, dass Pankreaskarzinomzellen über Sekretion von CXCL12 Schwannsche Zellen via CXCR4 und CXCR7 rekrutieren.

Allerdings ist kritisch anzumerken, dass nach aktuellem Stand der Wissenschaft die Sekretion von CXCL12 zur Rekrutierung von Schwannschen Zellen nur einer von vielen parallel ablaufenden, allerdings nicht gleichermaßen ausschlaggebenden, Prozessen der neuralen Invasion ist. In den Prozess der neuralen Invasion mit Rekrutierung von Makrophagen, Stellatumzellen, Fibroblasten und Schwannscher Zellen sind multiple Chemokine (CCL2, CCL5, CCL21, CXCL5 und CX3CL1), neurotrophe Faktoren (NGF, BDNF, NT3, NT4/5, IGF, GDNF), TGF, Midkine, multiple Matrix-Metalloproteinasen und weitere Moleküle involviert (Cavel et al. 2012; Azam et al. 2016; Tang et al. 2013; Chen et al. 2019).

Äquivalent zur klinisch-experimentellen CXCL12/CXCR4 Blockade in der Therapie der AML und CLL (Zaitseva et al. 2014) könnte die externe Modulation der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse, trotz der multiplen weiteren involvierten Moleküle, ein attraktiver therapeutischer Ansatz in der Therapie des Pankreaskarzinomes sein.

Darüber hinaus erweitern die Ergebnisse dieser Arbeit, unabhängig von der klinischen Bedeutung, unser Verständnis der Pathophysiologie der neuralen Invasion, neuropathischer Schmerzen und der Nerv-Tumor-Interaktionen im Pankreaskarzinom.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zu folgenden Erkenntnissen zusammengefasst werden:

- Humane intrapankreatische Neurone und Schwannsche Zellen exprimieren CXCR4 und CXCR7. Diese Rezeptoren binden CXCL12, das sowohl von Pankreaskarzinomzellen als auch deren Vorläuferzellen (PanIn-Läsionen) exprimiert wird.
- Humane Schwannsche Zellen migrieren gezielt zu Pankreaskarzinomzellen.
- Humane Schwannsche Zellen migrieren zu Tumorzellen in Abhängigkeit von der CXCL12-Konzentration.
- Die Blockade von CXCR7 hemmt die Migration von Schwannschen Zellen zu Karzinomzellen.
- Aus diesen Ergebnissen wurde zusammenfassend abgeleitet, dass Pankreaskarzinomzellen und auch deren Vorläufer Nerven über Chemoattraktion von Schwannschen Zellen rekrutieren und diese Prozesse die Grundlage für das Phänomen der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom bilden.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine potenzielle klinische Anwendung im Sinne einer Blockade der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse mit dem Ziel einer Hemmung der neuralen Invasion im Pankreaskarzinom.
- Die vielfältigen Interaktionen von CXCL12 und seinen Rezeptoren lassen einen tiefgreifenden Einfluss auf die Physiologie Schwannscher Zellen und Tumorzellen vermuten.
- Bevor eine klinische Anwendung diskutiert werden kann, benötigen wir weitere Studien, die beleuchten, welche Auswirkungen eine Blockade der CXCL12-CXCR4/CXCR7 Achse auf die Physiologie des Organismus hat.

Literatur

- Algül, H., R. M. Schmid. "Pancreatic cancer: a plea for good and comprehensive morphological studies." *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 20(2008) 713-715.
- Azam, S. H., C. V. Pecot. "Cancer's got nerve: Schwann cells drive perineural invasion." *J Clin Invest.* 126(2016) 1242-1244.
- Ballehaninna, U. K., R. S. Chamberlain. "Serum CA 19-9 as a Biomarker for Pancreatic Cancer - A Comprehensive Review." *Indian J Surg Oncol.*2(2011) 88-100.
- Bannasch, P. "Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. Preneoplasia in various non-hepatic tissues." *Carcinogenesis* 7(1986) 849-852.
- Barbieri, F., A. Bajetto, C. Porcile, A. Pattarozzi, G. Schettini, T. Florio. "Role of stromal cell-derived factor (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function." *J Mol Endocrinol.* 38(2007) 383-389.
- Bhangoo, S., M. Ripsch, D. Buchanan, R. Miller, F. White. „Increased chemokine signaling in a model of HIV1-associated peripheral neuropathy.“ *Mol Pain.*48(2009) 219-223.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, T. Springer. "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* 382(1996) 829-833.
- Bockman, D. E., M. Büchler, H. G. Beger. "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." *Gastroenterology* 107(1994) 219-230.
- Boldajipour, B., H. Mahabaleswar, E. Kardash, M. Reichman-Fried, H. Blaser, S. Minina, D. Wilson, Q. Xu, E. Raz. "Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration." *Cell.* 132(2008) 463-473.
- Boldajipour, B., M. Doitsidou, K. Tarbashevich, C. Laguri, S. R. Yu, J. Ries, K. Dumstrei, S. Thelen, J. Dörries, E. M. Messerschmidt, M. Thelen, P. Schwille, M. Brand, H. Lortat-Jacob, E. Raz. "Cxcl12 evolution-subfunctionalization of a ligand through altered interaction with the chemokine receptor." *Development* 138(2011) 2909-2914.
- Bucala, R. "Review Series-Inflammation & Fibrosis. Fibrocytes and Fibrosis." *QJM.* 105(2012) 505-508.
- Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard, T. J. Schall. "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med.* 203(2006) 2201-2213.
- Canals, M., D. J. Scholten, S. de Munnik, M. K. Han, M. J. Smit, R. Leurs. "Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking." *PLoS One.* 192(2012) 558-560.
- Carbajal, K.S., C. Schaumburg, R. Strieter, J. Kane, T. E. Lane. "Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis." *Proc Natl Acad Sci* 107(2010) 116-125.
- Cavel, O., O. Shomron, A. Shabatay, J. Vital, L. Trejo-Leider, N. Weizman, Y. Krelin, Y. Fong, R. J. Wong, M. Amit, Z. Gil. "Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF an activation of RET tyrosine kinase receptor." *Cancer Res.* 72(2012) 5733-5743
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, B. Altintas, I. E. Demir, U. Hinz, M. W. Muller, T. Giese, M. W. Buchler, N. A. Giese, H. Friess. "Pancreatic neuropathy and neuropathic pain-a comprehensive pathomorphological study of 546 cases." *Gastroenterology* 136(2009) 177-186.
- Chen, S. H., B. Y. Zhang, B. Zhou, C. Z. Zhu, L. Q. Sun, Y. J. Feng. "Perineural invasion of cancer: a complex crosstalk between cells and molecules in the perineural niche." *Am J Cancer Res.* 9(2019) 1-21.
- Chen, W. C., Y. S. Tzeng, H. Li, W. S. Tien, Y. C. Tsai. "Lung defects in neonatal and adult stromal-derived factor-1 conditional knockout mice." *Cell Tissue Res.* 342(2010) 320-326.

- Choi, W. T., S. Kumar, N. Madani, X. Han, S. Tian, C. Z. Dong, D. Liu, S. Duggineni, J. Yuan, J. G. Sodroski, Z. Huang, J. An. "A novel synthetic bivalent ligand to probe chemokine receptor CXCR4 dimerization and inhibit HIV-1 entry." *Biochemistry*. 51(2012) 7078-7086.
- Chong, S. W., L. M. Nguyet, Y. J. Jiang, V. Korzh. "The chemokine Sdf-1 and its receptor Cxcr4 are required for formation of muscle in zebrafish." *BMC Dev Biol*. 54(2007) 1100-1113.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouché, R. Guimbaud, Y. Bécouarn, A. Adenis, J. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardière, J. Bennouna, J. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Péré-Vergé, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux. "FOLFIRINOX vs. Gemcitabine for metastatic pancreatic Cancer" *N. Engl. J. Med*. 364(2011) 1817-1825.
- Crump, M. P., J. H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, M. Baggiolini, B. D. Sykes, I. Clark-Lewis. "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." *EMBO J*. 16(1997) 6996-7007.
- Cruz-Orengo, L., D. W. Holman, D. Dorsey, L. Zhou, P. Zhang, M. Wright, E. E. McCandless, J. R. Patel, G. D. Luker, D. R. Littman, J. H. Russell, R. S. Klein. "CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity." *J Exp Med*. 208(2011) 327-339.
- Cui, K., W. Zhao, C. Wang, A. Wang, B. Zhang, W. Zhou, J. Yu, Z. Sun, S. Li. "The CXCR4-CXCL12 pathway facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis." *J Surg Res*. 171(2011) 143-150.
- Dangi-Garimella, S., S. B. Krantz, M. A. Shields. "Epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer Progression" *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Transworld Research Network 2012. Chapter 5.
- Davis, D. A., K. E. Singer, M. De La Luz, M. Narazaki, F. Yang, H. M. Fales, R. Yarchoan, G. Tosato. "Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1 alpha in the circulation." *Blood*. 105(2005) 4561-4568.
- Deborde, S., T. Omelchenko, A. Lyubchik, Y. Zhou, S. He, W. F. McNamara, M. Chernichenko, S. Y. Lee, F. Barajas, C.H. Chen, R. L. Bakst, E. Vakiani, S. He, A. Hall, R. Wong. "Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion." *J Clin Invest* 126(2016) 1538-1554.
- Décaillot, F. M., M. A. Kazmi, Y. Lin, S. Ray-Saha, T. P. Sakmar, P. Sachdev. "CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration." *J Biol Chem*. 286(2011) 32188-32197.
- Demir, I. E., A. Boldis, P. L. Pfitzinger, S. Teller, E. Brunner, N. Klose, T. Kehl, M. Maak, M. Lesina, M. Laschinger, K. P. Janssen, H. Algül, H. Friess, G. O. Ceyhan. "Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion." *J Natl Cancer Inst*. 106(2014) 93-1120.
- Demir, I. E., E. Tieftrunk, S. Schorn, Ö. C. Saricaoglu, P. L. Pfitzinger, S. Teller, K. Wang, C. Waldbaur, M. U. Kurkowski, S. M. Wörmann, V. E. Shaw, T. Kehl, M. Laschinger, E. Costello, H. Algül, H. Friess, G. O. Ceyhan. "Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia." *Gut* 65(2016) 1001-1014.
- Demir, I. E., H. Friess, G. O. Ceyhan. "Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer." *Front Physiol* 3(2012) 97.
- Demir, I. E., K. Kujundzic, P. L. Pfitzinger, Ö. C. Sariacaoglu, S. Teller, T. Kehl, C. M. Reyes, L. S. Ertl, Z. Miao, T. J. Schall, E. Tieftrunk, B. Haller, K. N. Diakopoulos, M. U. Kurkowski, M. Lesina, A. Krüger, H. Algül, H. Friess, G. O. Ceyhan. "Early pancreatic cancer lesions suppress pain through CXCL12-mediated chemoattraction of Schwann cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(2017) 85-94.
- Demir, I.E., C. Jäger, A. M. Schlitter, B. Konkukiewitz, L. Stecher, S. Schorn, E. Tieftrunk, F. Scheufele, L. Calavrezos, R. Schirren, I. Esposito, W. Weichert, H. Friess, C. O. Ceyhan. "R0 Versus R1 Resection Matters after Pancreaticoduodenectomy, and Less after Distal or Total Pancreatectomy for Pancreatic Cancer." *Ann Surg*. 268(2018) 1058-1068.

- Dítě, P., M. Hermanová, J. Trna, I. Novotný, M. Ružička, M. Liberda, A. Bártková. "The role of chronic inflammation: chronic pancreatitis as a risk factor of pancreatic cancer." *Dig Dis.* 30(2012) 277-283.
- Domanska, U. M., R. C. Kruizinga, W. B. Nagengast, H. Timmer-Bosscha, G. Huls, E. G. de Vries, A. M. Walenkamp. "A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide." *Eur J Cancer.* 49(2013) 219-230.
- Drury, L. J., J. J. Ziarek, S. Gravel, C. T. Veldkamp, T. Takekoshi, S. T. Hwang, N. Heveker, B. F. Volkman, M. B. Dwinell. "Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(2011) 17655-17660.
- Dziembowska, M., T. N. Tham, P. Lau, S. Vitry, F. Lazarini, M. Dubois-Dalcq. "A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors." *Glia.* 50(2005) 258-269.
- Fernandez, E. J., E. Lolis. "Structure, function, and inhibition of chemokines." *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42(2002) 469-499.
- Foster, R., J. Jung, A. Farooq, C. McClung, M. S. Ripsch, M. P. Fitzgerald, F. A. White. "Sciatic nerve injury induces functional pro-nociceptive chemokine receptors in bladder-associated primary afferent neurons in the rat." *Neuroscience.* 183(2011) 230-237.
- Fulton, A. M. "The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer." *Curr Oncol Rep.* 11(2009) 125-131.
- Fusaroli, P., D. Kypraios, M. A. Eloubeidi, G. Caletti. "Levels of evidence in endoscopic ultrasonography: a systematic review." *Dig Dis Sci.* 57(2012) 602-609.
- Gahneh, P., E. Costello, J. P. Neptolemos. "Biology and management of pancreatic cancer." *Gut.* 56(2007) 1134-1152.
- Gao, Z., X. Wang, K. Wu, Y. Zhao, G. Hu. "Pancreatic stellate cells increase the invasion of human pancreatic cancer cells through the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis." *Pancreatology* 10(2010) 186-193.
- Gebauer, F., M. Tachezy, K. Effenberger, K. von Loga, H. Zander, A. Marx, J. T. Kaifi, G. Sauter, J. R. Izbicki, M. Bockhorn. "Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma." *J Surg Oncol.* 104(2011) 140-145.
- Gil, Z., O. Cavel, K. Kelly, P. Brader, A. Rein, S. P. Gao, D. L. Carlson, J. P. Shah, Y. Fong, R. J. Wong. "Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves." *J Natl Cancer Inst.* 102(2010) 107-118.
- Gomez, G., E. W. Englander, G. Wang, G. H. Greeley. "Increased expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, p48, and the Notch signaling cascade during acute pancreatitis in mice." *Pancreas* 28(2004) 58-64.
- Graham, G. J., M. Locati, A. Mantovani, A. Rot, M. Thelen. "The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors." *Immunol Lett.* 145(2012) 30-38.
- Guerreiro, R., Q. Santos-Costa, J. M. Azevedo-Pereira. "The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions." *Acta Med Port.* 24(2011) 967-976.
- Haege, S., C. Einer, S. Thiele, W. Mueller, S. Nietzsche, A. Lupp, F. Mackay, S. Schulz, R. Stumm. "CXC chemokine receptor 7 (CXCR7) regulates CXCR4 protein expression and capillary tuft development in mouse kidney." *PLoS One.* 814(2012) 1140-1154.
- Hao, M., J. Zheng, K. Hou, J. Wang, X. Chen, X. Lu, J. Bo, C. Xu, K. Shen, J. Wang. "Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression." *Biochem Pharmacol.* 84(2012) 204-214.
- Heinrich, E. L., W. Lee, J. Lu, A. M. Lowy, J. Kim. "Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells." *J Transl Med.* 68(2012) 448-462.
- Hernandez, L., M. A. Magalhaes, S. J. Coniglio, J. S. Condeelis, J. E. Segall. "Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis." *Breast Cancer Res.* 13(2011) 128-130.
- Hidalgo, M. "New insights into pancreatic cancer biology." *Ann Oncol.* 10(2012) 135-138.

- Hoffmeister, A., J. Mayerle, K. Dathe, J. Mössner, M. M. Lerch. "Method report to the S3 guideline chronic pancreatitis: definition, etiology, diagnostics and conservative, interventional endoscopic and surgical therapy of the chronic pancreatitis." *Z Gastroenterol.* 50(2012) 1225-1236.
- Hunger, C., V. Ödemis, J. Engele. "Expression and function of the SDF-1 chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development and regeneration." *Exp Cell Res.* 318(2012) 2178-2190.
- Irie, Y., M. Tsubota, H. Ishikura, F. Sekiguchi, Y. Terada, T. Tsujiuchi, K. Liu, M. Nishibori, A. Kawabata. "Macrophage-derived HMGB₁ as a Pain Mediator in the Early Stage of Acute Pancreatitis in Mice: Targeting RAGE and CXCL₁₂/CXCR₄ Axis." *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 12(2017) 693-707.
- Jaerve, A., F. Bosse, H. W. Müller. "SDF-1/CXCL12: its role in spinal cord injury." *Int J Biochem Cell Biol.* 44(2012) 115-128.
- Janowski, M. "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." *Cell Adh Migr.* 3(2009) 243-249.
- Kavanagh, D. P., N. Kalia. "Hematopoietic stem cell homing to injured tissues." *Stem Cell Rev.* 7(2011) 672-682.
- Keswani, S. C., M. Polley, C. A. Pardo, J. W. Griffin, J. C. McArthur, A. Hoke. "Schwann cell chemokine receptors mediate HIV-1 gp120 toxicity to sensory neurons." *Ann Neurol.* 54(2003) 287-296.
- Kilpatrick, L. A., J. Zhu, F. S. Lee, H. Lang. "Role of stromal cell-derived factor-1 expression in the injured mouse auditory nerve." *Otolaryngol Head Neck Surg.* 145(2011) 1007-1015.
- Koltsova, E. K., G. Kim, K. M. Lloyd, C. J. Saris, S. von Vietinghoff, M. Kronenberg, K. Ley. "Interleukin-27 receptor limits atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice." *Circ Res.* 111(2012) 1274-1285.
- Koshiba, T., R. Hosotani, Y. Miyamoto, J. Ida, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Kawaguchi, H. Kobayashi, R. Doi, T. Hori. "Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression." *Clin Cancer Res.* 6(2000) 3530-3535.
- Kumar, R, V. Tripathi, M. Ahmad, N. Nath, R. A. Mir, S. S. Chauhan, K. Luthra. "CXCR7 mediated G_i independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells." *Cell Immunol.* 272(2012) 230-241.
- Kury, P., H. Koller, M. Hamacher, C. Cornely, B. Hasse, H. W. Müller. "Cyclic AMP and tumor necrosis factor-alpha regulate CXCR4 gene expression in Schwann cells." *Mol Cell Neurosci.* 24(2003) 1-9.
- Lazarini, F., T. N. Tham, P. Casanova, F. Arenzana-Seisdedos, M. Dubois-Dalcq. "Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system." *Glia.* 42(2003) 139-148.
- Lee, E., J. Han, K. Kim, H. Choi, E. G. Cho, T. R. Lee. "CXCR7 mediates SDF1-induced melanocyte migration." *Pigment Cell Melanoma Res.* 26(2013) 58-66.
- Levoye, A., K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelier, B. Lagane. "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." *Blood.* 113(2009) 6085-6093.
- Li, F., H. Xu, Y. Zeng, Z. Q. Yin. "Overexpression of fibulin-5 in retinal pigment epithelial cells inhibits cell proliferation and migration and downregulates VEGF, CXCR4, and TGFB1 expression in cocultured choroidal endothelial cells." *Curr Eye Res.* 37(2012) 540-548.
- Liang, J. J., S. Zhu, R. Bruggeman, R. J. Zaino, D. B. Evans, J. B. Fleming, H. F. Gomez, D. S. Zander, H. Wang. "High levels of expression of human stromal cell-derived factor-1 are associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19(2010) 2598-2604.
- Lieberman, J., H. Sartelet, M. Flahaut, A. Mühlethaler-Mottet, A. Coulon, C. Nyalendo, G. Vassal, J. M. Joseph, N. Gross. "Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma." *PLoS One.* 7(2012) e43665.
- 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, G. O. Ceyhan. "The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study." *Ann Surg.* 260(2014) 900-907.

- Liu, Z. Y., Z. W. Song, S. W. Guo, S. J. He, S. Y. Wang, J. G. Zhu, H. L. Yang, J. B. Jiu. "CXCL12/CXCR4 signaling contributes to neuropathic pain via central sensitization mechanisms in a rat spinal nerve ligation model." *CNS Neurosci Ther.* 7(2019) doi10.1111
- Ma, M., J. Y. Ye, R. Deng, C. M. Dee, G. C. Chan. "Mesenchymal stromal cells may enhance metastasis of neuroblastoma via SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 signaling." *Cancer Lett.* 312(2011) 1-10.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, F. Balkwill. "Cancer-related inflammation." *Nature* 454(2008) 436-44.
- Marchesi, F., P. Monti, B. E. Leone, A. Zerbi, A. Vecchi, L. Piemonti, A. Mantovani, P. Allavena. "Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4." *Cancer Res.* 64(2004) 8420-8427.
- Marechal, R., P. Demetter, N. Nagy, A. Berton, C. Decaestecker, M. Polus, J. Closset, J. Deviere, I. Salmon, J. L. Van Laethem. "High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma." *Br J Cancer* 100(2009) 1444-1451.
- Mélik-Parsadaniantz, S., W. Rostène. "Chemokines and neuromodulation." *J Neuroimmunol.* 198(2008) 62-68.
- Miao, Z., K. E. Luker, B. C. Summers, R. Berahovich, M. S. Bhojani, A. Rehemtulla, C. G. Kleer, J. J. Essner, A. Nasevicius, G. D. Luker, M. C. Howard, T. J. Schall. "CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(2007) 15735-15740.
- Minina, S., M. Reichman-Fried, E. Raz. "Control of receptor internalization, signaling level, and precise arrival at the target in guided cell migration." *Curr Biol.* 17(2007) 1164-1172.
- Momcilović, M., M. Mostarica-Stojković, D. Miljković. "CXCL12 in control of neuroinflammation." *Immunol Res.* 52(2012) 53-63.
- Monnier, J., M. Boissan, A. L'Helgoualc'h, M. L. Lacombe, B. Turlin, J. Zucman-Rossi, N. Thérêt, C. Piquet-Pellorce, M. Samson. "CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells." *Eur J Cancer.* 48(2012) 138-148.
- Mori, T., R. Doi, M. Koizumi, E. Toyoda, D. Ito, K. Kami, T. Masui, K. Fujimoto, H. Tamamura, K. Hiramatsu. "CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer." *Mol Cancer Ther.* 3(2004) 29-37.
- Müller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verástegui, A. Zlotnik. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410(2001) 50-56.
- Na'ara, S., M. Amit, Z. Gil. "L1CAM induces perineural invasion of pancreas cancer cells by upregulation of metalloproteinase expression." *Oncogene* 38(2019) 596-608.
- Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, T. Kishimoto. "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382(1996) 635-638.
- Nair, S., T. F. Schilling. "Chemokine signaling controls endodermal migration during zebrafish gastrulation." *Science* 322(2008) 89-92.
- Najbauer, J., P. C. Huszthy, M. E. Barish, E. Garcia, M. Z. Metz, S. M. Myers, M. Gutova, R. T. Frank, H. Miletic, S. E. Kendall, C. A. Glackin, R. Bjerkvig, K. S. Aboody. "Cellular host responses to gliomas." *PLoS One.* 7(2012) e35150.
- Nakajima, K., S. Koizuka, A. Yanagisawa, S. Saito. "Radiofrequency thermocoagulation of the thoracic nerve root guided by high-speed real-time computed tomography fluoroscopy." *Anaesthesia* 67(2012) 675-676.
- Nakao, A., A. Harada, T. Nonami, T. Kaneko, H. Takagi. "Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer." *Pancreas* 12(1996) 357-361.
- Noda, M., Y. Omatsu, T. Sugiyama, S. Oishi, N. Fujii, T. Nagasawa. "CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice." *Blood* 117(2011) 451-458.
- O'Reilly, E. M., A. Perelshteyn, W. R. Jarnagin, M. Schattner, H. Gerdes, M. Capanu. "A single-arm, nonrandomized phase II trial of neoadjuvant gemcitabine and oxaliplatin in patients with resectable pancreas adenocarcinoma." *Ann. Surg.* 260(2014) 142-148.

- Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, B. Moser. "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." *Nature* 382(1996) 833-835.
- Odemis, V., B. Moepps, P. Gierschik, J. Engele. "Interleukin-6 and cAMP induce stromal cell-derived factor-1 chemotaxis in astroglia by up-regulating CXCR4 cell surface expression. Implications for brain inflammation." *J Biol Chem.* 277(2002) 39801-39808.
- Odemis, V., K. Boosmann, A. Heinen, P. Kury, J. Engele. "CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells." *J Cell Sci.* 123(2010) 1081-1088.
- Ohnishi, Y., T. Senda, N. Nandhagopal, K. Sugimoto, T. Shioda, Y. Nagai, Y. Mitsui. "Crystal structure of recombinant native SDF-1alpha with additional mutagenesis studies: an attempt at a more comprehensive interpretation of accumulated structure-activity relationship data." *J Interferon Cytokine Res.* 20(2000) 691-700.
- Palmer, D. H., D. D. Stocken, H. Hewitt, C. E. Markham, A. B. Hassan, P. J. Johnson. "A randomized phase 2 trial of neoadjuvant chemotherapy in resectable pancreatic cancer: gemcitabine alone versus gemcitabine combined with cisplatin." *Ann. Surg. Oncol.*, 14(2007) 2088-2096.
- Pillarsetti, K., S. K. Gupta. "Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction." *Inflammation* 25(2001) 293-300.
- Pukrop, T., F. Dehghani, H. N. Chuang, R. Lohaus, K. Bayanga, S. Heermann, T. Regen, D. Van Rossum, F. Klemm, M. Schulz. "Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way." *Glia* 58(2013) 1477-1489.
- Raggo, C., R. Ruhl, S. McAllister, H. Koon, B. J. Dezube, K. Früh, A. V. Moses. "Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Cancer Res.* 65(2005) 5084-5095.
- Rajagopal, S., J. Kim, S. Ahn, S. Craig, C. M. Lam, N. P. Gerard, C. Gerard, R. J. Lefkowitz. "Beta-arrestin-but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(2010) 628-32.
- Rao, S., R. Sengupta, E. J. Choe, B. M. Woerner, E. Jackson, T. Sun, J. Leonard, D. Piwnica-Worms, J. B. Rubin. "CXCL12 mediates trophic interactions between endothelial and tumor cells in glioblastoma." *PLoS One.* 7(2012) e33005.
- Ray, P., S. A. Lewin, L. A. Mihalko, S. C. Leshner-Perez, S. Takayama, K. E. Luker, G. D. Luker. "Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions." *Biochem J.* 442(2012) 433-442.
- Rodríguez, D., H. Gutiérrez-de-Terán. "Characterization of the homodimerization interface and functional hotspots of the CXCR4 chemokine receptor." *Proteins* 80(2012) 1919-1928.
- Rogers, C. D., N. Fukushima, N. Sato, C. Shi, N. Prasad, S. R. Hustinx, H. Matsubayashi, M. Canto, J. R. Eshleman, R. H. Hruban, M. Goggins. "Differentiating pancreatic lesions by microarray and QPCR analysis of pancreatic juice RNAs." *Cancer Biol Ther.* 5(2006) 1383-1389.
- Rollins, B. J. "Inflammatory chemokines in cancer growth and progression." *Eur J Cancer* 42(2006) 760-767.
- Roy, I., N. P. Zimmerman, A. C. Mackinnon, S. Tsai, D. B. Evans, M. B. Dwinell. "CXCL12 Chemokine Expression Suppresses Human Pancreatic Cancer Growth and Metastasis." *PLoS One.* 9(2014) e90400.
- Santiago, B., F. Baleux, G. Palao, I. Gutiérrez-Cañas, J. C. Ramírez, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Pablos. "CXCL12 is displayed by rheumatoid endothelial cells through its basic amino-terminal motif on heparan sulfate proteoglycans." *Arthritis Res Ther.* 8(2006) 43.
- Saur, D., B. Seidler, G. Schneider, H. Algul, R. Beck, R. Senekowitsch-Schmidtke, M. Schwaiger, R. M. Schmid. "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." *Gastroenterology* 129(2005) 1237-1250.

- Schmid, M. A., H. Takizawa, D. R. Baumjohann, Y. Saito, M. G. Manz. "Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes." *Blood* 118(2011) 4829-4840.
- Schönemeier, B., A. Kolodziej, S. Schulz, S. Jacobs, V. Hoell, R. Stumm. "Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain." *J Comp Neurol.* 510(2008) 207-220.
- Schonemeier, B., S. Schulz, V. Hoell, R. Stumm. "Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain." *J Neuroimmunol.* 198(2008) 39-45.
- Shen, W., X. M. Hu, Y. N. Liu, Y. Han, L. P. Chen, C. C. Wang, C. Song. "CXCL12 in astrocytes contributes to bone cancer pain through CXCR4-mediated neuronal sensitization and glial activation in rat spinal cord." *J Neuroinflammation* 11(2014) 10.1186-1193.
- Shen, X., A. Artinyan, D. Jackson, R. M. Thomas, A. M. Lowy, J. Kim. "Chemokine receptor CXCR4 enhances proliferation in pancreatic cancer cells through AKT and ERK dependent pathways." *Pancreas* 39(2010) 81-87.
- Shirozu, M., T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara, T. Honjo. "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics* 28(1995) 495-500.
- Shrikhande, S. V., S. G. Barreto, M. Goel, S. Arya. "Multimodality imaging of pancreatic ductal adenocarcinoma: a review of the literature." *HPB (Oxford)* 14(2012) 658-668.
- Siekman, A. F., C. Standley, K. E. Fogarty, S. A. Wolfe, N. D. Lawson. "Chemokine signaling guides regional patterning of the first embryonic artery." *Genes Dev.* 23(2009) 2272-2277.
- Silvestris, N., O. Brunetti, E. Vasile, F. Cellini, I. Cataldo, V. Pusceddu, M. Cattaneo, S. Partelli, M. Scartozzi, G. Aprile, A. Casadei Gardini, A. G. Morganti, V. Valentini, A. Scarpa, M. Falconi, A. Calabrese, V. Lorusso, M. Reni, S. Cascinu. "Multimodal treatment of resectable pancreatic ductal adenocarcinoma." *Crit Rev Oncol Hematol.* 111(2017) 152-165.
- Singh, A. P., S. Arora, A. Bhardwaj, S. K. Srivastava, M. P. Kadakia, B. Wang, W. E. Grizzle, L. B. Owen, S. Singh. "CXCL12/CXCR4 protein signaling axis induces sonic hedgehog expression in pancreatic cancer cells via extracellular regulated kinase- and Akt kinase-mediated activation of nuclear factor kappaB: implications for bidirectional tumor-stromal interactions." *J Biol Chem.* 287(2012) 39115-39124.
- Singh, S., S. K. Srivastava, A. Bhardwaj, L. B. Owen, A. P. Singh. "CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy." *Br J Cancer.* 103(2010) 1671-16719.
- Song, Z., G. Bhagat, M. Quante, G. H. Baik, F. Marrache, S. P. Tu, C. M. Zhao, D. Chen, A. J. Dannenberg, T. C. Wang. "Potential carcinogenic effects of cigarette smoke and Swedish moist snuff on pancreas: a study using a transgenic mouse model of chronic pancreatitis." *Lab Invest.* 90(2010) 426-435.
- Stumm, R., V. Höllt. "CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain." *J Mol Endocrinol.* 38(2007) 377-382.
- Sugiyama, T., T. Nagasawa. "Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells." *Inflamm Allergy Drug Targets.* 11(2012) 201-206.
- Sun, X., G. Cheng, M. Hao, J. Zheng, X. Zhou, J. Zhang, R. S. Taichman, K. J. Pienta, J. Wang. "CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression." *Cancer Metastasis Rev.* 29(2010) 709-722.
- Szpakowska, M., V. Fievez, K. Arumugan, N. Nuland, J. C. Schmit, A. Chevigné. "Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors." *Biochem Pharmacol.* 84(2012) 1366-1380.
- Tajima, H., H. Kitagawa, T. Tsukada, S. Nakanuma, K. Okamoto, S. Sakai. "A phase I study of neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine plus oral S-1 for resectable pancreatic cancer" *Mol. Clin. Oncol.* 1(2013) 768-772.

- Tang, D., D. Wang, Z. Yuan, X. Xue, Y. Zhang, Y. An, J. Chen, M. Tu, Z. Lu, J. Wei, K. Jiang, Y. Miao. "Persistent activation of pancreatic stellate cells creates a microenvironment favorable for the malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Int J Cancer* 132(2013) 993-1003.
- Tashiro, K., H. Tada, R. Heilker, M. Shirozu, T. Nakano, T. Honjo. "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." *Science* 261(1993) 600-603.
- Tempero, M. A., J. P. Arnoletti, S. Behrman, E. Ben-Josef, A. B. Benson, J. D. Berlin, J. L. Cameron, E. S. Casper, S. J. Cohen, M. Duff, J. D. Ellenhorn, W. G. Hawkins, J. P. Hoffman, B. W. Kuvshinoff, M. P. Malafa, P. Muscarella, E. K. Nakakura, A. R. Sasson, S. P. Thayer, D. S. Tyler, R. S. Warren, S. Whiting, C. Willett, R. A. Wolff. "Pancreatic Adenocarcinoma." *J Natl Compr Canc Netw.* 8(2010) 972-1017.
- Thomas, R. M., J. Kim, M. P. Revelo-Penafiel, R. Angel, D. W. Dawson, A. M. Lowy. "The chemokine receptor CXCR4 is expressed in pancreatic intraepithelial neoplasia." *Gut.* 57 (2008) 1555-1560.
- Townend, P., P. R. de Reuver, T. C. Chua, A. Mittal, S. J. Clark, N. Pavlakis, A. J. Gill, J. S. Samra. "Histopathological tumour viability after neoadjuvant chemotherapy influences survival in resected pancreatic cancer: analysis of early outcome data." *ANZ J Surg.* 20(2017) 206-209.
- Veldkamp, C. T., F. C. Peterson, A. J. Pelzek, B. F. Volkman. "The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin." *Protein Sci.* 4(2005) 1071-1081.
- Wang, Y., K. Luther. "Genetically manipulated progenitor/stem cells restore function to the infarcted heart via the SDF-1 α /CXCR4 signaling pathway." *Prog Mol Biol Transl Sci.* 111(2012) 265-284.
- Wilson, N. M., H. Jung, M. S. Ripsch, R. J. Miller, F. A. White. "CXCR4 signaling mediates morphine-induced tactile hyperalgesia." *Brain Behav Immun.* 25(2011) 565-573.
- Wu, B., E. Y. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov, R. C. Stevens. "Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists." *Science* 330(2010) 1066-1071.
- Yadav, V. R., B. Sung, S. Prasad, R. Kannappan, S. G. Cho, M. Liu, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal. "Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor." *J Mol Med* 88(2010) 1243-1253.
- Yan, X., S. Cai, X. Xiong, W. Sun, X. Dai, S. Chen, Q. Ye, Z. Song, Q. Jiang, Z. Xu. "Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation." *J Cell Biochem.* 113(2012) 1437-1446.
- Zabel, B. A., Y. Wang, S. Lewén, R. D. Berahovich, M. E. Penfold, P. Zhang, J. Powers, B. C. Summers, Z. Miao, B. Zhao, A. Jalili, A. Janowska-Wieczorek, J. C. Jaen, T. J. Schall. "Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands." *J Immunol.* 183(2009) 3204-3211.
- Zaitseva, L., M. Y. Murray, M. S. Shafat, M. J. Lawes, D. J. MacEwan, K. Bowles, S. A. Rushworth. "Ibrutinib inhibits SDF1/CXCR4 mediated migration in AML." *Oncotarget* 5(2014) 9930-9938.
- Zhi, Y., J. Chen, S. Zhang, X. Chang, J. Ma, D. Dai. "Down-regulation of CXCL12 by DNA hypermethylation and its involvement in gastric cancer metastatic progression." *Dig Dis Sci.* 57(2012) 650-659.
- Zhong, W., W. Chen, D. Zhang, J. Sun, Y. Li, J. Zhang, Y. Gao, W. Zhou, S. Li. "CXCL12/CXCR4 axis plays pivotal roles in the organ-specific metastasis of pancreatic adenocarcinoma: A clinical study." *Exp Ther Med.* 4(2012) 363-369.
- Zhou, B., G. Tsaknakis, K. E. Coldwell, C. P. Khoo, M. G. Roubelakis, C. H. Chang, E. Pepperell, S. M. Watt. "A novel function for the haemopoietic supportive murine bone marrow MS-5 mesenchymal stromal cell line in promoting human vasculogenesis and angiogenesis." *Br J Haematol.* 157(2012) 299-311.
- Zhu, H. Y., X. Liu, X. Miao, D. Li, S. Wang, G. Y. Gy. "Up-regulation of CXCR4 expression contributes to persistent abdominal pain in rats with chronic pancreatitis." *Mol Pain* 13(2017)

- Zhu, Y., F. Murakami. "Chemokine CXCL12 and its receptors in the developing central nervous system: emerging themes and future perspectives." *Dev Neurobiol.* 72(2012) 1349-1362.
- Zlotnik, A., O. Yoshie. "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity.* 12(2000) 121-127.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D. R. Littman. "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* 393(1998) 595-599.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan bedanken. Du hast mich von Anfang an gefordert und mir dadurch mein eigenes Potenzial gezeigt. Deine Motivation, Unterstützung und dein Ehrgeiz haben auf mich abgefärbt, diese Arbeit möglich gemacht und die Weichen für mein jetziges Leben gestellt.

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

Ich danke meinem Betreuer Priv. Doz. Dr. I. Ekin Demir für alle Mühe, Zeit, Arbeit, Unterstützung, Förderung und Fürsorge. Ich danke dir für alle Perspektiven die du mir gezeigt hast. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, AG Ceyhan. Dr. rer. nat. Timo Kehl, von dem ich gelernt habe wissenschaftlich zu arbeiten. Ulrike Bourquain, die immer helfend zur Seite stand. Elke Tieftrunk, die mir in jeder Situation mit Ihrem freundlichen, großzügigen und sozialen Wesen geholfen hat und mir damit ein Vorbild war und ist. Dr. Daniel Hartmann, Dr. Florian Liebl und Dr. Stephan Schorn für alle hilfreichen sachlichen und weitergreifenden Ratschläge.

Ich danke Tiago de Oliveira der immer wieder äußerst hilfreiche Blickwinkel eröffnete.

Ich danke meinem Mann für seine Unterstützung, das Korrekturlesen und die Hilfe bei der Formatierung.