

Der Einfluss des Fraktalkine/CX3CR1-Signalweges auf die Tumorzellproliferation und -migration beim Pankreaskarzinom

Jannik Winckler

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der
Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 17.11.2022 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.08.2023 angenommen.

Einführung

Obwohl die Krebserkrankung der Bauchspeicheldrüse durch ihre Seltenheit besticht, gehört sie zu den großen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts sowohl für die klinische Behandlung als auch für den derzeitigen Stand der Forschung. 2014 wurde durch das Robert Koch Institut 3,4% sämtlicher Krebsneuerkrankungen auf das Pankreaskarzinom zurückgeführt (ZfKD am RKI, Krebs in Deutschland). Ähnliche Daten zeigte Siegel et al. in den Krebsstatistiken für das Jahr 2015 in den USA [73]. Diese relative Seltenheit wird durch den rapiden, einschneidenden Verlauf und damit durch die massiven Auswirkungen auf Betroffene und Angehörige in den Schatten gestellt. So führte das Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert-Koch Institut 2014 das Pankreaskarzinom als vierthäufigste Krebstodesursache auf und prognostiziert 2016 eine weitere Zunahme der Morbiditäts- und Mortalitätszahlen (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, RKI). Aufbauend auf diesen Daten prognostiziert Quante et al. sogar, dass bereits 2030 das Pankreaskarzinom auf Platz 2 der Krebstodesursachen in Deutschland rückt und damit sowohl das Kolorektal- als auch das Mammakarzinom überholt haben wird. Dieser Zustand sei nicht allein durch die Zunahme an Risikopatienten zu erklären, sondern vor Allem durch den weiterhin ausstehenden wissenschaftlichen Durchbruch in Bezug auf Früherkennungsmerkmale und frühzeitigen Therapieoptionen [69].

Somit bleiben die Aussichten im Vergleich zu allen anderen, schwer therapierbaren Krebsarten etwa von Leber & Intrahepatischer Gallengang (5JÜ=18%) oder Lunge und Bronchus (5JÜ=18%) bei der Diagnose Pankreaskarzinom (5JÜ<8%) mit Abstand die schlechtesten [73].

Diagnose und Therapie des Pankreaskarzinoms

Der derzeitig gültigen S3 Leitlinie der deutschen Krebsgesellschaft zufolge, sollten die Leitsymptome „neuaufgetretene Oberbauch- und Rückenschmerzen“ oder „neuaufgetretener schmerzloser Ikterus“ Anlass zur diagnostischen Abklärung geben (S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Dez.

2021). Weitere Symptome wie etwa Inappetenz, Gewichtsverlust, Schwäche oder eine akute Pankreatitis ungeklärter Ätiologie, müssen an die Diagnose Pankreaskarzinom denken lassen. Auch Risikofaktoren müssen in die Diagnosestellung mit einbezogen werden, wie etwa das hohe Alter der Person, Tabak- und Alkoholkonsum, Adipositas, familiäre Vorbelastung, hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinome und chronische oder hereditäre Pankreatitis. Zu weiteren Risikogruppen zählen Patienten mit Krebsyndromen (Peutz-Jeghers Syndrom, FAMMM-Syndrom) oder Diabetes Mellitus Typ 2 [27, 72]. Mittels bildgebender Verfahren, wie Oberbauchsonographie, Endosonographie, Multidetektor-CT-Untersuchung oder MRCP sollten diese Symptome weiter abgeklärt werden. Kann sich im Verlauf der Diagnostik der initiale Verdacht erhärten, folgt das Staging anhand der UICC Kriterien wie folgt:

Tabelle 1: TNM Klassifikation				
Stadium	T	N	M	Resektabilität
0	Tis	0	0	Ja
Ia	1	0	0	Ja
Ib	2	0	0	Ja
IIa	3	0	0	zumeist
IIb	1-3	1	0	zumeist
III	4	0-2	0	Nein, ggf. nach Vorbehandlung
IV	1-4	0-2	1	Nein, ggf. nach Vorbehandlung
T0	Kein Anzeichen auf Primärtumor			
Tis	Carcinoma in situ			
T1	Tumor ≤ 2cm			
T2	Tumor > 2cm bis ≤ 4cm			
T3	Tumor ≥ 4cm			
T4	Tumor mit Befall des Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior und/oder der A. hepatica communis.			
N0	Keine regionale Lymphknotenmetastase			
N1	1-3 Regionale Lymphknotenmetastasen			
N2	≥4 Regionale Lymphknotenmetastasen			
M0	Keine Fernmetastasen			
M1	Fernmetastasen			
Kakar S, Pawlik TM, Allen PJ, Vauthey JN. Exocrine pancreas. Pancreatic adenocarcinoma. In:AJCC Cancer Staging Manual(8thEdition). Springer-Verlag, New York, USA (2016).				

Anhand dieser Faktoren sowie des Allgemeinzustandes (ECOG, Karnofsky-Index), des Lymphknotenstatus und des CA19-9 Serumlevel der Patienten, wird über die Operabilität, Resektabilität, und die systemische Therapie entschieden.

Tabelle 2: ECOG Performance Status	
Grad	Aktivitätsstatus
0	Normale uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung.
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, aber gehfähig; leichte körperliche Arbeit bzw. Arbeit im Sitzen (z.B. leichte Hausarbeit oder Büroarbeit) möglich.
2	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig; kann mehr als 50% der Wachzeit aufstehen.
3	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50% oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden.
4	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich; völlig an Bett oder Stuhl gebunden.
5	Tod

Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982;5:649-55. PMID: **7165009**

Weiterhin hilft die Einteilung in die Kategorien lokal begrenzt/primär resektabel (ca. 25%),borderline resektabel (ca. 20-25%), lokal-fortgeschritten bzw. lokal-fortgeschritten mit Fernmetastasen (ca. 50-60%) [64][38].

Tabelle 3: ABC-Kriterien der Resektabilität			
Resektabilität	A (anatomisch)	B (biologisch)	C (konditional)
Resektabel (R, resectable)	R-Typ A	Neg: R-Typ A	Neg: R-Typ A
		Pos: BR-Typ B	Pos: BR-Typ C
Grenzwertig- resektabel (BR, borderline resectable)	BR-Typ A	Neg: BR-Typ A	Neg: BR-Typ A
		Pos: BR-Typ AB	Pos: BR-Typ AC
Lokal-fortgeschritten (LA, locally advanced)	LA-Typ A	Neg: LA-Typ A	Neg: LA-Typ A
		Pos: LA-Typ AB	Pos: LA-Typ AC
A: "anatomical": Verhältnisse zu den Gefäßen			
B: "biological": CA19-9 > 500 IU/ml oder befallen regionäre Lymphknoten (PET-CT oder bioptisch)			
C: "conditional": ECOG-Performance-Status 2 oder höher			
Neg: negativ für die o.g. Parameter			
Pos: positive für die o.g. Parameter			
Weitere Kombinationen möglich: z.B. BR-BC, BR-ABC, LA-ABC etc.			
International Association of Pancreatology (IAP), Konsensus, S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Dez. 2021			

Diese Einteilung hat vor Allem zum Ziel die borderline-resektablen bzw. lokal fortgeschrittenen Tumorpatienten zu identifizieren, welche von neoadjuvanter Chemotherapie etwa durch FOLFIRINOX (Fluoruracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxalplatin) oder Gemcitabin bzw. einer erweiterten Resektion profitieren können [23].

Der Hauptteil der Patienten (ca. 50-60%) leidet bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung an nachweisbaren Fernmetastasen und damit an einer Systemerkrankung [30]. Dadurch scheidet lokale therapeutische Maßnahmen wie ein chirurgischer Eingriff für diese Patienten in der Erstlinientherapie zunächst aus. Für diese Patienten ergab sich vor allem durch die Anwendung von multimodalen Therapiekonzepten mit neoadjuvanter Radio- und/oder Chemotherapie für bis zu 30% die Möglichkeit einer sekundären Resektion mit dem Resultat einer mittleren-Überlebenswahrscheinlichkeit von durchschnittlich 20,1 Monaten. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit dem Zustand nach primär resezierten Pankreastumoren [29].

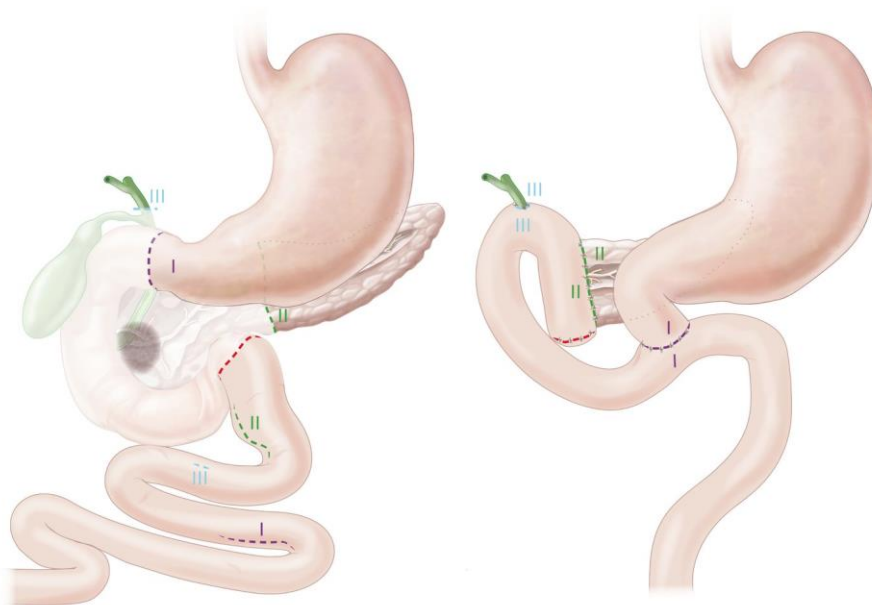
Zusammenfassend bleibt das Ziel bei der Bekämpfung des nicht metastasierten Pankreaskarzinoms die chirurgische Resektion und speziell das Ziel der R0 Resektion mit einem Sicherheitsabstand zu dem Tumorrund von mindestens 1mm [76].

Abhängig von der Lokalisation des Tumors, im Kopf (60-70%), im Korpus (10-20%) oder im Schwanz des Pankreas (10-20%) [79], kommen hierbei unterschiedliche chirurgische Verfahren zum Einsatz.

Pankreaskopfresektion: Kausch-Whipple vs. Traverso-Longmire

Bei der Lokalisation im Pankreaskopf wird entweder die (klassische) partielle Pankreatoduodenektomie nach Kausch-Whipple oder die Pylorus-erhaltende partielle Pankreatoduodenektomie nach Traverso-Longmire durchgeführt. Dabei ist letztere anzustreben, wenn die Tumorerfiltration dies zulässt, da somit den Patienten ein Großteil der physiologischen Magendarmpassage erhalten bleibt, ohne die onkologischen Langzeitergebnisse zu verschlechtern [36].

Abb. 1: pyloruserhaltenden partiellen Duodenopankreatektomie (nach Traverso-Longmire)

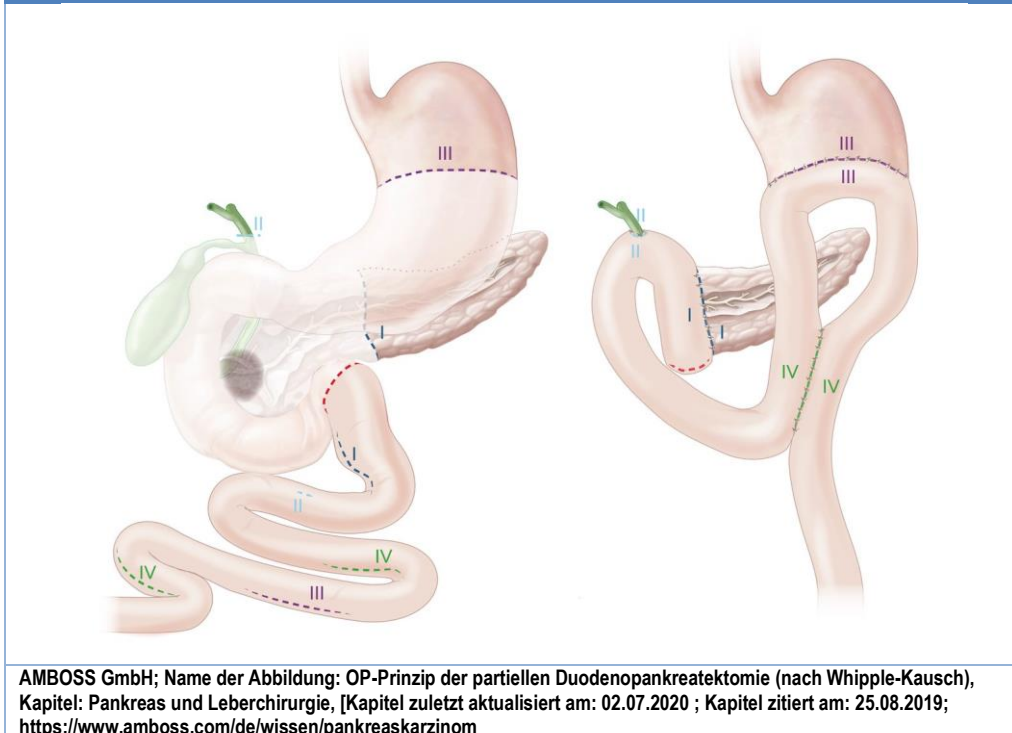


AMBOSS GmbH; Name der Abbildung: OP-Prinzip der pyloruserhaltenden partiellen Duodenopankreatektomie (nach Traverso-Longmire), Kapitel: Pankreas und Leberchirurgie, [Kapitel zuletzt aktualisiert am: 02.07.2020; Kapitel zitiert am: 25.08.2019; <https://www.amboss.com/de/wissen/pankreaskarzinom>

Bei der Pylorus-erhaltenden partiellen Pankreatoduodektomie nach Traverso-Longmire wird zunächst nach der queren Oberbauchlaparotomie, alternativ in spezialisierten Zentren unter Laparoskopie, die systematische Exploration der Bauchhöhle durchgeführt. Anschließend erfolgt die antegrade Cholezystektomie und Mobilisierung der rechten Kolonflexur, des Duodenums (Kocher Manöver) und des Pankreaskopfes. Nach Eröffnung der Bursa Omentalis und der Darstellung der Portal-Venösen-Gefäßachse (V. mesenterica sup., V. porta), erfolgt die Präparation des Ligamentum hepatoduodenale und die lokale Lymphadenektomie. Nach Absetzen des Ductus Choledochus und des postpylorischen Duodenums wird nun die erste Jejunumschlinge mobilisiert und in den Oberbauch verlagert. Im Anschluss erfolgt die Mobilisierung des Pankreaskopfes einschließlich des Processus uncinatus und die Resektion nach vorheriger Schnellschnittanalyse. Im nächsten Schritt erfolgt die retrokolische End-zu-Seit Pankreatikojejunostomie, die Anlage der bilio-digestiven Anastomose und schlussendlich die Duodeno-jejunostomie zumeist im Rahmen einer End-Seit-Anastomose mit einer Omega-, oder nach Roux-Y ausgeschalteten Jejunalschlinge [56].

Im Falle der Infiltration des Pylorus oder der Verdacht von ausgeprägtem Lymphknotenbefall sollte auf die radikalere Pankreatoduodektomie nach Kausch-Whipple zurückgegriffen werden.

Abb. 2: partiellen Duodenopankreatektomie (nach Whipple-Kausch)



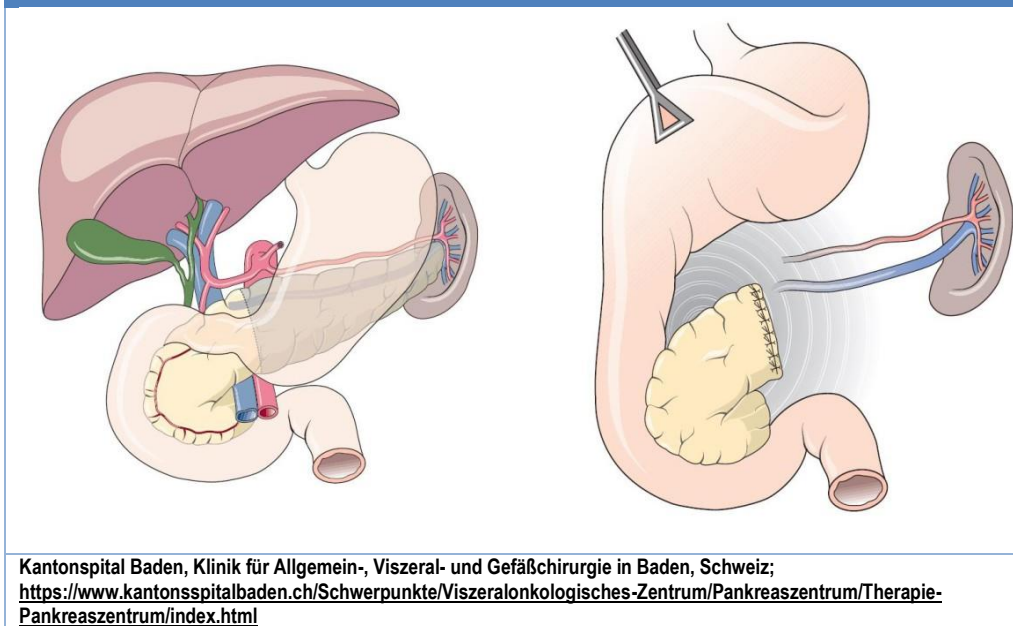
Hierbei erfolgt zusätzlich die gesamte Resektion des Duodenums, des distalen Magens sowie der ersten Jejunalschlinge [19, 56].

Der postoperative, zunächst intensivmedizinische Therapieplan besteht neben der Gabe von Antibiotika, Protonenpumpeninhibitoren und ggf. Octreotid, aus adäquater Analgesie (periduraler Schmerzkatheter), Kontrolle der exokrinen und endokrinen Pankreasaktivität sowie der Drainagen-Überwachung, dem zügigen Kostaufbau und Mobilisation. Komplikationen wie etwa neurovegetative Funktionsstörungen des Intestinaltraktes oder Lymphfisteln sind vor allem auf eine stark erweiterte Lymphadenektomie zurückzuführen, welche aus diesem Grund nicht empfohlen wird und keinen zusätzlichen onkologischen Vorteil bringt. Die Hauptkomplikation bleibt weiterhin die Pankreasfistel als Zeichen der Anastomoseninsuffizienz, welche selten eine erneute Laparotomie nach sich ziehen kann [19, 32, 47].

Pankreaslinksresektion

Im Falle eines resektablen Befalles des Pankreaskörpers oder -schwanzes wird eine Pankreaslinksresektion zusammen mit Splenektomie und hiliärer Lymphknotenentnahme unternommen.

Abb. 3: Pankreaslinksresektion mit Splenektomie



Zunächst erfolgt der laparotomische, zunehmend laparoskopische Zugang in die Bauchhöhle mit anschließender systematischer Exploration. Nach Eröffnung der Bursa omentalis wird zunächst der Truncus Coeliacus dargestellt und die A. lienalis disseziert. Im Weiteren erfolgt die Mobilisation und Resektion der Milz, der V. lienalis linksseitig der Pfortader, des Pankreasschwanzes und gegebenenfalls des Korpus bei vorheriger Schnellschnittanalyse und Lymphadenektomie [60, 78].

2003 zeigten Strasberg et al. die Möglichkeit auf, analog zur Entscheidung über die Radikalität der Resektion bei Pankreaskopfkarzinomen (Whipple vs. PD) auch im Falle der Pankreaslinksresektion eine Differenzierung vorzunehmen und weiterhin ein adäquaten Resektionsabstand sowie die notwendigen Lymphstrukturen zu erfassen. In Folge dessen, kam es zur Einführung des „radical antegrade modular pancreatosplenectomy procedure (RAMPS), welches abhängig von der Tumordinfiltration und Lymphknotenstatus eine antegrade und eine posteriore RAMPS unterscheidet. Bei letzterem wird eine deutlich radikalere Resektion durchgeführt und es kommt nicht nur zur Entfernung der Gerota-Faszie und des perirenen Fettes, sondern auch zur

Resektion der linken Nebenniere und das retroperitoneale Fettgewebes. Diese Differenzierung führte zu einer deutlichen Verbesserung des Gesamtüberlebens mit einer Fünfjahres-Überlebens-Rate von 35,5% [19, 61, 75].

Im Anschluss an die chirurgische Resektion erfolgt die adjuvante Chemotherapie in Abhängigkeit von Allgemeinstatus (ECOG) und Komorbidität. Dabei zeigt vor allem die adjuvante, modifizierte FOLFIRINOX-Therapie vielversprechende Resultate bei Patienten mit gutem Allgemeinstatus (ECOG 0-1) und erhöhte die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebenszeit von knapp 20% [2, 82] (2004) auf knapp 50% [17] (2018) nach erfolgreicher R0 Resektion. Als Alternative steht die Kombinationsgabe von Gemcitabin und (nab-)Paclitaxel zur Verfügung [81]. Bei reduziertem Allgemeinstatus (ECOG \geq 2) oder Unverträglichkeit der FOLFIRINOX-Therapie (Diarrhoe, Neutropenie, periphere Neuropathie) kann auf eine Gemcitabin-Monotherapie zurückgegriffen werden [17, 31].

Falls initial das Glycoprotein Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA19-9) als Serummarker positiv getestet wurde, wird das Serumlevel zur Therapie-, Verlaufs- und Rezidivkontrolle regelmäßig bestimmt [67].

Wichtige Faktoren, welche die weitere Prognose beeinflussen, zeigten Ozaki et al. in einer Studie mit 193 Patienten, nach kurativer Resektion. Ausschlaggebend für das weitere Überleben waren nicht nur Lymphknotenbefall, Größe des Tumors oder der Befall der Pfortader, sondern auch die Frage nach Infiltration der lokalen Nerven durch Tumorzellen [65] und der Befall des Plexus coeliacus. Dieses Phänomen wird als Neurale Invasion (NI) bezeichnet und wird derzeit als Hauptursache für die hohe Anzahl an Lokalrezidiven, Tumorausbreitung und dem Entstehen von neuropathischem Schmerz angesehen [13, 15, 20, 41, 42, 68]. Um diesem Zustand gerecht zu werden, wurde bereits 2011 die perineurale Invasion mit dem Erscheinen der siebten Edition der TNM-Klassifikation maligner Tumore durch die UICC offiziell in den Staging-Katalog aufgenommen. Dabei wird wie folgt unterschieden:

Tabelle 4: Perineurale Invasion, TNM-Klassifikation	
PnX	Perineurale Invasion nicht ermittelbar
Pn0	Keine perineurale Invasion feststellbar
Pn1	Perineurale Invasion feststellbar
<small>TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition, Leslie H. Sobin, Mary K. Gospodarowicz, Christian Wittekind, Wiley-Blackwell, New Jersey, 2011</small>	

Neurale Invasion

Zunehmend erfährt nicht nur die Tumorzelle, mit ihren genetischen Abweichungen, Aufmerksamkeit durch die Forschung, sondern auch ihre Mikroumgebung. Dass es im Rahmen der Tumorentstehung zu strukturellen Veränderungen im Gewebe kommt, ist lange bekannt. Wie beeinflussen sich diese beiden unterschiedlichen Faktoren und welche Mediatoren spielen hierbei eine Rolle?

Im Rahmen des Pankreaskarzinoms konnten massive Veränderungen des Stroma gezeigt werden. Dabei kommt es nicht nur zu fibrotischen sondern auch neuronalen Veränderungen wie etwa neurale Hypertrophie, erhöhte Nervendichte, pankreatische Neuritis und nicht zuletzt die neurale Invasion durch Karzinomzellen [12-16, 20, 22, 21, 71].

Ein Fokus der aktuellen Forschung liegt dabei auf der neuralen Invasion (NI) durch Tumorzellen, welche in bis zu 100% der PDAC-Fälle nachgewiesen werden konnte [13, 51, 53] und mittlerweile als eine der Hauptursachen für die Entstehung von Lokalrezidiven und neuropathischem Schmerz sowie Tumorwachstum und Ausbreitung angesehen wird [15, 20, 41, 42, 68].

Die NI erfolgt dabei, nicht wie ursprünglich angenommen als eine Form der lymphatischen Ausbreitung [48] bzw. Weg des geringsten Widerstandes, sondern als Resultat von differenzierten Tumor-Neuron Interaktionen, in der englischen Fachliteratur auch „Neurotropism“ genannt. Dieser Begriff beschreibt die neuronal gesteuerte Tumorausbreitung und auch das gezielte Wachstum von Nervenfasern in Richtung der Tumorzellen [8]. Dieses Phänomen wird als Ursache für die Neurale Invasion durch Tumorzellen angesehen und konnte bereits in einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumorentitäten ,wie etwa des Gallenganges [6], der Prostata [80], dem Rektum [44], von Kopf und Hals [4] und dem Pankreas [71] festgestellt werden.

Für Tumore der Prostata und des Kopfes bzw. Halses fand die NI bereits 2009 den Einzug in die TNM Klassifikation des UICC und 2011 folgte das Pankreaskarzinom (TNM Classification of malignant tumours, Wiley-Blackwell, New Jersey,2009/11). Zur Objektivierung der NI kann weiterhin zwischen Epineuraler Tumor Assoziation (ENA), Perineuraler Invasion (PNI) und Endoneuraler Invasion (ENI) unterschieden werden und der NI Severity Score als prognostischer Faktor, abhängig von der Anzahl der betroffenen Nerven(n) und der oben genannten NI-Entität, wie folgt berechnet werden [12, 51, 52]:

$$\text{NI SEVERITY SCORE} = n(\text{ENA}) \times 1 + n(\text{PNI}) \times 2 + n(\text{ENI}) \times 3$$

Dabei bleibt festzuhalten, dass das Auftreten von neuraler Invasion mit einer deutlich schlechteren Prognose, sowohl in Bezug auf den rezidivfreien Zeitraum als auch auf die mittlere Überlebenszeit, vergesellschaftet bleibt und als unabhängiger prognostischer Faktor anzusehen ist [51] [71].

Aufgrund der anatomischen Lage des Pankreas und seiner Nähe zu den vegetativen sympathischen sowie parasympathischen Nervenstrukturen des Plexus coeliacus ist es nicht verwunderlich, dass es zu einem hohen Maße an zellulär neuronalen Interaktionen sowohl mit intra- als auch extrapancreatischen Nerven kommt [26]. Dabei konnten bereits eine Vielzahl von parakrinen Kommunikationswegen zwischen Neuron und Pankreastumorzellen festgestellt werden, wie etwa das zur GDNF-Familie gehörende Artemin und sein Rezeptor GFR α 3, welche in signifikant erhöhtem Maße sowohl in PDAC-Zelllinien als auch in Pankreastumorgewebe nachgewiesen werden konnte. Artemin ist bekannt für seine neuroproliferativen und neuroregenerativen Eigenschaften sowie der Koordinierung von axonaler Ausbreitung sympathischer Nervenfasern [3, 33]. 2006 konnten Ceyhan et al. erstmalig die oben genannte Überexpression von Artemin und GFR α 3 in den Pankreastumorzellen darstellen, sowie die Zunahme des invasiven Potentials von PDAC-Zelllinien als Reaktion auf eine direkte Artemin-Stimulation nachweisen.

2006 erweiterte sich das Spektrum der neurotrophen Faktoren im Falle des Pankreaskarzinoms weiter. So konnte eine vermehrte Expression von Artemin [15] und später von Nerve Growth Factor (NGF) [16] durch PDAC-Zelllinien und deren neurotrophe Wirkung auf isolierte Nervenzellen des Plexus myentericus nachgewiesen werden. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich zunächst feststellen, dass neurotrophe Faktoren einen maßgeblichen Anteil am neuroinvasiven Verhalten von Pankreastumorzellen tragen [20]. Weiterhin lässt sich die Vermutung nahe legen, dass die neurale Antwort auf lokale Nervenschädigung und die damit einhergehende Ausschüttung von neuroregenerativen Faktoren einen Kreislauf einleitet, in welchem diese Faktoren PDAC-Zellen zu gezielter neuraler Invasion veranlassen und damit zu weiterer Entzündung und Verletzung neuralem Gewebes führen [7, 15, 16, 20, 28, 86].

Im diesem Kontext konnten Müller et al. bereits 2001, nachdem Ihnen die Ähnlichkeiten zwischen der Migration und Metastasierung von Brustkrebszellen mit dem

Bewegungsmuster von Leukozyten auffielen, nachweisen, dass so genannte „Chemokine“ zur Metastasierung von Tumorzellen beitragen [63].

Chemokine

Chemotaktische Zytokine, oder kurz „Chemokine“, sind Botenstoffe, welche Immunabwehrzellen veranlassen sich aus dem Blut, in das Gewebe zu begeben (Adhäsion und Chemotaxis). Dabei wirken sie sowohl auf die Migrationsfähigkeit, als auch direkt auf die Aktivität von Immunabwehrzellen ein. Eingeteilt werden die etwa 50 bekannten Chemokine in 4 Klassen. Abhängig von der Anzahl und dem Abstand zwischen den Cystein-Aminosäuren wird zwischen C-Familie, der CC-Familie, der CXC-Familie und der CX3C-Familie unterschieden [87].

Seitdem die Vermutung aufkam, „Chemokine“ würden eine wichtige Rolle in der gezielten Tumorzellenausbreitung spielen, wurden viele Vertreter der Chemokinfamilien untersucht. Unter Anderem lenkten Marchesi et al. 2008 die Aufmerksamkeit auf das Chemokin-Rezeptor-paar CX3CL1 und seinen einzig bekannten Rezeptor CX3CR1 im Rahmen des duktales Pankreaskarzinoms.

Das Chemokinrezeptorpaar CX3CL1/CX3CR1 und seine Rolle im PDAC

Seit der Entdeckung der CX3C-Familie durch Bazan et al., erfährt das Chemokin CX3CL1 durch sein Mitwirken bei allergischen Asthma, Atherosklerose, rheumatoide Arthritis, kolorektale, hepatische und nephrologische Erkrankungen, hohe Aufmerksamkeit [18]. Dabei ist, im Gegensatz zu anderen Chemokinen, festzuhalten, dass:

1. CX3CL1 sowohl in membrangebundener, wie in löslicher Form vorkommt [5].
2. CX3CL1 eine hohe Affinität zu seinem einzigen Rezeptor CX3CR1 aufweist [37].

CX3CL1 ist in der Fachliteratur auch unter dem Namen Neurotactin [66] oder Fractalkine bekannt. Dabei handelt es sich um das am meisten exprimierte Chemokin im Nervensystem. Es wird mit einer 7-transmembran Struktur hauptsächlich von Endothelzellen, Neuronen und Astrozyten gebildet. Durch ADAM10- [35] bzw. ADAM17-Proteinase [25] wird es abgespalten und in seine lösliche Form überführt. Sein hoch spezifischer Rezeptor CX3CR1 konnte auf hämatopoetischen Zellen, wie Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten als auch auf Mikroglia, nachgewiesen werden [1, 5, 10, 37, 66]. Im Hinblick auf die neuronale Immunantwort, scheint CX3CL1 und sein Rezeptor eine besonders wichtige Rolle einzunehmen [10].

Seitdem der Verdacht aufkam, dass Chemokine an der Tumormobilisation und Wachstum beteiligt sein könnten, wurde die Expression von zahlreichen Chemokinrezeptoren durch PDAC Zellen bestätigt [43, 46, 83]. Diese Erkenntnisse veranlassten Marchesi et al. 2008 die Rolle von Fraktalkine und seinem Rezeptor im Fall des PDAC zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass sowohl PDAC-Zelllinien als auch chirurgische Resektate von PDAC im hohen Maße CX3CR1 exprimieren. Darauf aufbauend, konnte in vitro gezeigt werden, dass die Stimulation von CX3CR1 durch humanes Fractalkine auch im Fall des Pankreaskarzinoms zu chemotaktischer Adhäsion und Migration führt. Es wird vermutet, dass der Mechanismus der Adhäsion G-Protein gesteuert über β -Integrin, zur Aktivierung von Fokaler Adhäsions Kinase (FAK) führt. Im Mausmodel konnte nach s.c. Transplantation von PDAC-Zelllinien gezeigt werden, dass es zu einer starken Zunahme von neuraler Invasion kommt, wenn die PDAC-Zelllinien CX3CR1 exprimieren. Diese Ergebnisse wurden anhand einer prospektiven Studie an 59 Pankreaskarzinompatienten bestätigt. Schließlich konnte eine starke Korrelation zwischen erhöhter CX3CR1-Expression, dem Grad der NI und früheren Zeitpunkt von Lokalrezidiven festgestellt werden [55].

Diese Ergebnisse untermauern die Annahme, dass:

1. PDAC Tumorzellen in lokale Nerven und Ganglien eindringen (NI) und dadurch, nach der Resektion, für die hohe Zahl und den frühen Zeitpunkt der Lokalrezidive, respektive die niedrige 5-Jahresüberlebenszeit nach der Operation verantwortlich sind [20, 51, 68, 71, 77].
2. Fraktalkine/CX3CR1 eine wichtige Rolle in der Mediation der Neuralen Invasion beim PDAC spielt und somit ein vielversprechendes Ziel für zukünftige therapeutische Interventionen bietet.

Ziel der Studie

Die Neurale Invasion, als Ursache von frühzeitigem Lokalrezidiv, Tumorausbreitung und Ausprägung von neuropathischem Schmerz im Fall des Pankreaskarzinoms stellt bis zum heutigen Tag ein großes Problem in der Beherrschung dieser Krankheit dar. Neueste Studien zeigen den Einfluss von Fractalkine und seinem Rezeptor CX3CR1 auf die Migration und Adhäsion von PDAC zu neuronalen Strukturen auf und unterstreichen ihre zentrale Rolle im Prozess der Neuralen Invasion. Leider haben diese Erkenntnisse bis dato kaum Einzug in die klinische Therapie des Pankreaskarzinoms gehalten. Anhand dieser Studie wurde versucht weitere Erkenntnisse über die Stellung von Fractalkine und seinem Rezeptor im Pankreaskarzinom zu erhalten und die Wirkungsweise des stereochemischen CX3CR1-Inhibitors AZD8797-Compound, als potentielles neues Therapeutikum, zu evaluieren.

Material

Geräte

- (1) Fotometer Multiskan EX, Thermo Electron Corporation (Braunschweig, GER)
- (2) Inkubator, Galaxy 170s, New Brunswick an Eppendorf company (Wesseling-Berzdorf,GER)
- (3) Inkubator, Hera Cell 150, Thermo Science (Bonn, GER)
- (4) Eppendorfpipetten 1000µl, 200µl, 10µl, Eppendorf Research (Wesseling-Berzdorf,GER)
- (5) Mikroskop, Observer D1, Zeiss (Oberkochen, GER)
- (6) Mikroskop, Primo Vert, Zeiss (Oberkochen, GER)
- (7) Mirkoskop, Axiovert 40, CFL, Zeiss(Oberkochen, GER)
- (8) Pipet Boy, Integra (Fernwald, GER)
- (9) Sterile Werkbank, Hera Safe, Thermo Science (Bonn, GER)
- (10) Thermomixer Comfort 1,5ml, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf, GER)
- (11) Ultraschallbad Bioruptor, Diagenode (New Jersey, USA)
- (12) Vortex, IKA Works, MS1 Minishaker (Wilmington, USA)
- (13) Feinwaage, Sartorius Analytic AG (Göttingen, GER)
- (14) Wasserbad, Aqualine AL 18, Lauda (Lauda Könoigshofen, GER)
- (15) Western Blot Kammer, Biometra (Göttingen, GER)
- (16) Western blott Blotting Kammer, Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, GER)
- (17) Filmentwickler Optimax, Protec Processor-Technology (Oberstenfeld,GER)
- (18) Zentrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf,GER)
- (19) Zentrifuge, 5810 R, Eppendorf (Wesseling- Berzdorf,GER)

Reagenzien

- (1) RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH (Karlsruhe, GER)
- (2) Trypsin-EDTA-Lösung, Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
- (3) Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, GER)
- (4) Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, GER)
- (5) RIPA Puffer, Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
- (6) Penicillin-Streptomycin, Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
- (7) U0126 Monoethanolat, Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
- (8) Natriumorthovanadat, Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
- (9) MTT, Carl Roth, (Karlsruhe, GER)
- (10) HCl (25%)-Isopropanol, Technische Universität München
- (11) MEM Amino Acids (50x), PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
- (12) Hank's BSS, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
- (13) L-Glutamin 200mM, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
- (14) PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich (Steinheim, GER)
- (15) Cell Dissociation Solution, non-enzymatic, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- (16) DMSO, Dimethylsulfoxid, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
- (17) ECM-Gel, Extracellular Matrix Gel, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- (18) FCS, Fetal Calves Serum, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- (19) HEPES, Sigma Life Science (St. Louis, USA)
- (20) Antikörper, Anti-human-CX3CR1-Antibody, Torrey Pines Biolabs Inc. (New Jersey, USA)
- (21) Antikörper, IgG anti-rabbit, Invitrogen (Darmstadt, GER)
- (22) Antikörper, IgG anti-mouse, Invitrogen (Darmstadt, GER)

- (23) Antikörper, IgG anti GAPDH, Santa Cruz Biotechnologie (Heidelberg, GER)
- (24) Antikörper, anti-pERK1/2-Antikörper, Cell Signaling Technology, Inc. (Boston, USA)
- (25) Antikörper, anti-ERK1/2-Antikörper, Cell Signaling Technology, Inc. (Boston, USA)
- (26) Antikörper, ECL Anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase, GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
- (27) Kollagenase typ 2 270u/mg, Worthington (New Jersey, USA)
- (28) Fractalcine, human recombinant, BioVision Inc., (San Francisco, USA)

Trenngel 7,5% (5ml)	2,46ml H2O 1,25ml 4xLowerTris 1,25ml Rotiphorese Gel 30 (Roth) 60µl 10%APS 20µl TEMED (Roth)
Sammelgel 4% (5ml)	3,05ml H2O 1,25ml 4xUpperTris 0,67ml Rotiphorese Gel 30 (Roth) 15µl 10%APS 10µl TEMED (Roth)
4x Lower Tris (1l)	181,65g 1,5M Tris 0,4% SDS 1l H2O pH 8,8
4x Upper Tris (1l)	60,8g 1,5M Tris 0,4% SDS 1l H2O pH 6,8
2x LSB	4% SDS 20% Glycerol 10% beta-Mercapto-Ethanol 0,004% Bromphenol Blau 0,125M Tris-HCl pH 6,8
Laufpuffer 10x SDS (1l)	30,3g 250mM Tris 144g 1,92M Glycin 1% SDS 1l H2O
Anodenpuffer1 (1l)	36,3g 0,3M Tris 200ml Methanol 1l H2O pH 10,4

Anodenpuffer2 (1l)	3,03g 0,025M Tris 200ml Methanol 1l H2O pH 10,4
Kathodenpuffer (1l)	0,03g 0,025M Tris 5,24g 0,04M gamma-Amino- Capronsäure 200ml Methanol Mit H2O auffüllen auf 1l pH 9,4
7,5%Milch/0,1%Tween20 (1l)	75g Milchpulver (Roth T145.4) 10ml 10x PBS 1ml Tween20
PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 10,14mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄

Verbrauchsmaterialien

- (1) 6 well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickhausen, GER)
- (2) 96 well cell culture plate, Greiner Bio One (Frickhausen, GER)
- (3) Falcon, Ratiolab (Dreieich, GER)
- (4) Einmal-Injektions-Kanüle Gr.14, Gr. 1, B. Braun Medical AG (Emmenbrücken, Schweiz)
- (5) Migration Assay dish, Fluo Dish TM, 35mm, WPI (Sarasota, USA)
- (6) Pipetten, Serological Pipette, Greiner Bio One (Frickhausen, GER)
- (7) Pipetten, Tip One, Star Lab (Hamburg, GER)
- (8) Reaktionsgefäße, Safe Seal, Sarstedt (Nürnbrecht, GER)
- (9) Medizinischer Röntgen Film, FujiFilm Europe GmbH (Düsseldorf, GER)

- (10) Zellkulturflaschen, Cellstar, 75cm², Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
- (11) Zellschaber, Cell Lifter, Costar (Washington, USA)

Methoden

Zellkultur

Es wurden vier verschiedene humane Pankreaskarzinomzelllinien verwendet (AsPC-1, PANC-1, SU.86.86 und T3M4). Diese wurden entweder von ATCC erworben oder freundlicher Weise durch Dr. R.S. Metzgar (Durham, NC, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 Medium mit 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/mL Penicillin und 100µg/mL Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

AZD8797-Compound Vorbereitung

Von der Substanz AZD8797-Compound (MW: 403,6g/mol), welche von der Firma AstraZeneca zur Verfügung gestellt wurde, wurden 40,4mg in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Von dieser Stammlösung AZD8797-Compound (100mmol/L) wurden durch weitere Verdünnungsschritte in FCS-freiem RPMI-1640 Medium die Arbeitskonzentrationen 80nM, 160nM, 240nM erstellt.

MTT Assay

Prinzip

Um die mitochondriale Aktivität und damit indirekt die Proliferationsrate der PDAC-Zellen zu testen wurde das MTT-Assay nach dem Standardprotokoll von T.Mosmann [62] durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen, welche von dem Ausgangsstoff MTT (3-(4, 5-methylthiazol- 2-yl)-2, 5-diphenyl-tertzoliumbromid den Tertazoliumring abspalten. Dieser fällt als Salz aus und wird durch saures Isopropanol (40mM HCl in 96% Isopropanol) in Lösung gebracht. Die Optische Dichte dieser Lösung

wird bei 570nm durch ein Fotometer bestimmt. Anhand der gemessenen Dichte wird auf die Menge der aktiven d.h. lebenden Zellen geschlossen und somit untersucht, ob eine Behandlung mit Fraktalkine, CX3CR1-Antikörper oder AZD8797-Compound einen Effekt auf das Überleben und die Proliferation der Zellen hat.

Durchführung

PANC-1, T3M4, SU.86.86 und AsPC-1 Zellen wurden in einer Dichte von 1000 Zellen/well auf 96-well Platten übertragen und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellreihen für zwei Stunden mit Fraktalkine, anti-human-CX3CR1-Antikörper (Torrey Pines Biolabs Inc., N.J. USA) oder mit AZD8797-Compound behandelt. Dabei wurden folgende Konzentrationen getestet:

Fraktalkine	10 ng/ml ,50 ng/ml ,100ng/ml
CX3CR1-Antikörper	0,25 µg/ml
AZD8797-Compound	80 nM, 160 nM, 240 nM

Sämtliche Behandlungsreihen wurden in 5%-FCS erstellt. Um eine mögliche Interaktion auszuschließen, wurden die o.g. AZD8797-Compound Konzentrationen auch in FCS freien Nährmedien angesetzt. Die Kontrollen wurden mit äquivalenten Verdünnungskonzentrationen an DMSO in RPMI behandelt. Nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit wurde das RPMI-1640 Medium von den 96-well-Platten entfernt und die Zellen für 4 Stunden mit 50µg/well MTT-Lösung (5mg/ml MTT-Stammlösung in PBS) behandelt. Daraufhin wurde sämtliche MTT-Lösung entfernt und das ausgefallene Formazansalz durch saures Isopropanol in Lösung gebracht. Die optische Dichte wurde bei 570nm fotometrisch bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten erstellt. Um ein zytotoxischen Effekt des in der CX3CR1-Antikörper-Lösung enthaltenen Natriumazids auszuschließen wurden die Zellreihen T3M4 und AsPC-1 jeweils mit 0,1% NaN₃ behandelt und unter gleichen Bedingungen untersucht.

Scratch Assay

Prinzip

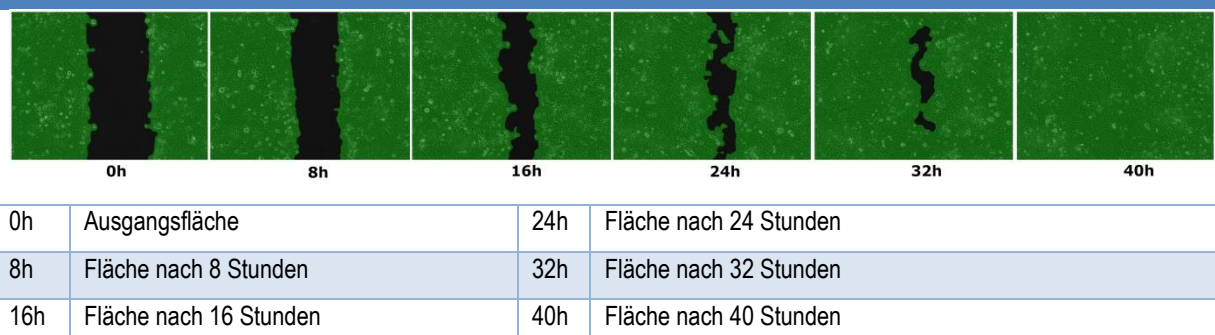
Die ungerichtete Zellmigration wurde mittels Scratch Assay [49] untersucht. Bei diesem Assay werden in einen konfluenten Monolayer an Zellen, eine ca. 1mm breite Linie mittels Pipettenspitze gezogen und somit die Zellen entlang dieses Striches entfernt. Es entsteht ein ca. 1mm breiter Spalt im Monolayer. Nun wird die Zeit gemessen, bis diese freie „scratch“-Fläche zwischen den beiden Zellfronten durch migrierende Zellen geschlossen wird und weiterhin, ob die Behandlung der Zellen mit CX3CR1-Antikörper oder AZD8797-Compound einen Effekt auf diese ungerichtete Migration hat.

Durchführung

Es wurden PANC-1 und T3M4 Zellen in einer 6-well-plate ausgesät und inkubiert bis sich ein konfluent Monolayer gebildet hatte. Nun wurden die Zellen für zwei Stunden mit 0,25 µg/ml bzw. 0,5µg/ml anti-human-CX3CR1-Antikörper (Torrey Pines Biolabs Inc., N.J., USA) in FCS-freiem RPMI-1640 Medium oder mit 80nM bzw.160nM AZD8797-Compound (in 5%-FCS haltigem RPMI-1640 Medium) behandelt. Nach der zweistündigen Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und jeweils drei grade Linien mittels 200µl Pipettenspitzen, stets auf einheitlicher Höhe, durch den Monolayer gezogen. Um Zellabfall zu entfernen, wurden die 6-well-Platten zweimalig mit PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 2ml RPMI-1640 Medium und 25µL/mL 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid Puffer (HEPES) versetzt.

Die mikroskopische Aufnahme der Zellmigration wurde für die Dauer von 40 Stunden in Abständen von 0, 8, 16, 24, 32 und 40 Stunden durchgeführt.

Abb. 4: Scratch-Assay zeitlicher Verlauf (0-40 Stunden)



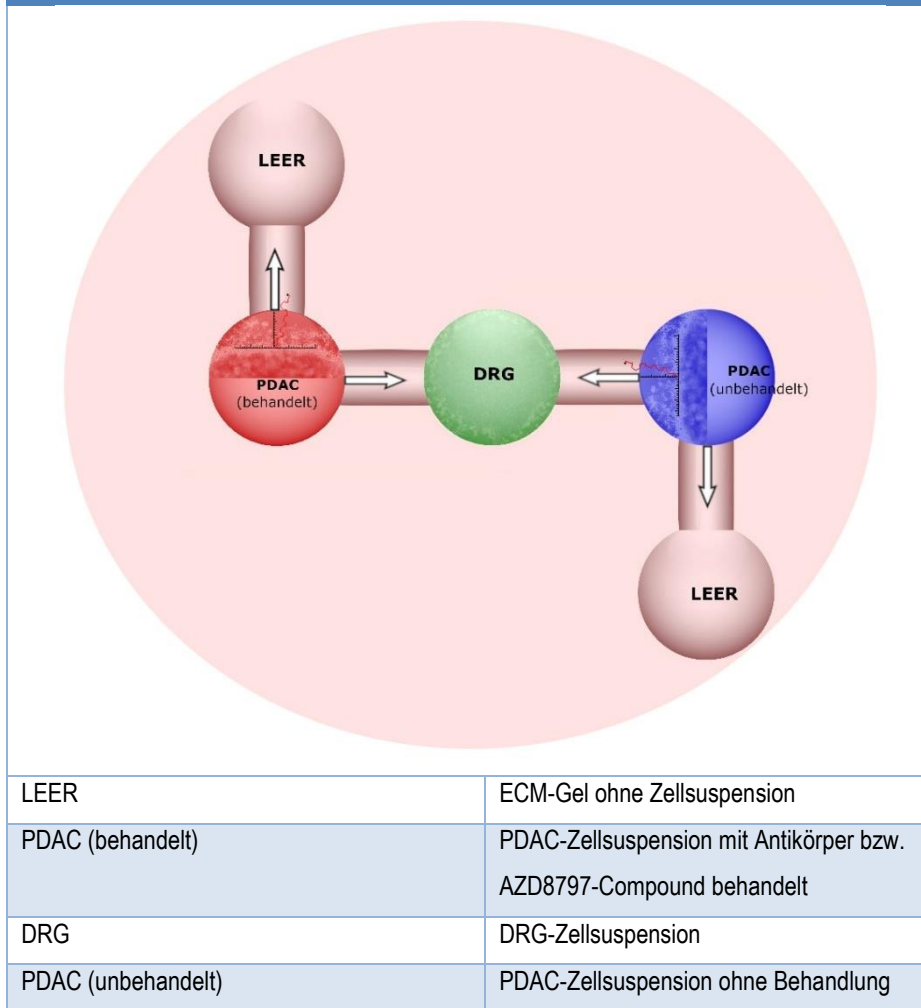
Hierfür wurde ein Zeiss Observer D1 System, ausgestattet mit einer CO2 Kammer, einer AxioCam Kamera und einem planneolar 10/0.3 PH1 M27 Objektiv verwendet. Die Aufnahmen wurden bei 100x Vergrößerung vorgenommen. Die Bestimmung der freien „scratch“ Fläche wurde durch Wimasis Image Alalysis durchgeführt. Um die Größe der zellfreien Fläche zu vereinheitlichen, wurde der zeitliche Migrationsverlauf relativ zur jeweiligen Ausgangsfläche des „Scratches“ bezogen, der Verlauf als Area under the curve (AUC) berechnet und statistisch mit der unbehandelten Kontrolle verglichen.

3D Migration Assay

Prinzip

Die gerichtete Zellmigration wurde durch die 3D Migration Methode untersucht. Diese Methode ist besonders gut geeignet eine Umgebung zu schaffen, welche möglichst nahe an der strukturellen Umgebung in vivo liegt. Die Zellen werden in einem Strukturgel (ECM) suspendiert, welches die extrazelluläre Matrix simuliert und wie folgt platziert:

Abb. 5: Migration-Assay Übersicht



Über einen festgesetzten Zeitraum konnte nun die Zellbewegungen an den jeweiligen Zellfronten untersucht und quantifiziert werden. Aus diesen Werten ließen sich sowohl richtungsunabhängige Parameter wie die Richtungsgenauigkeit (Directionality), die Migrationsgeschwindigkeit (Velocity), akkumulierte Distanz (acc. dist.), euklidische Distanz (eucl. dist.) und vor allem der richtungsabhängige Forward-Migration-Index relativ zur X-Achse (x-FMI) ermitteln. Diese Parameter konnten nun zwischen behandelten und unbehandelten Zellsuspensionen bzw. Zellsuspension und leerem Struktur gel verglichen und ausgewertet werden.

Durchführung

Zunächst wurden, wenige Tage alten, Rattenjungtieren unter dem Mikroskop die dorsalen Wurzelganglien (Spinalganglien; „dorsal root ganglia/DRG“)

entnommen in eisgekühltem Minimum Essential Media (MEM) überführt. Nach Zentrifugierung wurde die flüssige Phase abgesaugt und die DRGs mit 900µl Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), sowie 100µl Kollagenase 2 für 30min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und somit die Kollagenkapsel der DRGs aufgelöst. Weiterhin wurden die DRG mehrfach durch eine blaue und eine gelbe Kanüle aspiriert und damit in Suspension gebracht. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die DRGs mit PBS gewaschen und anschließend in extrazelluläre Matrix (ECM)-Gel überführt.

Die PDAC-Zelllinien T3M4 und SU.86.86 Zellen wurden für 2 Stunden entweder mit 0,25µg/mL, 0,5µg/mL anti-human-CX3CR1-Antikörper (Torrey Pines Biolabs Inc., NJ, USA), 160nM AZD8797-Compound behandelt, oder für 2h in FCS-freiem Medium gehalten (unbehandelt). Pro Versuch wurden 100.000 Zellen, sowohl behandelte als auch unbehandelte Zellen in extrazelluläres Matrix (ECM)-Gel überführt.

25µL der DRG-Suspension wurde in die Mitte einer Petrischale gesetzt. Im Abstand von 1mm wurden links der DRG-Zellen 25µL behandelte und rechts 25µL unbehandelte PDAC Zellen in ECM-Gelsuspensionen aufgetragen. Zur Kontrolle wurden weiterhin an diese PDAC Zellsuspensionen im Abstand von 1mm jeweils 25µL leeres ECM-Gel aufgetragen. Schließlich wurden die ECM-Geltropfen mit leeren 1µL großen ECM-Gelbrücken verbunden. Nach kurzer 10 minütiger Polymerisationszeit wurde 2ml Neurobasalmedium, versetzt mit 100U/mL Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2% B27 und 0,5 mmol/L L-Glutamin, hinzugegeben. Nach 72 Stunden wurde der Migrationsverlauf mittels Zeiss Observer D1 System, mit CO₂ Inkubationskammer, AxioCam Kamera und plan-neoluar 10/0.3 PH1 M27 Objektiv aufgezeichnet. In einem Zeitraum von 14 Stunden wurde bei einer hundertfachen Vergrößerung alle 15 Minuten eine Aufnahme jeder Migrationsfront durchgeführt. Der Verlauf von 30 Zellen pro Migrationsfront wurde durch das Manual-tracking-tool (Version: 2005/06/15, Fabrice Cordelires, Institut Curie, Orsay, France) aufgezeichnet und durch das Chemotaxis-tool (Chemotaxis and Migration Tool 2.0 © ibidi GmbH, Version 1.0) über ImageJ (Version 1.45a) ausgewertet.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch das Chemotaxis and Migration Tool 2.0 der Firma IBIDI GmbH. Folgende Parameter wurden untersucht:

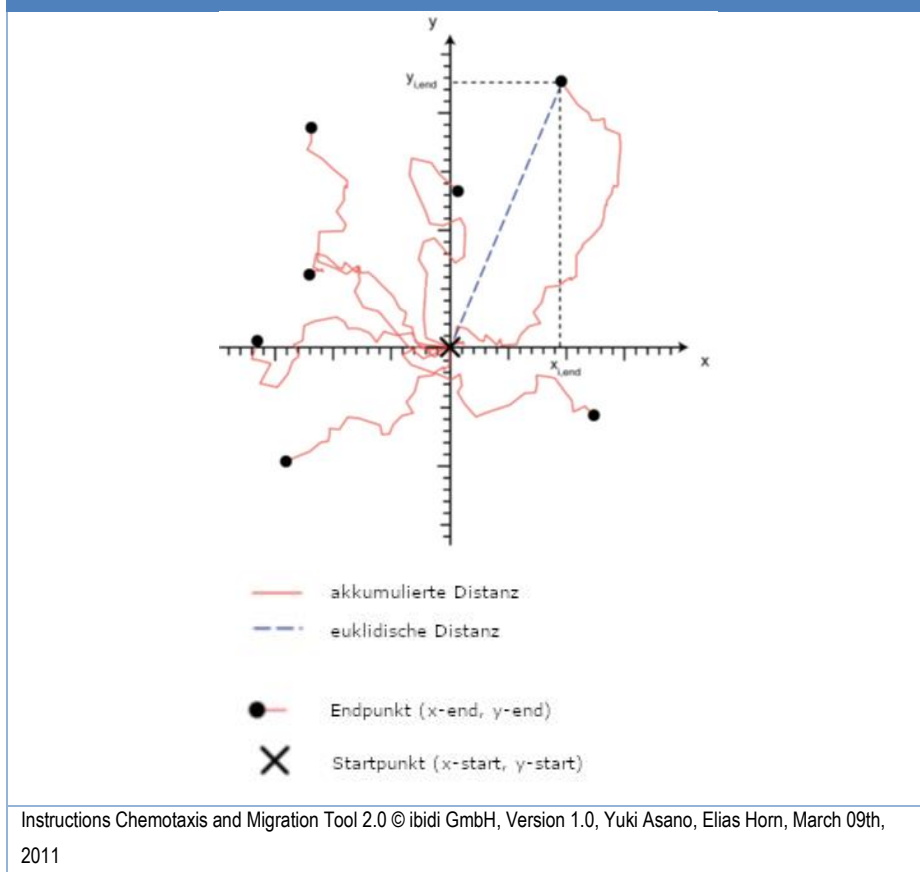
Die Migrationsgeschwindigkeit (Velocity):

beschreibt die durchschnittliche Bewegungsgeschwindigkeit der untersuchten Zellen unabhängig von der Ausbreitungsrichtung in nm/min.

Die akkumulierte Distanz (akk. Dist.):

beschreibt die gesamte, zurückgelegte Strecke während die *euklidische Distanz* (eucl. Dist) als Strecke zwischen Ausgangs- und Endpunkt innerhalb des beobachteten Zeitraumes dargestellt wird. Beide Werte werden in nm ausgewertet.

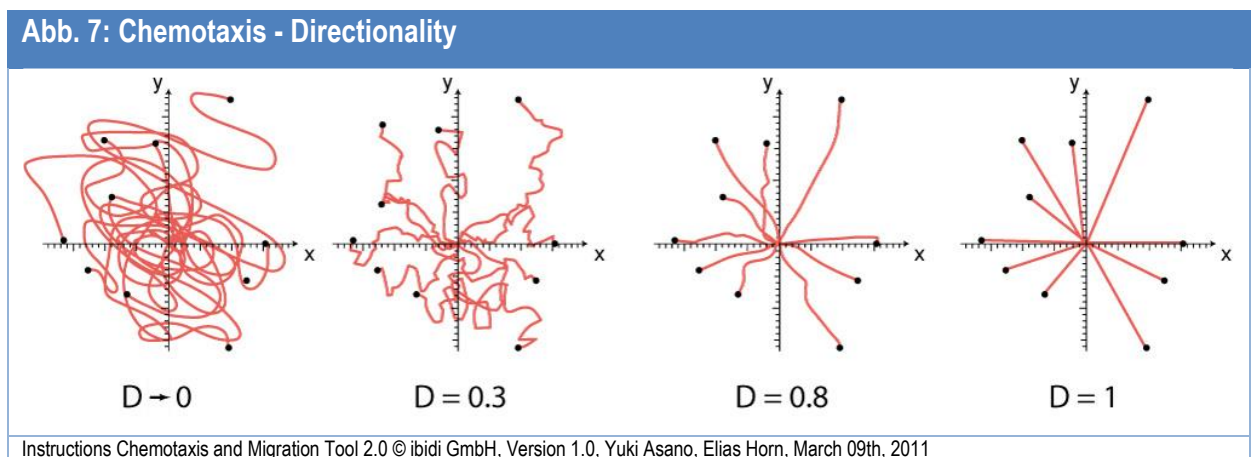
Abb. 6: Chemotaxis - akk./eucl. Distanz



Die Richtungsgenauigkeit (Directionality):

$$D_i = \frac{d_{i,\text{euclid}}}{d_{i,\text{accum}}}$$

Die Richtungsgenauigkeit wird als Abhängigkeit von euklidischer Distanz zur akkumulierten Distanz berechnet und stellt als Größe von 0 bis 1 die Richtungsgenauigkeit der Zellbewegungen dar.



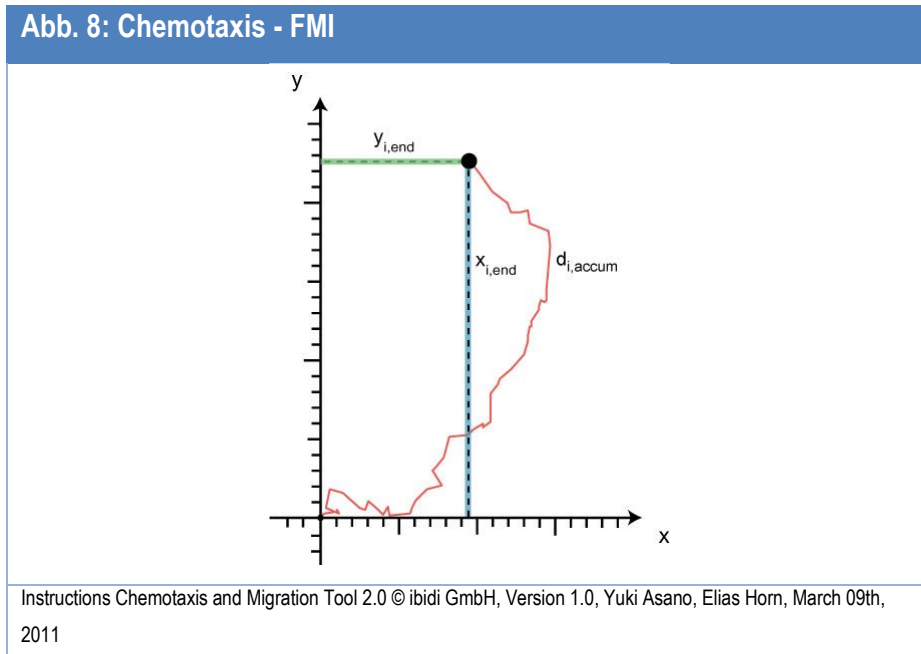
Die Richtungsgenauigkeit kann ausschließlich als erster Hinweis auf eine zielgerichtete Migrationstendenz interpretiert werden, wohingegen die Berechnung des Forward-Migration-Index(FMI) eine deutlichere Aussage zulässt.

Der Forward-Migration-Index (X_{FMI} bzw. Y_{FMI}):

$$X_{FMI} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{x_{i, \text{end}}}{d_{i, \text{accum}}}$$

$$Y_{FMI} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_{i, \text{end}}}{d_{i, \text{accum}}}$$

Der FMI quantifiziert das richtungsabhängige Bewegungsmuster der untersuchten Zellen relativ zur X-Achse (x-FMI) bzw. Y-Achse (y-FMI) und gilt als Parameter für die Effektivität der gerichteten Migration.



Dabei beschreibt ein hoher FMI ein starkes Migrationsverhalten entlang der jeweiligen Achse.

Erstellen von Zelllysaten und Western-blot-analyse

Die Zelllysate und Western-blot-analyse wurde nach dem Protokoll von Königer J. et al. [45] durchgeführt. Dabei wurden AsPC-1 Zellen in einer Dichte von 1000 Zellen pro Well auf einer 6-well Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Im nächsten Schritt wurde für 48 Stunden das 5%FCS-RPMI-1640 Medium durch FCS-freies RPMI-1640 Medium ersetzt. Eine Stunde vor der Lysaterstellung wurden die Zellen entweder mit 0,5µg/mL CX3CR1-Antikörper, in FCS-freiem Medium, oder 10µM U0126 Monoethanolat (Sigma Aldrich, Steinheim, GER) in FCS-freiem Medium, behandelt. Bei U0126 Monoethanolat handelte es sich um einen hoch selektiven ERK1 und ERK2 Inhibitor. Nach der Behandlung durch 100ng/ml FKN, wurden die Zelllysate in folgenden Zeitabständen erstellt: 0, 5, 10, 20 und 60 Minuten nach der FKN-Behandlung. Für die Zellyse, wurde das RPMI-1640 Medium durch 200µL, eisgekühlten Radioimmunoprecipitation assays

(RIPA) Puffer, mit 10mM Natriumorthovanadat und einem Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) ersetzt.

Im weiteren Verlauf wurden die Zellen mittels Zellschaber und 1000µl Pipetten aus den 6-Well-Platten entnommen und direkt durch flüssigen Stickstoff auf -80°C herabgekühlt. Schließlich wurden die Zellen in drei Zyklen für jeweils 10 Sekunden im Ultraschallbad weiter homogenisiert und für die anschließende Western blot Analyse bei -15°C gelagert.

Western blot Analyse

Prinzip

Mittels Western blot Analyse können Proteine, wie etwa das für den Proliferationssignalweg wichtige ERK1 und ERK2 bzw. seine aktive Form das phosphorylierte pERK1 und pERK2, nachgewiesen und quantifiziert werden. Hierfür wurden Zellysate von behandelten bzw. unbehandelten PDAC Zellen erstellt. Diese wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die zu analysierenden Proteine durch selektive Antikörper markiert. Mittels speziellen Immunfluoreszenzmarkern und fluoreszenz sensitiven Filmen wurden die Proteinbanden aus dem Gel auf einen Film überführt. Dieser wurde entwickelt und schließlich die Intensität der entwickelten Proteinbande durch das Densitometrie-tool über Image J quantifiziert.

Durchführung

Zunächst wurde die Proteinkonzentration anhand von BSA-Vergleichslösungen mittels Pierce BSA Protein Assay Kit der zu untersuchenden Zellysate bestimmt. 30µg Zellprotein pro Ladetasche wurden durch Erhitzung denaturiert und zusammen mit 6µl LSB auf das Sammelgel aufgetragen. Die LSB Lösung wurde als Lauffrontmarkierung benutzt. Die Gelelektrophorese wurde bei 20mA/Gel für 2 Stunden durchgeführt. Daraufhin wurden die Proteinbanden in der Blotkammer für 1 Stunde bei 70mA auf die PVDF Membran übertragen.

Anschließend erfolgte die Antikörperbehandlung wie folgt:

1. Anti-pERK1/2 Antikörper rabbit (Cell signaling, Boston USA) 1:1000 über Nacht in 5ml 7,5%Milch/0,1% Tween
2. 3x 10min 7,5% Milch
3. Anti-rabbit Antikörper (Invitrogen, Darmstadt GER)1:2000 für 45min in 5ml 7,5%Milch/0,1%Tween
4. 2x 5min waschen mit PBS/0,1%Tween
5. 1min ECL-Lösung (GE Healthcare, Buckinghamshire UK)
6. Entwicklung

Im Anschluss wurde die Membran mit Stripping Buffer bei 80°C im Wasserbad von den Antikörpern befreit. Unphosphoryliertes ERK1/2 wurde als Ladekontrolle verwendet. Dabei wurden erneut die Schritte 1-6 durchlaufen. Als ersten Antikörper wurde anti-ERK1/2 Antikörper verwendet. Die Bandenintensität wurde mittels Densitometrie-tool über ImageJ quantifiziert.

Statistische Analyse

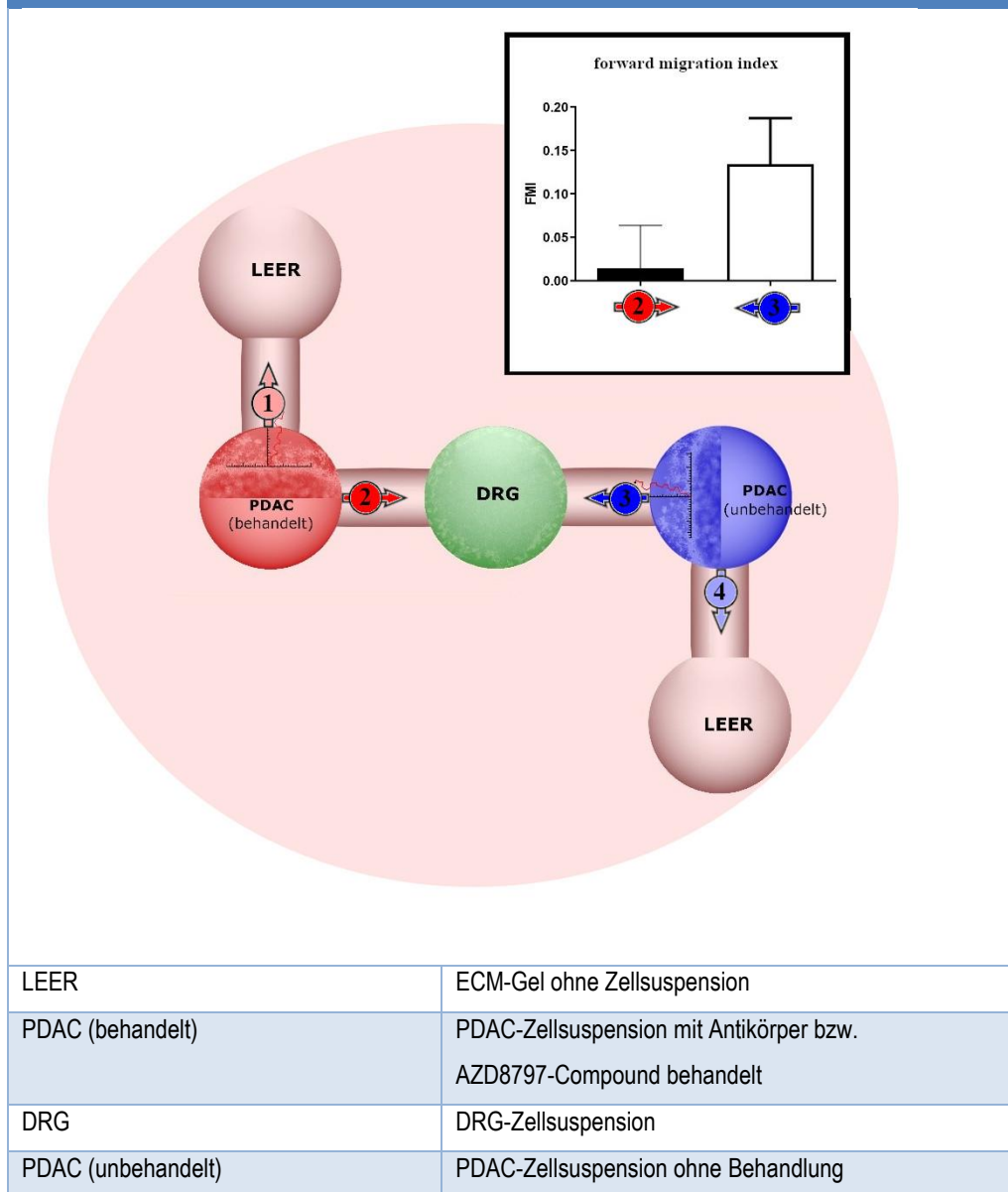
Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 9.3.1 für Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen ($n \geq 4$) wurde der Mann-Whitney-U Test (M.W.U-Test) für den Vergleich zwischen nicht parametrisch verteilten Gruppen angewandt. Der Student's-t-test (S-T-Test) wurde für den Vergleich von zwei Gruppen ($n=3$) benutzt. Für den Vergleich von mehreren Gruppen (z.B. Scratch-Assay oder western blot) wurde auch der „One-way ANOVA“ (O-W-A-Test) herangezogen. Dabei gilt für alle statistischen Auswertungen $p < 0,05$ als Signifikanzniveau.

Ergebnisse

PDAC-Zelllinien zeigen ein deutlich gesteigertes, zielgerichtetes Migrationsverhalten in Richtung Nervenzellen.

Marchesi et al. zeigten bereits 2008, dass CX3CR1 ein vielversprechendes Ziel darstellt, um die perineurale Invasion und respektiv die hohe Rezidivrate des PDAC genauer zu verstehen und potentielle Wirkstoffe zur Inhibition dieses Prozesses ausfindig zu machen. So konnte gezeigt werden, dass PDAC-Zelllinien in Richtung eines Fraktalkinegradienten chemotaktisch migrieren und sich Zellen annähern, welche Fraktalkine ausschütten. Dabei führte die Behandlung von AsPC-1 und A818 Zelllinien mit 100ng/ml Fraktalkine zu einer gesteigerten chemotaktischen Migration. Auf der anderen Seite führte die Behandlung mit CX3CR1-blockierendem Antikörper zu einer starken Reduktion dieses Potentials [55]. Auf dem Boden dieser Erkenntnisse, scheint es vielversprechend diese Spur weiter zu verfolgen, um der Ursache und damit verbundenen potentiellen Behandlungsmöglichkeiten auf den Grund zu gehen. Hierfür wurden zunächst Migrationsassays erstellt, welche das zielgerichtete Migrationspotential von PDAC-Zellen hin zu Nervenzellen in einem Zeitraum von 14 Stunden untersuchen lassen.

Abb. 9: Migration-Assay Migrationsfront-Auswertung



Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die Zelllinie T3M4 als auch SU.86.86 ein sehr direktes sowie zielgerichtetes Migrationsverhalten in Richtung der DRG-Neurone an den Tag legten.

Abb. 10: Richtungsgenauigkeit und x-FMI

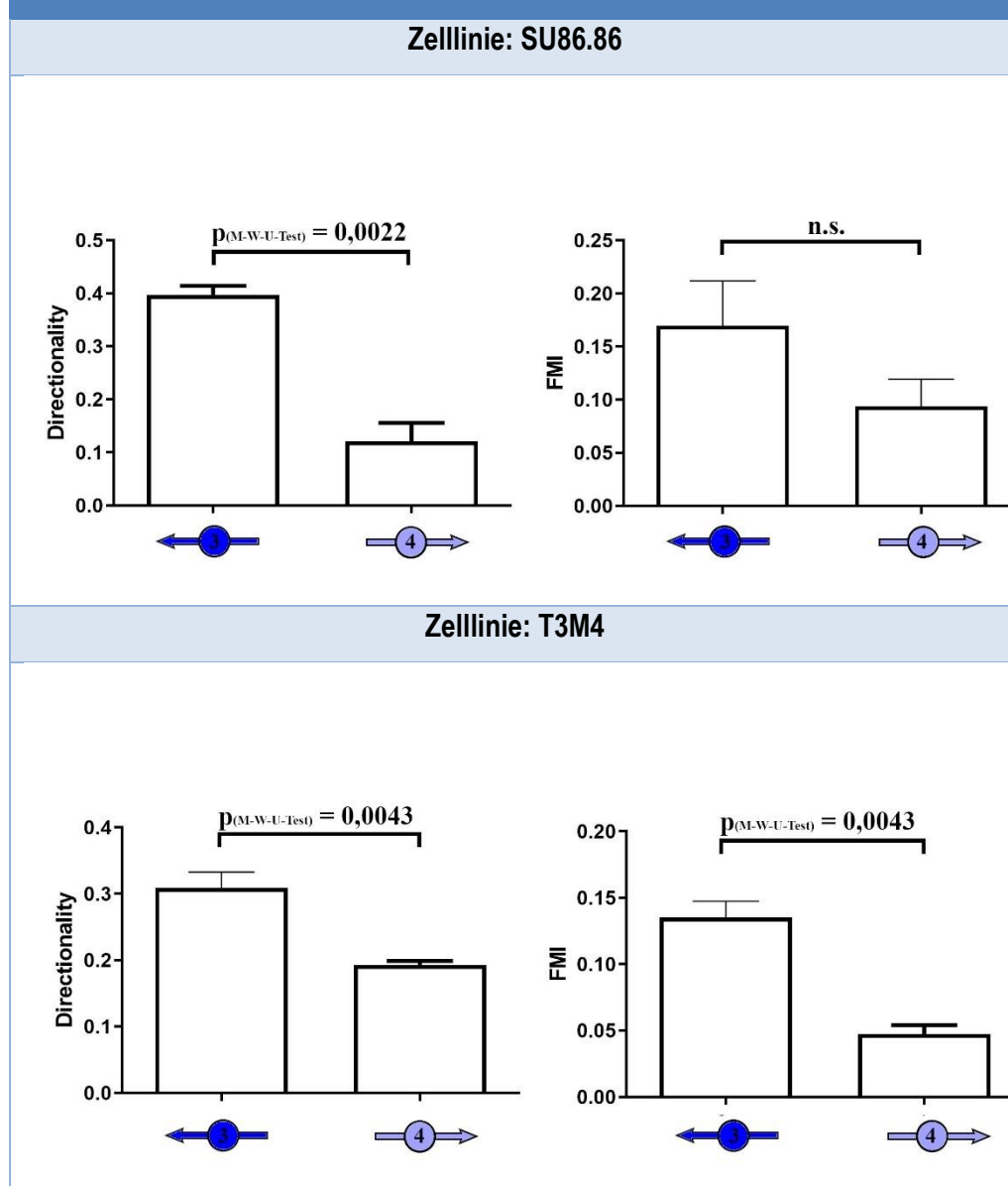


Abb. 10: Die PDAC Zelllinie T3M4 zeigte eine signifikante Zunahme der zielgerichteten Migration (Directionality und x-FMI) in Richtung DRG-Neurone (3) im Vergleich zu dem leeren Strukturgel auf (4). SU86.86 wies nur in Bezug auf die Richtungsgenauigkeit einen signifikanten Unterschied zwischen den Migrationsfronten auf.

Abb. 11: Euklidische Migrationsdistanz und Geschwindigkeit

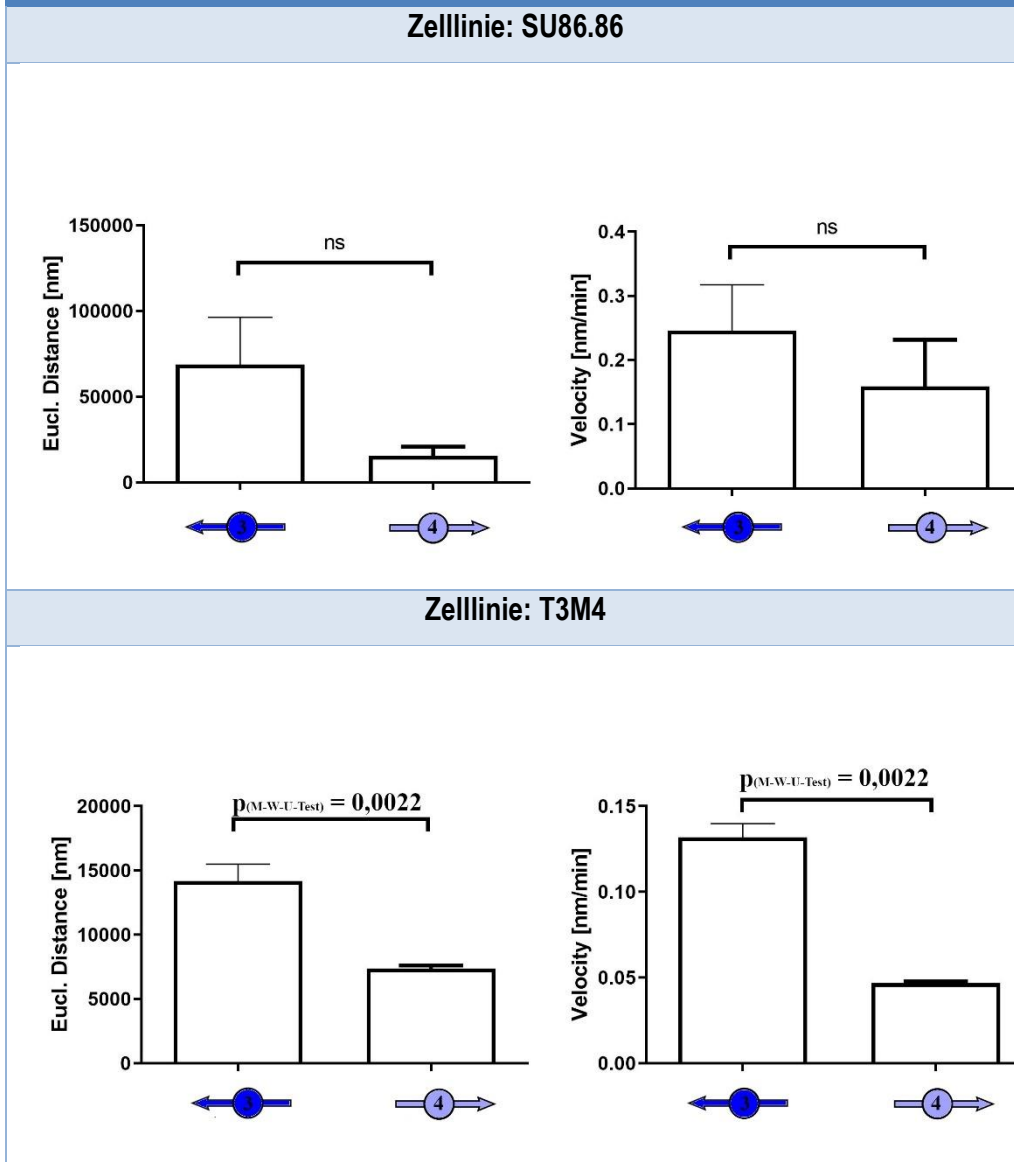


Abb. 11: SU.86.86 zeigte keine relevanten Veränderungen der Migrationsgeschwindigkeit (Velocity) bzw. euklidische Distanz (eucl. Distance) in Richtung DRG-Neurone auf. Im Fall von T3M4 konnte hingegen signifikante Unterschiede der untersuchten Parameter festgestellt werden.

Die Behandlung durch CX3CR1-Antikörper führte zu keiner Veränderung der zielgerichteten Migration im Falle von SU.86.86 und T3M4.

In Anlehnung an die Beobachtung von Marchesi et al., dass PDAC Zellen durch eine anti-CX3CR1-Antikörper-Behandlung, eine signifikanten Abnahme der chemotaktischen Migration aufweisen, wurde in diesem Schritt untersucht, ob der oben genannter Effekt auch im Falle des Migrationsassays festzustellen ist [55]. Somit wurden die Zelllinien SU.86.86 und T3M4 mit 0,5µg/mL anti-human-CX3CR1-Antikörper behandelt und mit unbehandelten Zellen der entsprechenden Zelllinie verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörperbehandlung keine signifikanten Änderungen der zielgerichtet Migration im Fall von SU.86.86 nach sich zog. Vergleichbare Resultate erwies die Antikörper-Behandlung der T3M4-Zelllinie, welche bis auf eine relevante Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit, keine Änderungen zeigte.

Abb. 12: Richtungsgenauigkeit und x-FMI nach CX3CR1-Antikörper-Behandlung

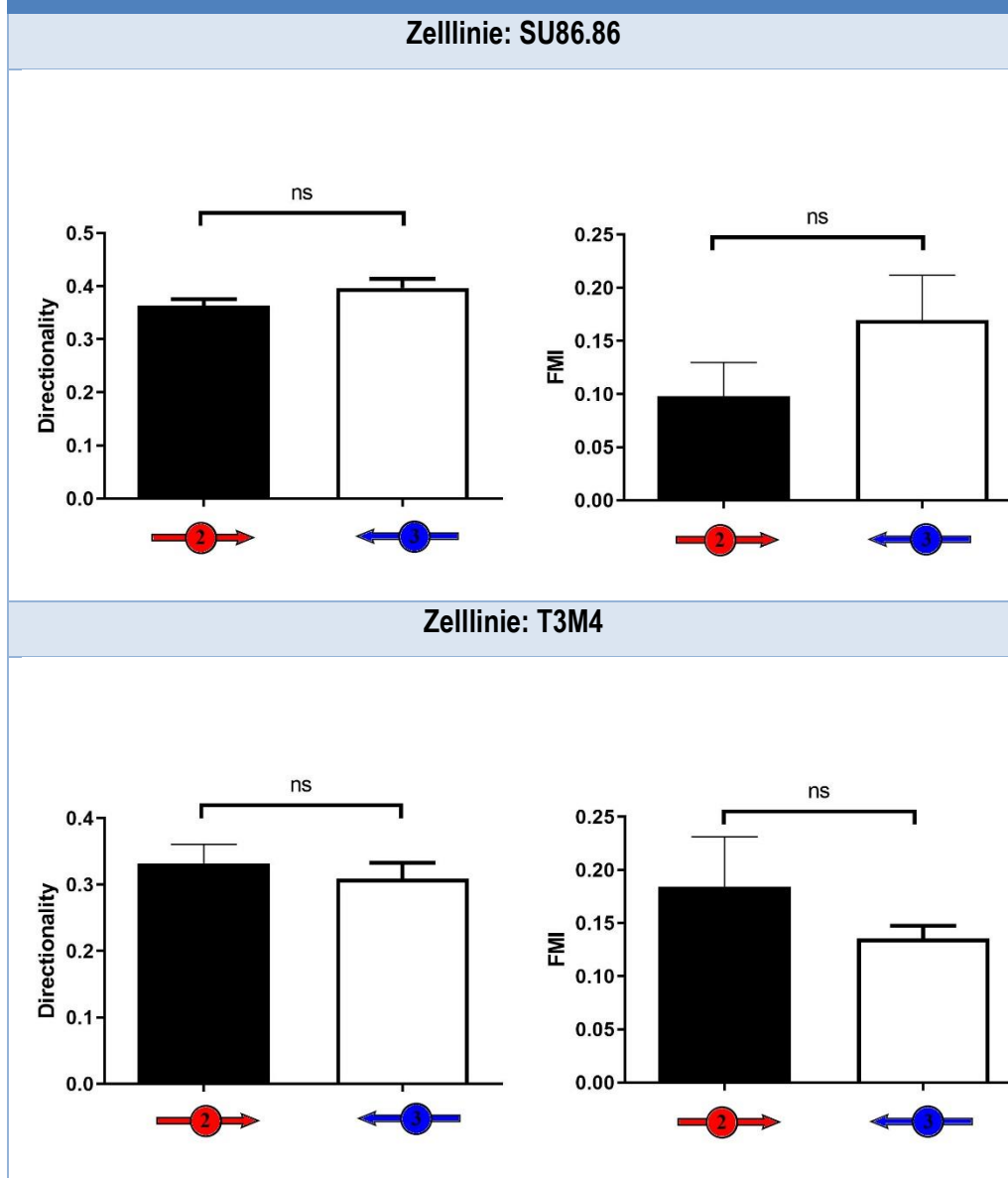


Abb. 12: Die CX3CR1-Antikörper-Behandlung (2) zeigte keinen Einfluss auf die richtungsabhängigen Parameter einer zielgerichteten Migration (Directionality, x-FMI) im Fall von SU.86.86 bzw. T3M4 im Vergleich zur unbehandelten Migrationsfront (3) auf.

Abb. 13: euklidische Migrationsdistanz und Geschwindigkeit nach CX3CR1-Antikörper-Behandlung

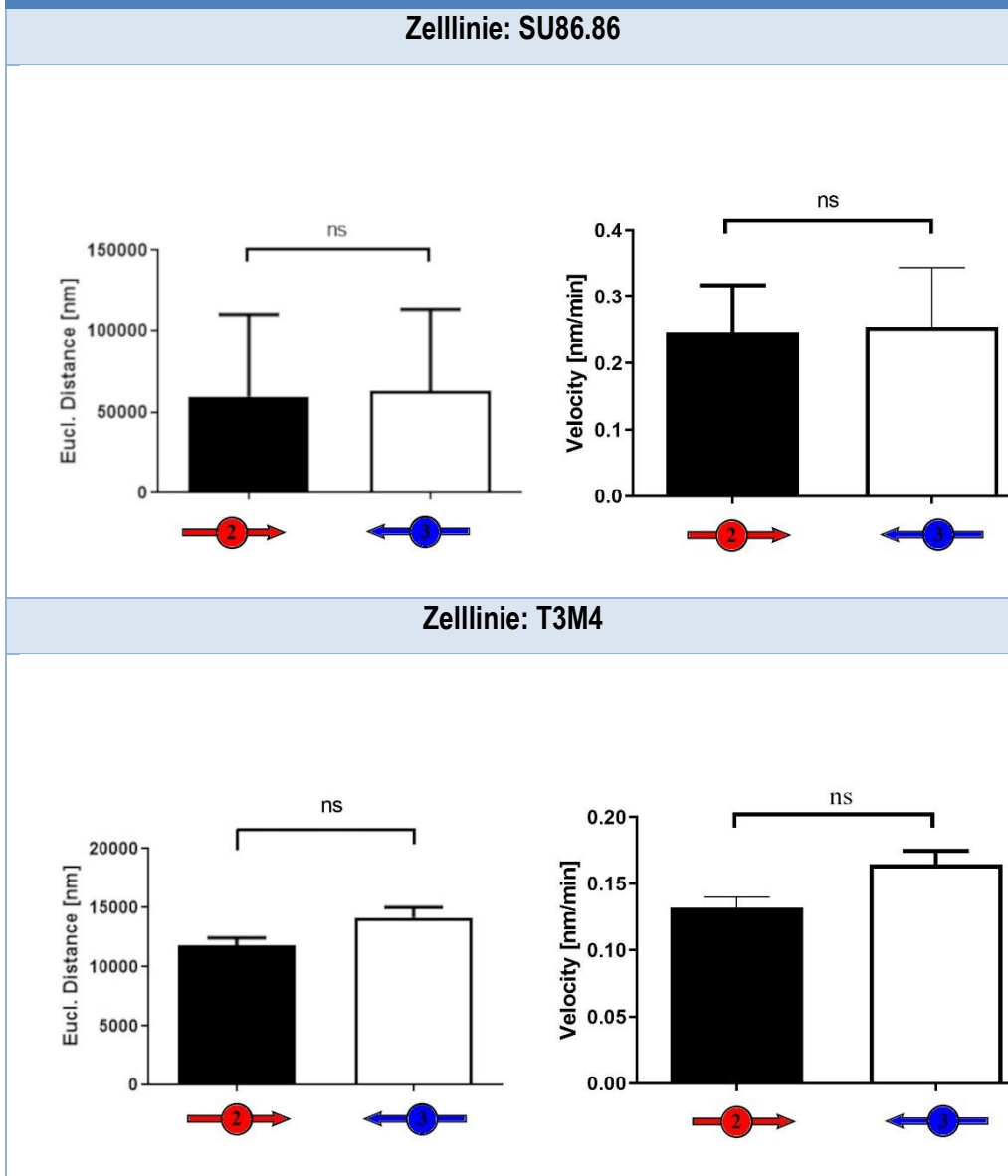


Abb.13: SU.86.86 wies durch 0,5ug/ml CX3CR1-Antikörper-Behandlung keinen signifikanten Unterschied in Migrationsgeschwindigkeit oder zurückgelegter euklidischer Distanz auf. Die Behandlung von T3M4-Zellen blieb ohne relevante Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit oder der zurückgelegten euklidische Distanz.

Die Behandlung mit dem AZD8797-Compound zeigte sowohl bei T3M4 als auch bei SU.86.86 keinen signifikanten Einfluss auf die zielgerichtete Migration

Schließlich wurden die Auswirkungen des AZD8797-Compound im Hinblick auf die gezielte Migration eingehender untersucht. Dabei wurde der Versuchsaufbau

entsprechend der CX3CR1-Antikörper-Behandlung gewählt und die PDAC-Zelllinien vor der Aussaat im Strukturgel mit 160nM AZD8797-Compound behandelt. In Folge blieben die Veränderungen der gezielten Migration sowohl von T3M4 als auch von SU.86.86 ohne statistische Signifikanz im Rahmen des Kruskal-Wallis-Tests zur Untersuchung von nicht parametrischen Verteilungsmustern.

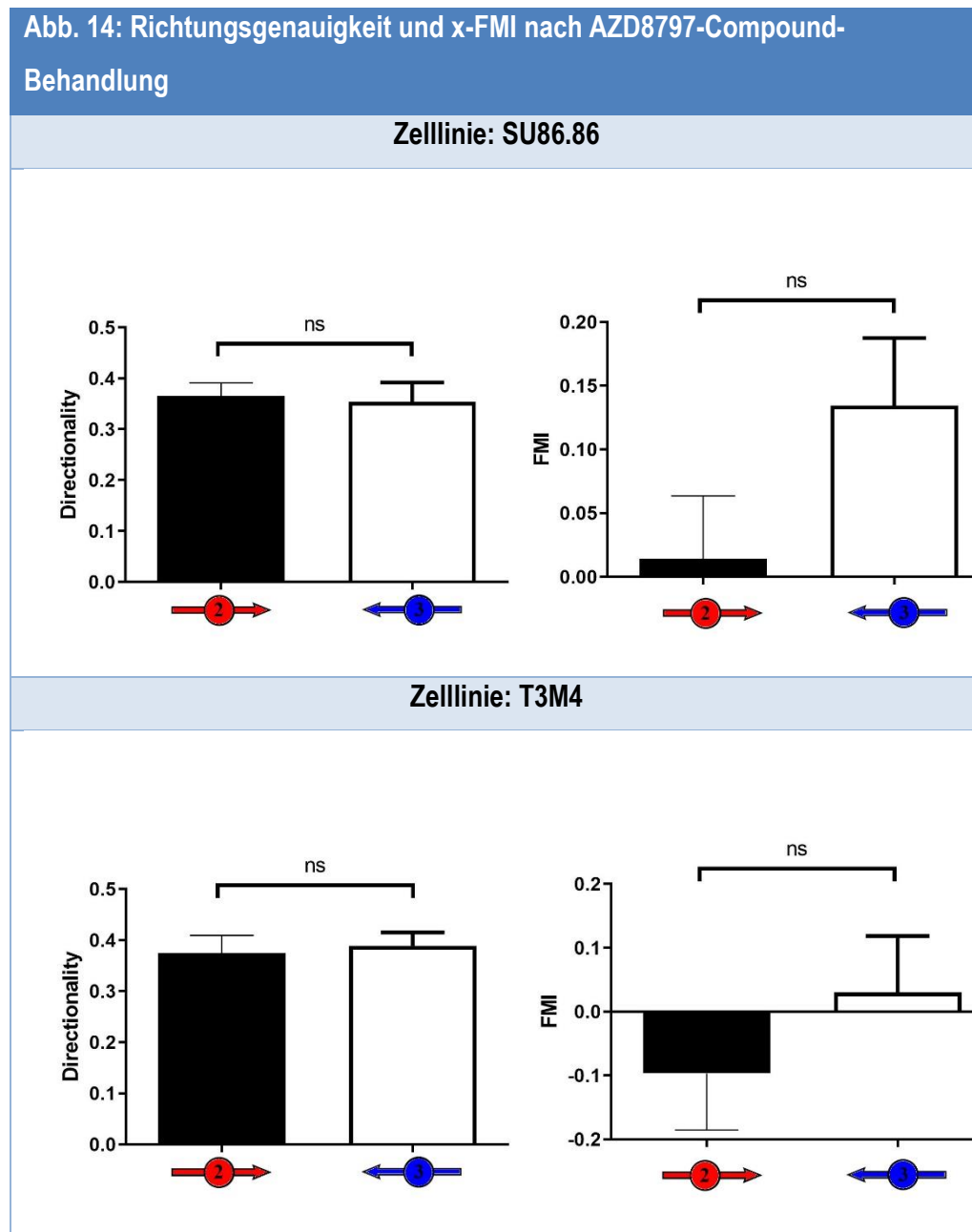


Abb. 14: T3M4 und SU.86.86 wiesen keine signifikante Änderung der zielgerichteten Migration auf. Die Richtungsgenauigkeit blieb in beiden Fällen unverändert durch die 160nM AZD8797-Compound-Behandlung.

Abb. 15: euklidische Migrationsdistanz und Geschwindigkeit nach AZD8797-Compound-Behandlung

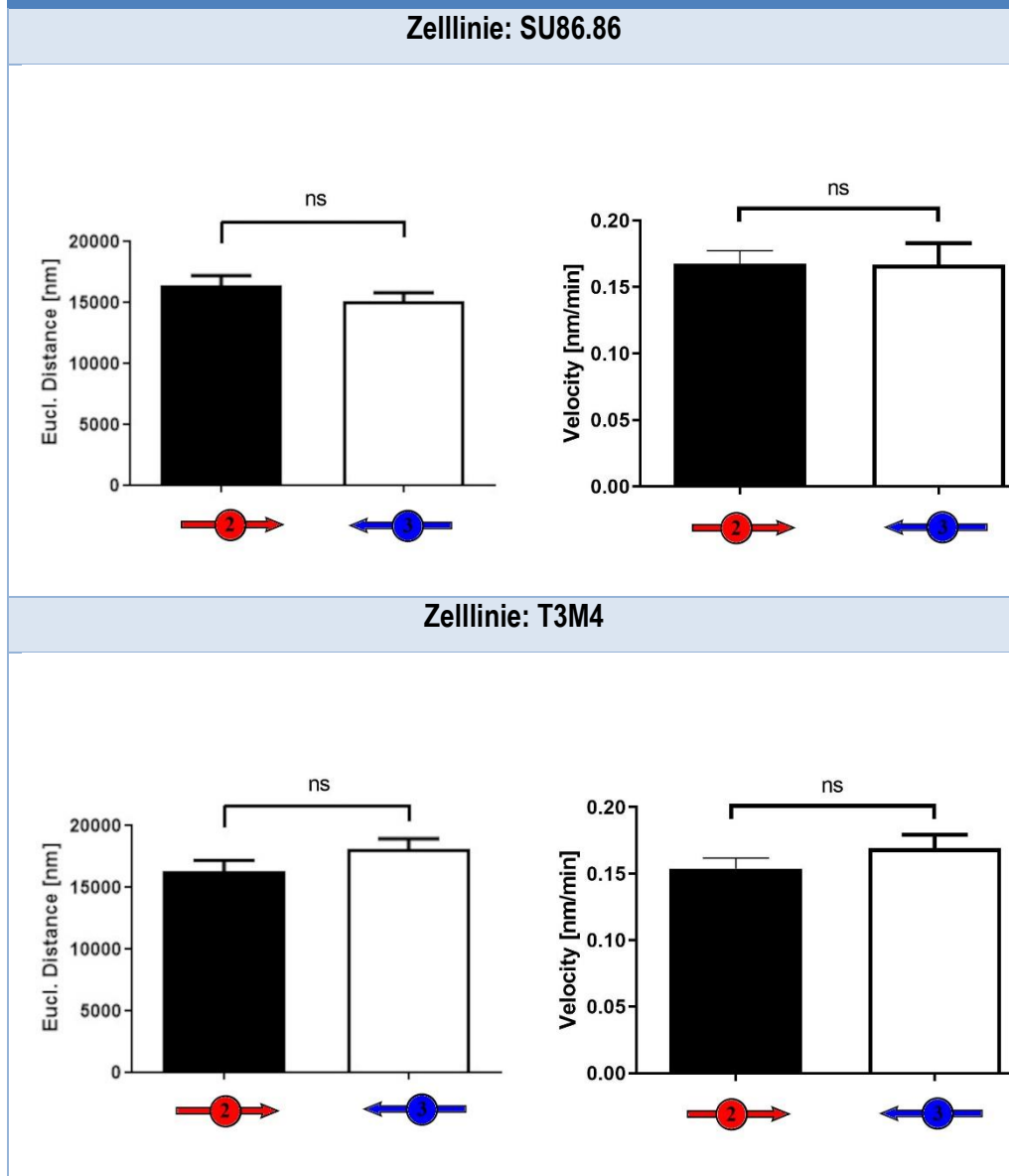


Abb. 15: Die AZD8797-Compound-Behandlung zeigte keine Auswirkung auf die Migrationsgeschwindigkeit oder euklidischen Distanz sowohl in Bezug auf die SU86.86- als auch auf die T3M4-Zelllinie.

Die Lokomotion wurde durch eine Behandlung mit dem CX3CR1-Antikörper bzw. AZD8797-Compound nicht beeinflusst.

Um das Lokomotionsverhalten der PDAC Zellen unter Antikörper- bzw. AZD8797-Compound-Behandlung ohne eine externe Fraktalkine-Quelle zu untersuchen, wurden „Scratch“-Assays mit den Zelllinien T3M4 und PANC-1 durchgeführt. Dabei wurde die „Scratch“ Fläche über einen Zeitraum von 40 Stunden beobachtet und die Abnahme dieser zellfreien Fläche festgehalten. Nach der Berechnung der AUC (area under the curve), konnte festgestellt werden, dass sowohl durch die Behandlung mit 0,25ug/ml bzw. 0,5ug/ml CX3CR1-Antikörper, als auch mit 80nM bzw. 160nM AZD8797-Compound keine Unterschiede in Hinblick auf die Lokomotion zu verzeichnen waren.

Abb. 16: Area under the curve (AUC) der zell-freien Fläche von PANC-1 nach AZD8797-Compound bzw. CX3CR1-Antikörper-Behandlung

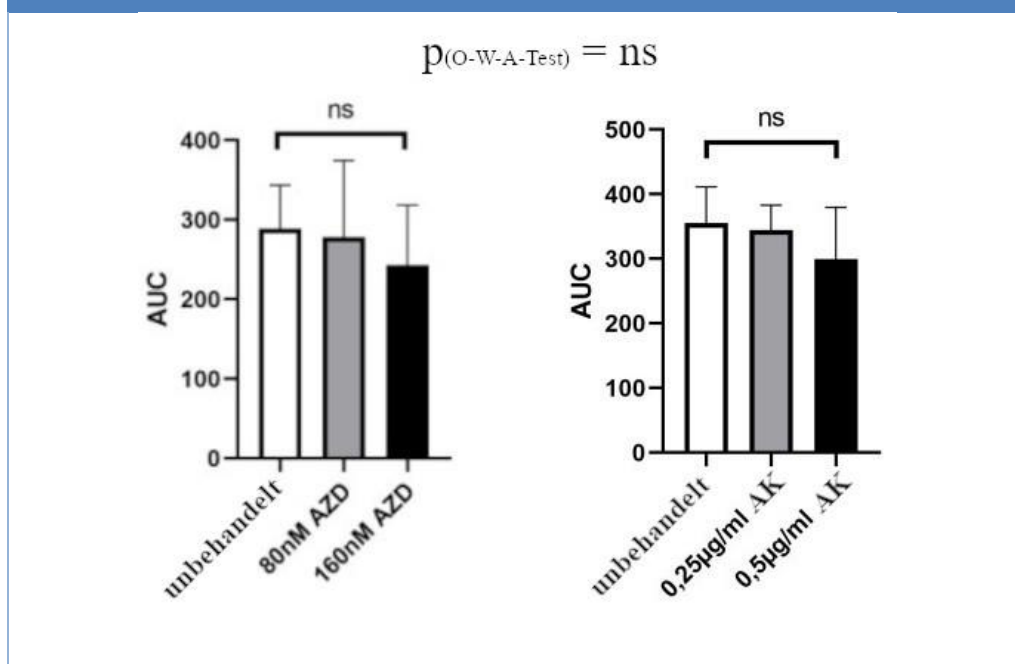


Abb. 16: Sowohl die Behandlung durch den AZD8797-Compound (80nM AZD bzw. 160nM AZD) als auch durch den CX3CR1-Antikörper (0,25ug/ml AK bzw. 0,5ug/ml AK) zeigten nach 40h Beobachtungsdauer keine relevanten Unterschiede im Schließen der zell-freien Fläche.

Abb. 17: Area under the curve (AUC) der zellfreien Fläche von T3M4 nach AZD8797-Compound bzw. CX3CR1-Antikörper-Behandlung

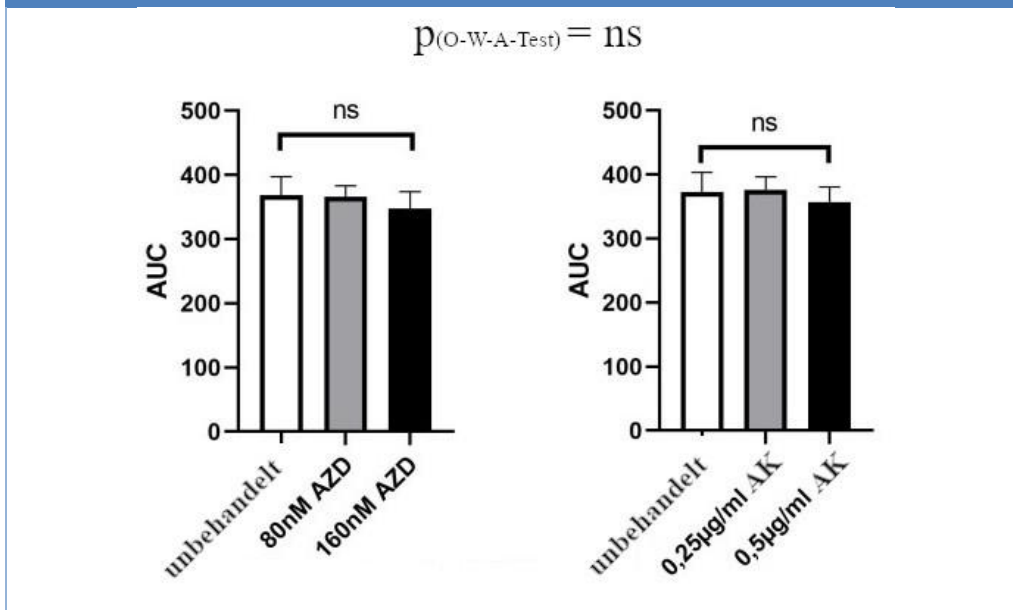


Abb. 17: Auch im Fall von T3M4 verursachte die Behandlung durch den AZD8797-Compound (80nM bzw. 160nM) oder durch den CX3CR1-Antikörper (0,25µg/ml bzw. 0,5µg/ml) nach 40h Beobachtungsdauer keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Veränderung zellfreien Fläche des Scratches.

Der nächstfolgende Schritt bestand darin, die Fragestellung zu klären, ob die Behandlungen einen zytostatischen bzw. zytotoxischen Effekt aufweisen und ob das von den DRG-Neuronen sezernierte Fraktalkine einen Einfluss auf das Überleben und die Proliferationsrate der PDAC-Zelllinien ausübt.

Die Behandlung mit Fraktalkine zeigte keine Auswirkungen auf die Proliferationsrate der PDAC-Zelllinien über den Zeitraum von bis zu 72 Stunden

Hierzu wurden die PDAC-Zelllinien T3M4, AsPC-1 und PANC-1 mit einer Titrationsreihe von 10, 50 und 100ng/ml behandelt und die Viabilität mittels MTT-Assay analysiert. Es konnten keine relevanten Veränderungen der Zellviabilität in einem Zeitraum von bis zu 72 Stunden beobachtet werden.

Abb. 18: Zellviabilität von PDAC-Zelllinien unter Fraktalkine-Behandlung

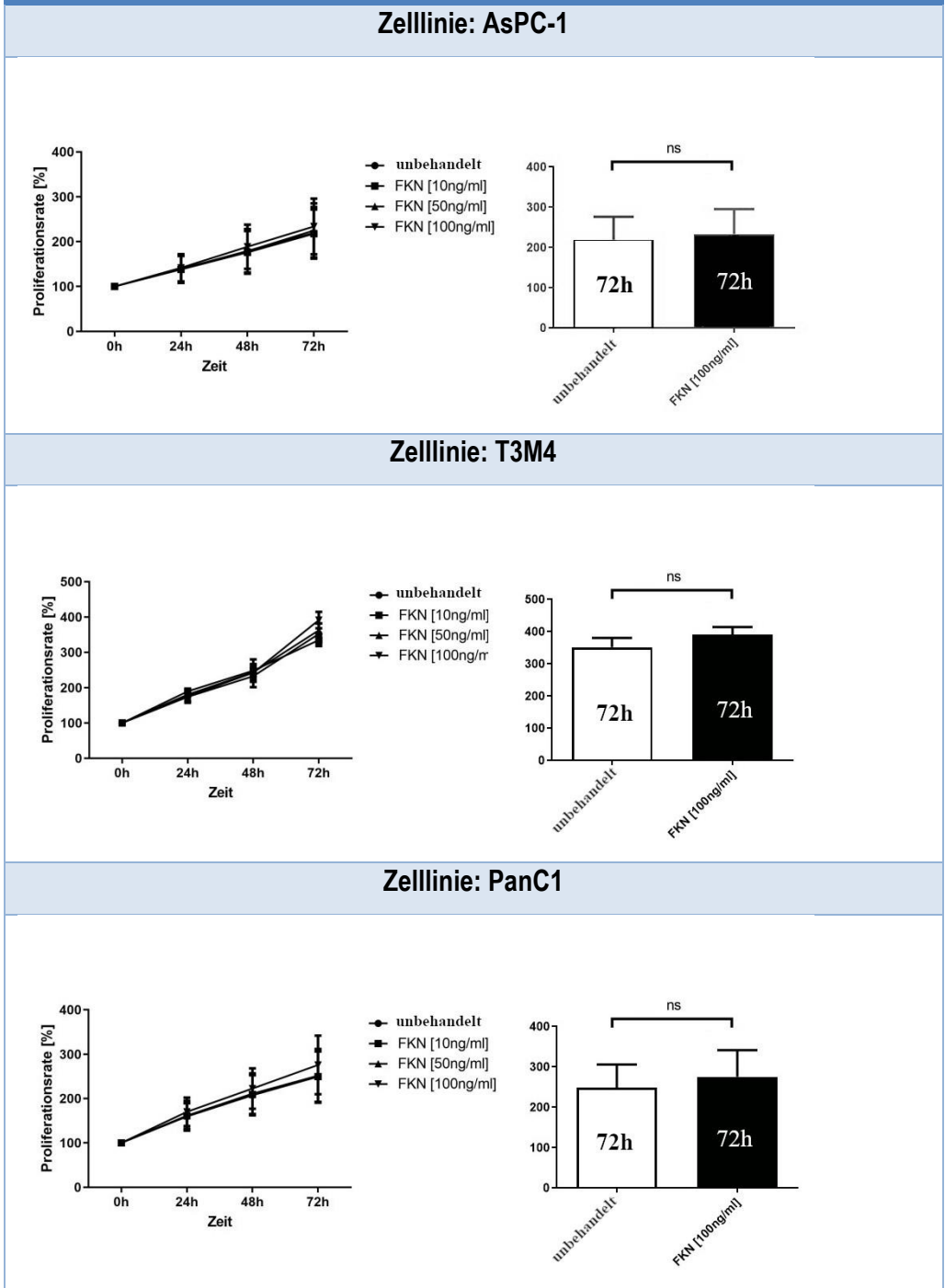
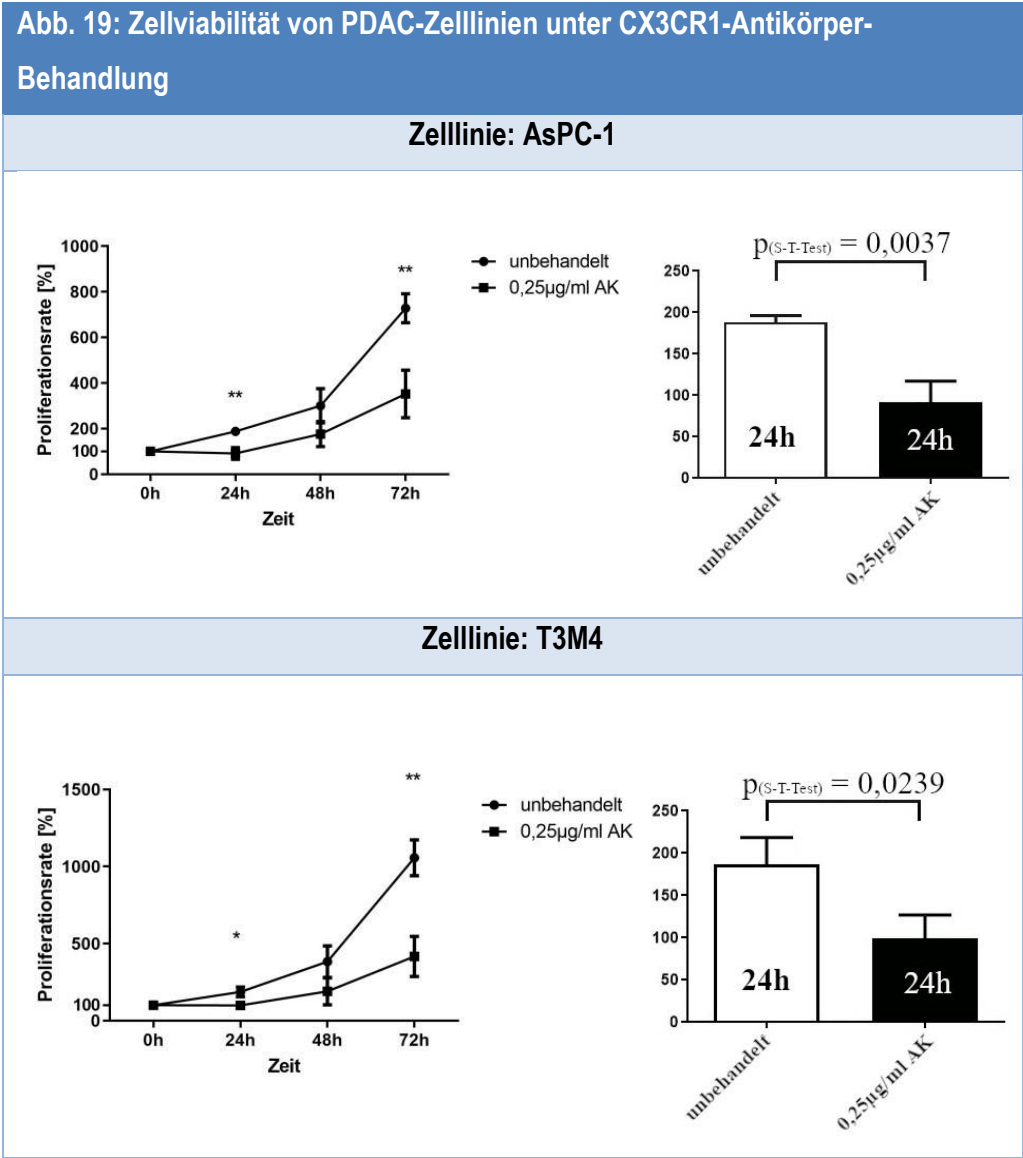


Abb.18: Die Titrationsreihe von Fraktalkine (FKN) von 10ng/ml, 50ng/ml und 100ng/ml zeigte keine Veränderung auf die Zellviabilität der Zellreihen PANC-1, T3M4 und AsPC-1 auf.

Die CX3CR1-Behandlung erzeugte bereits nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der Viabilität von allen PDAC-Zelllinien

Um der Frage nach der Auswirkung durch die Behandlung weiter nachzugehen, wurden MTT-Assays mit T3M4, SU.86.86, PANC-1 und AsPC-1 unter der Behandlung von 0,25µg/ml und 0,5 µg/ml CX3CR1-AK in einem Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Die Konzentration von 0,25µg/ml führte bereits nach 24 Stunden zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Viabilität in sämtlichen PDAC-Zelllinien.



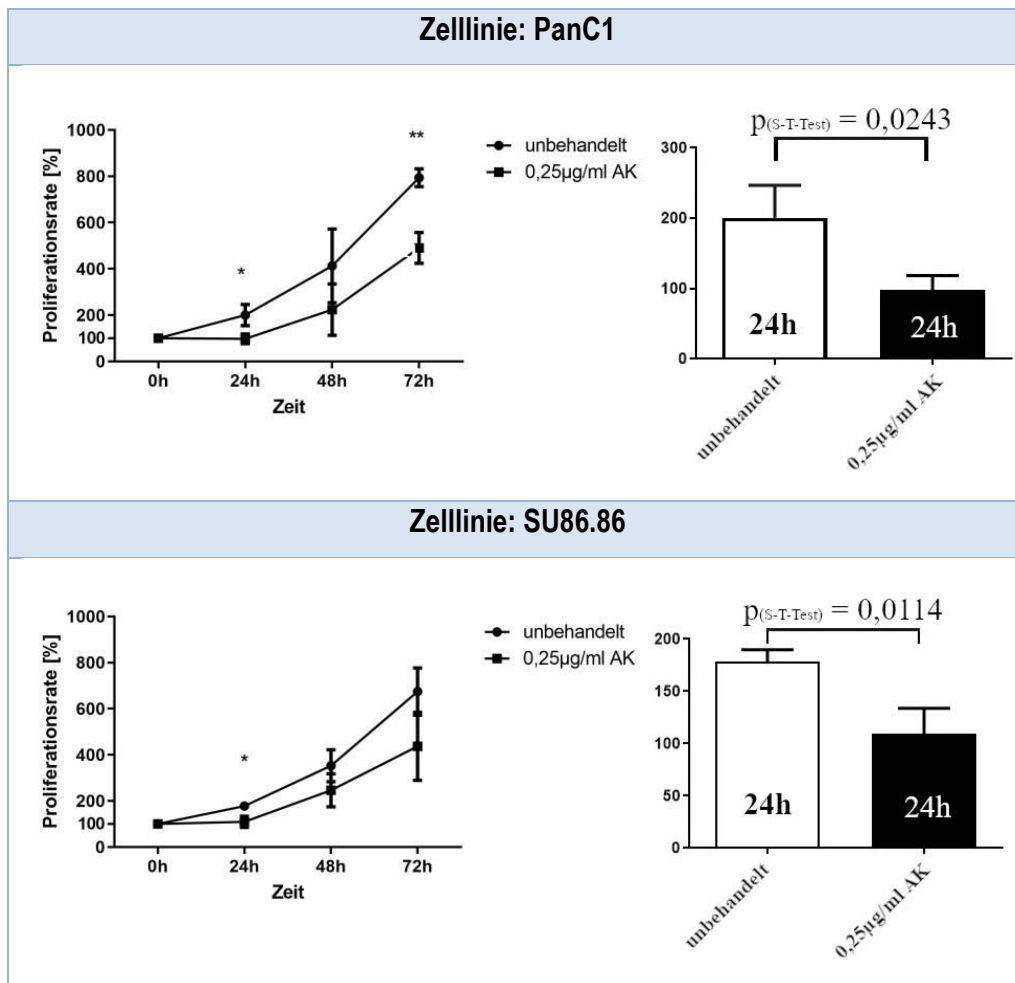


Abb. 19: Die Behandlung der PDAC-Zelllinien mittels 0,25µg/ml CX3CR1-Antikörper zeigte bereits nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der Zellaktivität- bzw. Proliferationsrate durch alle untersuchten PDAC-Zelllinien.

Um einen eventuell zytotoxischen Effekt von Natriumazid (NaN_3), ein Bestandteil des Antikörperlösungsmittels, auszuschließen, wurden AsPC-1 und T3M4-Zellen mit jeweils 0,1% NaN_3 behandelt. Es konnte kein Effekt durch die Natriumazidbehandlung unter dieser Konzentration festgestellt werden.

Abb. 20: Effekt von NaN₃ auf Viabilität

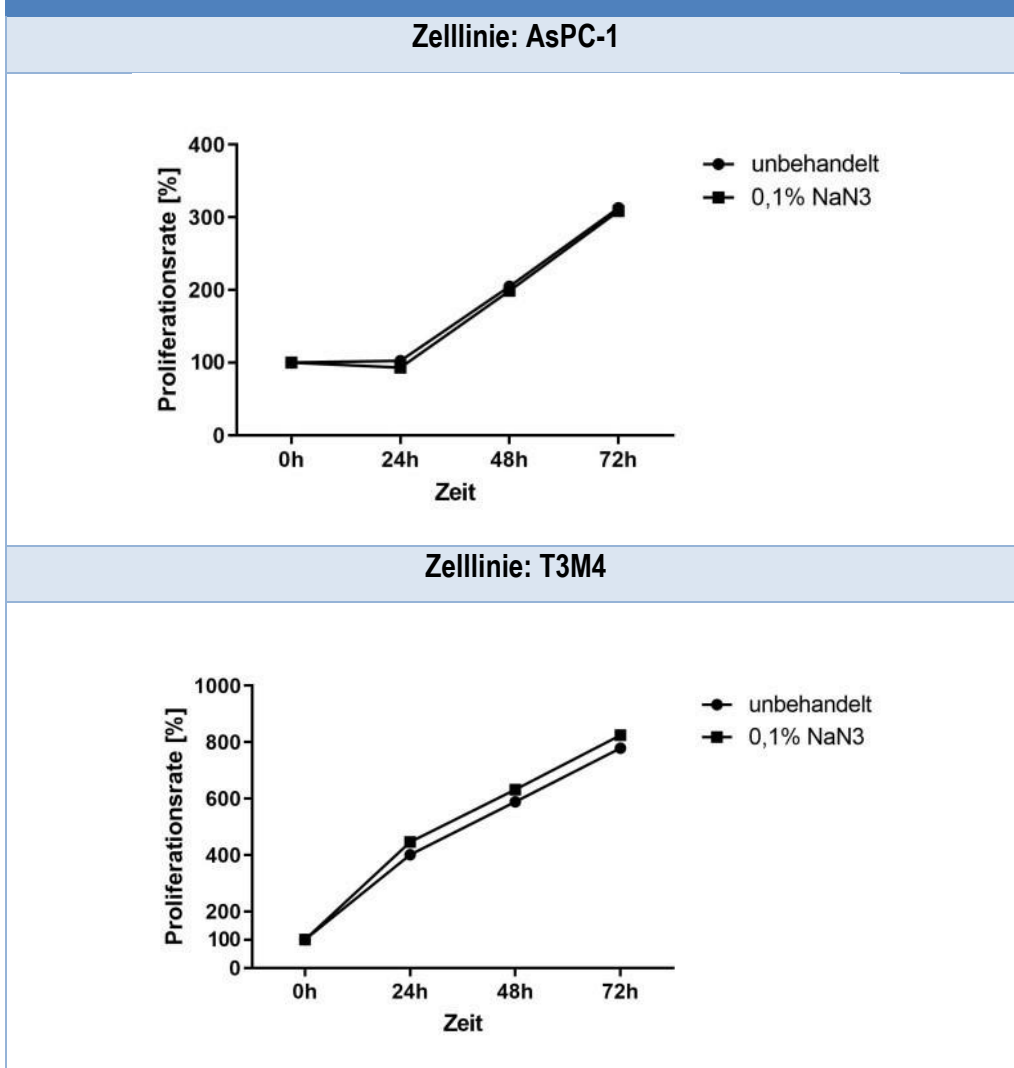


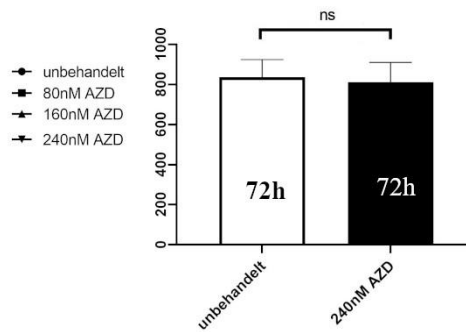
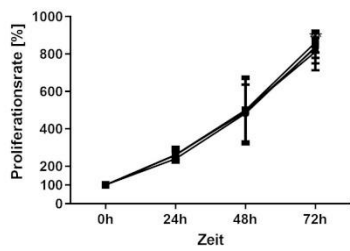
Abb. 20: PANC-1 und T3M4 zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Minderung der Zellviabilität in Folge der NaN₃-Behandlung.

Die Behandlung durch den AZD8797-Compound hatte keine Auswirkung auf die Zellviabilität in einem Zeitraum von bis zu 72h

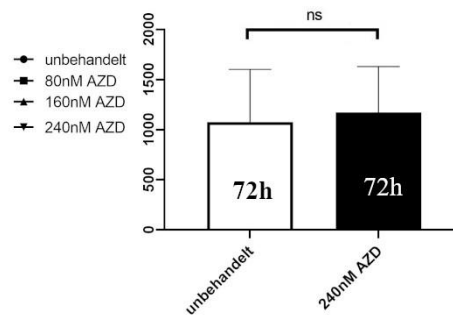
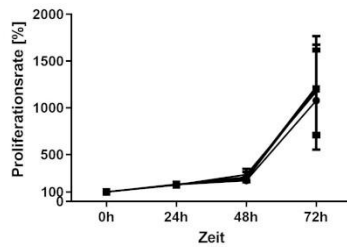
Um den proliferations-hemmenden Effekt von AZD8797-Compound auf die PDAC-Zelllinien zu untersuchen, wurden Titrationsreihen von AZD8797-Konzentrationen (80nM, 160nM und 240nM) untersucht. Um eine stereochemische Behinderung des AZD8797-Compounds durch FCS auszuschließen, wurden die Titrationsreihen unter FCS-freien Bedingungen wiederholt. Die steigenden Konzentrationen des AZD8797-Wirkstoffes zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Auswirkung auf die Zellaktivität. Die Anwesenheit von FCS im Nährmedium hatte keine Auswirkung auf diese Behandlung.

Abb. 21: Zellviabilität von PDAC-Zelllinien unter AZD8797-Compound-Behandlung

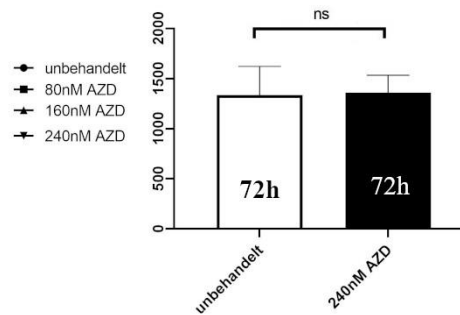
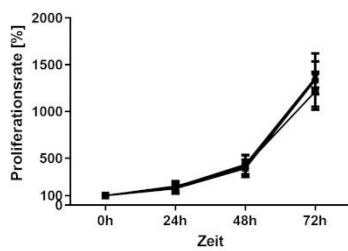
Zelllinie: AsPC-1



Zelllinie: T3M4



Zelllinie: PanC1



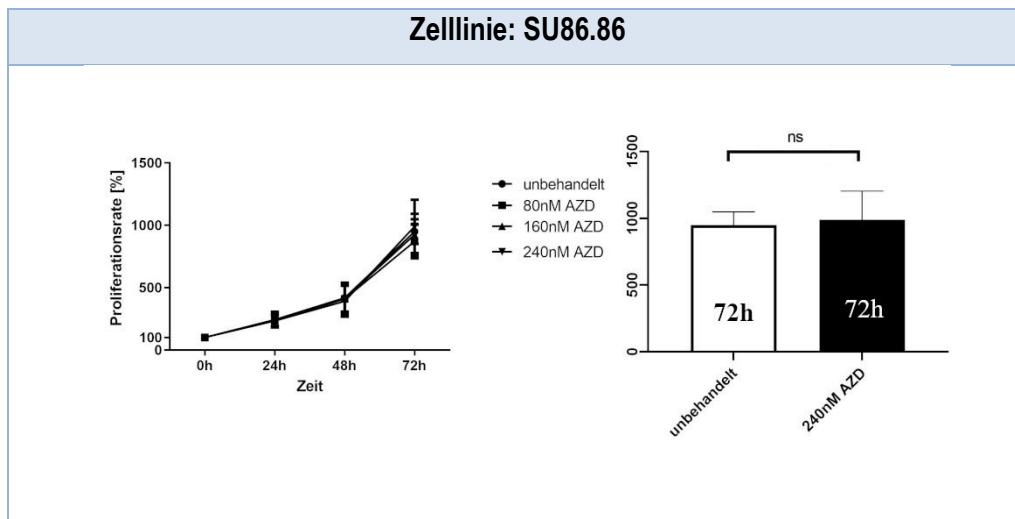


Abb. 21: Die PDAC-Zelllinien zeigten zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der Zellviabilität als Reaktion auf die Titrationsreihe von 80nM bis 240nM des AZD8797-Compounds.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ausschließlich die Behandlung durch den CX3CR1-Antikörper eine Hemmung der mitochondrialen Aktivität bzw. der Viabilität der PDAC Zellen bewirkt. Auf der Spur dieser Proliferationshemmung bestand nun der nächste Schritt darin, herauszufinden, auf welchem Signaltransduktionsweg dieser Effekt erreicht und gesteuert wird. Anhand der Ergebnisse von Jamieson-Gladney et al., welche die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Fraktalkine-Stimulation nahe legte [40], wurde im Weiteren dieser Signaltransduktionsweg untersucht.

Der Entzug von fötalem Kälberserum (FCS) reduzierte die Aktivität von ERK1/2 in der AsPC-1-Zelllinie

Zunächst wurde der Effekt einer Wachstumsfaktorentzugs auf die Aktivierung von ERK1/2 durch die AsPC-1-Zelllinien untersucht. Dabei wurden die PDAC Zellen für 48 Stunden in einem FCS-freien Medium gehalten (0h FCS) und mittels Western blot ausgewertet. Als Kontrolle wurden AsPC-1-Zellen unter Normalbedingungen in 5%-FCS-haltigem Medium herangezogen (basal). Der FCS-Entzug führte zu einer deutlich geringeren Phosphorylierung von ERK1/2.

Abb. 22: Phosphorylierung von ERK1/2 unter FCS-Entzug bei AsPC-1

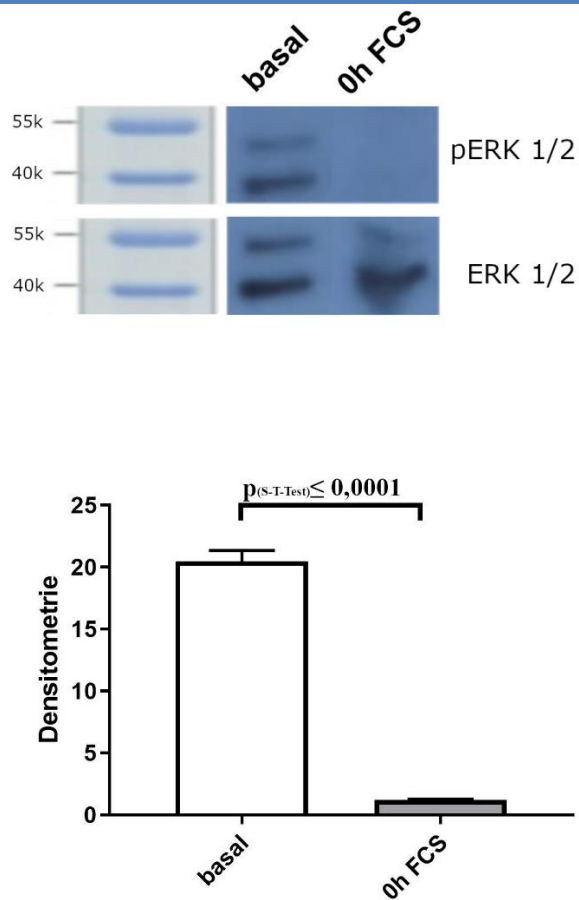


Abb. 22: Das Aussetzen der FCS-Behandlung (0h FCS) führte zu einer signifikanten reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zur basalen Aktivität (basal).

Die alleinige Fraktalkine-Stimulation führte zu keiner Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 in Abwesenheit von FCS.

Im nächsten Schritt wurde der Effekt einer alleinigen Fraktalkine-Stimulation auf den ERK-Signalweg analysiert. Zunächst wurden AsPC-1 Zellen für 48 Stunden das FCS entzogen und darauf mit 100ng/ml Fraktalkine stimuliert. Als Kontrolle wurde der p-ERK-Hemmstoff U0126 eingesetzt, welcher konsequent die Phosphorylierung verhinderte. Auch nach 20 Minuten zeigte sich keine relevante Veränderung der ERK-Aktivierung gegenüber dem Ausgangswert (FCS 0).

Abb. 23: Phosphorylierung von ERK1/2 unter FCS-Entzug und Fraktalkine-Stimulation bei AsPC-1. pERK1/2-Hemmstoff U0126 dient als Kontrolle

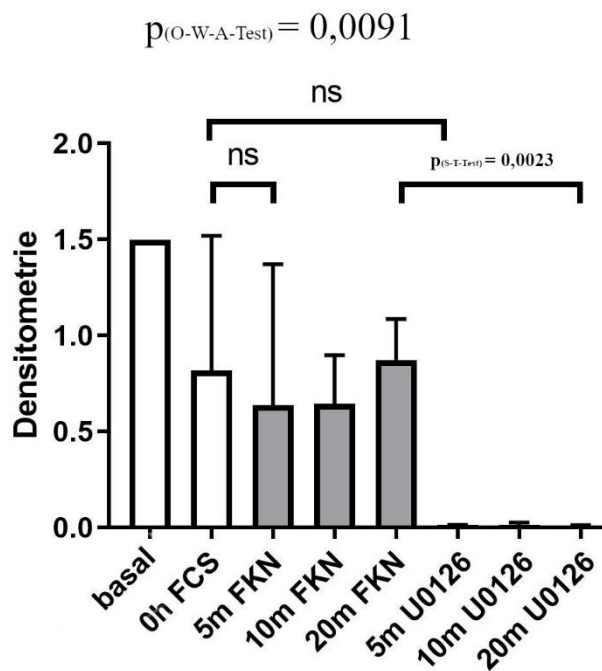
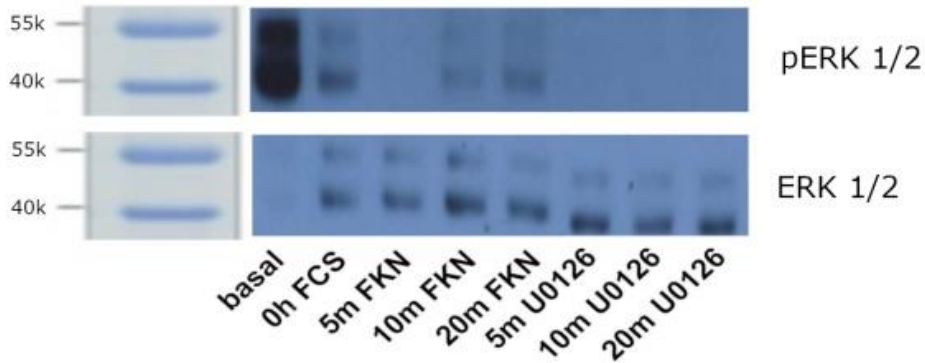


Abb. 23: Die Stimulation der AsPC-1-Zelllinie mit 100ng/ml Fraktalkine führte auch nach 20 Minuten zu keiner Veränderung der ERK1/2-Aktivität. U0126 unterdrückte die Phosphorylierung konsequent über einen Zeitraum von 20 Minuten. Aufgrund des hohen pERK-basal-Wertes (basal) wurde die densitometrische X-Achse auf den Wert von 1.5 beschränkt.

In Anlehnung an die Zellviabilitätshemmung durch die CX3CR1-Antikörperbehandlung im MTT-Assay, stellte sich die Frage, ob diese Antikörper einen vergleichbaren Effekt auf die Phosphorylierung von ERK1/2 zeigen, wie der pERK1/2-Hemmstoff U0126. Weiterhin wurde der Zeitraum auf 60 Minuten erweitert.

Die Stimulation durch Fraktalkine führte bei vorangegangener CX3CR1-Inhibition zu keiner Veränderung der ERK1/2 Aktivierung.

Um den Effekt der CX3CR1-Antikörper auf die ERK1/2-Aktivierung zu untersuchen, wurden die AsPC-1 Zellen für 48 Stunden mit 0,5µg/ml CX3CR1-Antikörper in FCS-freiem-Medium behandelt. Im Anschluss erfolgte die Zuführung von 100nM Fraktalkine, nach gegebenem Zeitraum die Zellysaterstellung und Western-blot-Analyse. Die densitometrischen Ergebnisse wurden wiederum in Abhängigkeit von pERK/ERK erstellt und ausgewertet.

Anhand dieser Daten ließ sich kein Unterschied zwischen einer Fraktalkine-Stimulation und einer vorangegangenen CX3CR1-Antikörperbehandlung in einem Zeitraum von bis zu 60 Minuten feststellen. Weiterhin ließ sich auch nach bis zu 60 Minuten Fraktalkine-Behandlung keine Zunahme an ERK1/2-Aktivität aufweisen.

Abb. 24: Phosphorylierung von ERK1/2 unter FCS-Entzug, CX3CR1-Antikörper-Behandlung und Fraktalkine-Stimulation bei AsPC-1

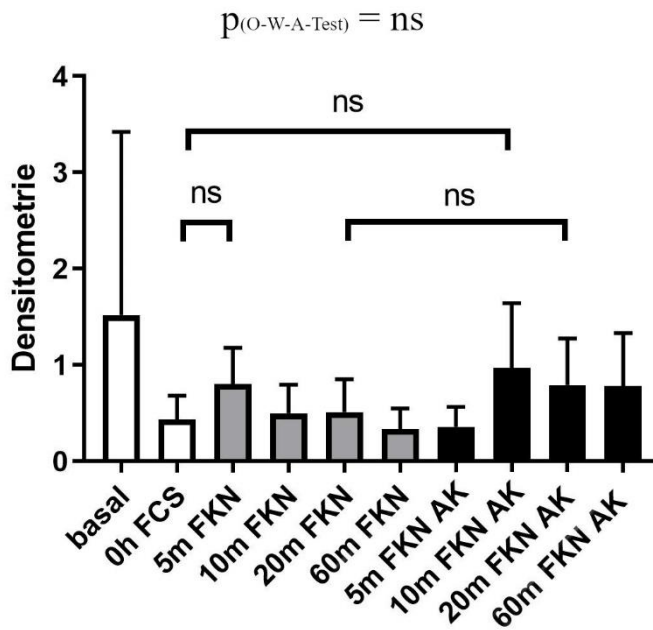
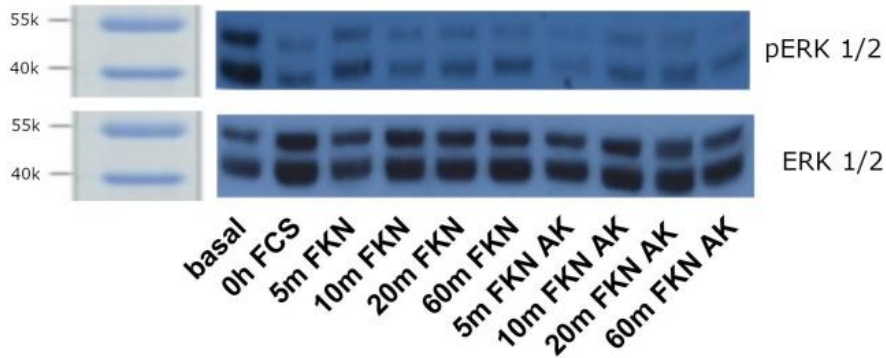


Abb. 24: Die Behandlung durch 100ng/ml Fraktalkine (5m FKN) erzeugte weiterhin keine deutlichen Unterschiede der ERK1/2-Aktivität im Vergleich zu dem alleinigen Entzug von FCS (FCS 0h). Weiterhin unterblieb ein deutlicher Effekt bei vorangegangener CX3CR1-Antikörper-Behandlung (10m FKN AK).

Diskussion

In dieser Studie konnte das hohe Migrationsbestreben von PDAC-Zelllinien in Richtung neuronaler Strukturen *in vitro* aufgezeigt werden. Eine Beeinflussung dieses Prozesses mittels stereochemischer Inhibition des CX3CR1-Rezeptors durch AZD8797-Compound zeigte eine tendenzielle Reduktion ohne statistische Signifikanz auf. Desweiteren blieb eine CX3CR1-Antikörper-Behandlung ohne relevante Auswirkung auf das untersuchte Migrationsverhalten. Letzteres zeigte hingegen eine deutlich antiproliferative Wirkung auf die PDAC-Zelllinien. Der ERK1/2 Signalweg scheint an dieser Stelle keine direkte Rolle zu spielen.

Das Pankreaskarzinom bleibt bis heute ein großes klinisches Problem und wird auch in Zukunft nicht an Aktualität in der Medizin verlieren. So prognostizierten Quante et al bereits für das Jahr 2030 das Vorrücken des Pankreaskarzinoms auf Platz 2 der Krebstodesursachenstatistik [69]. Dieser Zustand unterstreicht erneut die Problematik einer Krebsart, welche durch ihre Komplexität in Bezug auf ihre Metastasierungseigenschaften die chirurgischen Resektionsmöglichkeiten weiterhin wie kaum eine andere Krebsart herausfordert. Vergangene Studien stellten zunächst das Befallen der lokalen peripheren Nerven durch das PDAC als eine der Hauptursachen für das frühe Wiederauftreten des Tumors nach Resektion dar [42, 68, 77] und die kontroverse Diskussion, ob das Vorliegen der PNI ein Grund für reduziertes Überleben im Falle des PDAC darstellt [84] oder keine Korrelation festzustellen sei [24, 58] blieb bis 2016 ohne eindeutiges Ergebnis. Aufbauend auf den Ergebnissen von über 18 Studien, stellte die Meta-Analyse von Liang et al die wichtige Rolle der PNI in Rahmen des PDAC dar, wiesen sie als Faktor für eine reduzierte Überlebenschance aus und bestätigte somit die Integration der PNI in die TNM-Klassifikation durch die UICC [50]. Schon frühzeitig beschäftigten sich Arbeitsgruppen wie etwa Marchesi et al. mit der Ursachenforschung der neuralen Invasion und wiesen bereits im Jahr 2008 das Chemokinrezeptorpaar Fraktalkine/CX3CR1 als ein vielversprechendes Thema aus, um die perineurale Invasion und respektive die hohe Rezidivrate des PDAC genauer zu verstehen und gegebenenfalls potenzielle Wirkstoffe zur Inhibition dieses Prozesses ausfindig zu machen.

Zunächst wurde damals erstmalig sowohl die übermäßige Expression von CX3CR1 durch PDAC-Zelllinien (T3M4, AsPC-1, PANC-1, MiaPaCa2, u.v.w.) als auch die Produktion von membrangebundenem Fraktalkine durch intrapancreatische Nerven nachgewiesen. Weiterführend konnte auf der einen Seite gezeigt werden, dass die PDAC-Zelllinie MiaPaCa2 in Richtung eines Fraktalkinegradienten in vitro chemotaktisch migrieren und auf der anderen Seite sich Neuroblastom-Zelllinien im Rahmen eines Adhäsionsprozesses anheften, welche zuvor mittels TNF α /IFN γ zur Fraktalkineausschüttung stimuliert worden waren. Diese Prozesse zeigten eine Abhängigkeit von der Fraktalkinekonzentration, konnten durch eine CX3CR1-Antikörper-Behandlung aufgehoben werden und traten nicht ein bei MiaPaCa-Zellen ohne den CX3CR1-Rezeptor auf. Marchesi et al. legten somit die Vermutung nahe, dass die CX3CR1-Fraktalkine-Achse eine zentrale Rolle im Rahmen der PNI des PDAC einnimmt [55]. Anhand der vorgelegten Arbeit kann zunächst die Lücke zwischen Fraktalkine-abhängiger chemotaktischer Zellbewegung und PDAC-zu-Neuron-Adhäsion mittels des 3D-Migrationsassays geschlossen werden. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PDAC-Zelllinien eine deutlich gesteigertes Migrationsverhalten in Richtung der DRGs an den Tag legten als in Richtung des leeren Strukturgels, trotz Verzicht auf zu vorherige TNF α /IFN γ -Stimulation. Dabei stellt sowohl der Versuchsaufbau mittels ECM-Strukturgel als auch die Verwendung von frisch isolierten DRG eine Methodik dar, welche deutlich näher an den Bedingungen des PDAC in vivo liegt als bisher gezeigt. So simuliert das ECM-Gel mittels Kollagenen, Proteoglycanen und Glycoproteinen die extrazelluläre Matrix und damit den potentiellen Widerstand, welcher beispielsweise durch enzymatische Spaltung und Verdauung dieser Matrix durch die PDAC im Rahmen der zielgerichteten Migration überwunden werden muss, deutlich besser, als zuvor die Polykarbonmembran der Chemotaxis-Boyden-Kammer oder der Adhäsionstest bei PDAC-Neuroblastoma-Zellkontakt ohne Simulation von extrazellulärer Matrix. Weiterhin stellen die Spinalganglien einen deutlich diverseren Neuronalzellenverbund als die reine Neuroblastomzelllinie dar. Die von Marchesi et al. beschriebenen Auswirkungen der CX3CR1-Antikörper-Behandlung konnte im Rahmen des 3D-Migrationsassays nicht bestätigt werden. Die Behandlung durch den Compound AZD8797-Compound erreichte keine statistische Signifikanz zeigte hingegen einen deutlichen Trend zur Reduktion der zielgerichteten Migrationsparameter. An dieser Stelle wäre die zu vorherige Behandlung der DRGs durch TNF α bzw. IFN γ zu debattieren, um die Entzündungsreaktion des PDAC

in vivo zu simulieren und die daraus resultierende vermehrte Freisetzung des membrangebundenen Fraktalkine zu beobachten.

Der nächste Schritt bestand nun in der Untersuchung der ungezielten Migration ohne den Einfluss von Neuronen als Fraktalkinequelle durch die Erstellung von „scratch-Assays“. Es stellte sich zunächst heraus, dass sowohl die Zelllinie SU.86.86 als auch AsPC-1 aus solch großen Zellkörpern besteht, dass die freie Fläche bereits nach kürzester Zeit (ca. 4 Stunden) durch sich ausdehnende Zellen vollständig verdeckt worden war und somit für die Migrationsuntersuchung im Rahmen des Scratch-assays nur von sehr geringer Aussagekraft sein würden. Die Zelllinien T3M4 und PANC-1 hingegen konnten mit dieser Untersuchungsmethode über einen Zeitraum von 40 Stunden adäquat beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied anhand der Behandlung von CX3CR1-Antikörper oder AZD8797-Compound konnte hingegen nicht festgestellt werden. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass die CX3CR1-Fraktalkine-Achse keinen Einfluss auf die ungerichtete Migration hat und bestätigt somit im Umkehrschluss den Einfluss der DRG's bzw. des Fraktalkines auf Ergebnisse des 3D-Migrationsassays und die zielgerichtete Migration.

Der nächste Schritt bestand darin die Auswirkungen von Fraktalkine auf das Überleben und das Wachstum der PDAC-Zelllinien zu testen. Wie zuvor beschrieben, zeigten einige Chemokine darunter CXCL13/CXCR5 und CXCL12/CXCR4, wachstumsfördernde Effekte auf Karzinomzellen der Leber bzw. der Bauchspeicheldrüse [54, 59]. Somit wurde untersucht, ob Fraktalkine nicht nur, wie zuvor durch Marchesi et al beschrieben, einen schützenden Effekt unter apoptotischen Bedingungen (Interleukin 1 β , TNF α -Stimulation) sondern auch einen Wachstumsfördernden Effekt unter normal Bedingungen (5% FCS) auf die PDAC Zellen ausübt [55]. In diesem Zusammenhang wurden die PDAC-Zelllinien mit einer Titrationsreihe von 10, 50 und 100ng/ml Fraktalkine behandelt. In einem Zeitraum von 72 Stunden konnte bei den Zelllinien PANC-1, AsPC-1 und T3M4 kein Unterschied in den Proliferationsraten festgestellt werden. Im nächsten Schritt wurde der Effekt von 0,25 μ g/ml CX3CR1-Antikörper-Behandlung auf die Zelllinien untersucht und bereits nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion an Zellaktivität bzw. Zellüberleben festgestellt. Im Kontrast dazu zeigte der AZD8797-Compound keinerlei Auswirkungen auf die Überlebensrate der PDAC-Zelllinien. Durch Marchesi et al. konnte gezeigt werden, dass Fraktalkine unter apoptotischen Bedingungen das Überleben der Karzinomzellen fördert und die Zellen vor dem programmierten Zelltod schützt [55]. Später bestätigten Ren et al. diese Beobachtung und legten die Vermutung nahe, dass

dieser Effekt durch Steigerung der Glucoseaufnahme und vermehrte anaerobe Glykolyse durch die PDAC-Zellen als Folge der Fraktalkine-Stimulation erklärbar sei [70]. Unter Normalbedingungen hingegen, wie in dieser Arbeit gezeigt, zeigte eine Fraktalkine-Behandlung keine Auswirkung auf die Zellviabilität. Einzig die CX3CR1-Antikörperbehandlung wies einen antiproliferativen Effekt auf. Diese Erkenntnisse legten die Vermutung nahe, dass Fraktalkine auch in Abwesenheit von Neuronen durch PDAC-Zellen exprimiert werden, in gelöster oder membrangebundener Form auch unter Normalbedingungen die übrigen CX3CR1 sättigend stimulieren und zu den hohen Proliferationsraten der Karzinomzellen beitragen könne. Tatsächlich konnten zu einem späteren Zeitpunkt gezeigt werden, dass Fraktalkine unter anderem durch AsPC-1-Zellen exprimiert und unter Normalbedingungen vornehmlich in membrangebundener Form vorliegt [11, 74, 84]. Zusammenfassend lässt sich die Vermutung aufstellen, dass eine externe Fraktalkinequelle, wie z.B. Neurone, einen Einfluss auf das Überleben der PDAC unter den proapoptischen Bedingungen des Tumor-Milieus hat.

Im nächsten Schritt sollte die Frage nach einem potentiellen Signaltransduktionsweg geklärt werden, welcher den antiproliferativen Effekt der Antikörperbehandlung vermittelt. Anhand der Ergebnisse von Jamieson-Gladney et al., welche 2011 die zeitabhängige Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung aufgrund von 50nM Fraktalkine-Stimulation im Falle der CX3CR1-exprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-436 zeigen konnten [40], wurde die Aktivität des ERK1/2-Signalweges im Falle der PDAC-Zelllinie AsPC-1 untersucht. Dabei zeigten bereits Marchesi et al die überdurchschnittlich hohe CX3CR1-Expression durch die Zelllinie AsPC-1 im Vergleich zu anderen PDAC-Zelllinien [55]. Zunächst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Wachstumsfaktorentzug im Rahmen einer 0%FCS-Behandlung eine deutliche Abnahme der ERK1/2 Phosphorylierung und damit Deaktivierung dieses Signalweges hervorruft. Die alleinige Stimulation durch Fraktalkine führte hingegen zu keiner Zunahme der ERK1/2 Aktivität und auch die CX3CR1-Antikörperbehandlung hatte keine deutliche Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad des ERK1/2-Signaltransduktionsweges. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Fraktalkine/CX3CR1-Achse ihren antiapoptischen Effekt über einen anderen Signalweg induziert, etwa durch die Aktivierung von AKT, wie durch A. Brunet et al. im Jahr 1999 nahegelegt [9] und 2017 durch M.C. Stout bestätigt wurde [74]. In der Arbeit von M.C. Stout wird die Reduktion der Bewegungsmuster und Überlebensrate von PDAC durch die Inhibierung des CX3CR1 anhand eines molekularen Inhibitors postuliert. So konnte durch diese Inhibitorbehandlung eine signifikante Reduktion der

Fraktalkine-gerichteten, invasiven Migration der PDAC durch ein ECM-Gel gezeigt werden, ähnlich wie die tendenzielle Reduktion der gezielten Migration durch den AZD8797-Compound. Analog dazu beschränkte sich die Wirkung des molekularen Inhibitors auf die invasive Migration und zeigte keine Auswirkung auf das Überleben bzw. die Proliferation der PDAC-Zelllinien. Auf dem Boden dieser Erkenntnis scheint es vielversprechend die Auswirkungen des AZD8797-Compounds nicht nur in Bezug auf Karzinom-Neuron-Interaktion und lokale PNI sondern auch auf die Tumorprogression [11] und Fernmetastasierung in Richtung von CX3CL1-exprimierendem Gewebe wie etwa Lunge [34, 39, 85] oder Leber [57], weiter zu verfolgen.

Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom stellt bis heute die klinische Behandlung, Forschung und chirurgische Intervention vor große Herausforderungen, da in bis zu 60% der Fälle bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen vorliegen und eindeutige Früherkennungsmerkmale bis zum heutigen Tag fehlen. Weiterhin schränkt die lokale Ausbreitung in Arterien, Venen und nicht zuletzt in die Nerven die Hoffnung auf eine potentiell kurative R0 Resektion weiterhin ein. Diese neurale Invasion, welche mit der frühzeitigen Rezidivrate korreliert, hat einen direkten Einfluss auf die mittlere Überlebensrate von Pankreaskarzinompatienten. Aus diesem Grund erlangte die Tumor-Nerven-Interaktion in den letzten Jahrzehnten zunehmende Aufmerksamkeit sodass mittlerweile viele Mediatoren in diesem komplexen Kommunikationsnetzwerk identifiziert und auf ihre Wirkungen untersucht werden konnten. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die CX3CR1-Fraktalkine-Achse einen wichtigen Anteil in diesem Netzwerk einnimmt und dieser auf molekularer Ebene beeinflussbar ist. Dabei führt die stereochemische Inhibition zu keiner signifikanten Änderung der, auf DRG-Neuronen gerichteten, Migration oder weist zytotoxische Auswirkungen auf die PDAC-Zelllinien auf. Die Antikörperbehandlung zeigte auf der anderen Seite einen stark antiproliferativen Effekt auf diese Zelllinien. Der ERK1/2-Signaltransduktionsweg scheint in diesen Prozessen keine direkte Rolle zu spielen.

Diese neuen Erkenntnisse erweitern nicht nur das grundlegende Verständnis dieses hoch komplexen Sachverhaltes, sondern auch das Fenster für weitere potenzielle Behandlungsmethoden. Diese sind insbesondere in Bezug auf eine mögliche Unterbindung der Tumor-Neuronen-Interaktion bzw. der daraus resultierenden neuronalen Invasion wichtig, welche dringend benötigt werden, um einer Krankheit zu begegnen, deren Relevanz in Zukunft bedauerlicherweise weiter zunehmen wird.

Danksagung

Persönlicher Dank gilt vorab PD Dr. I. E. Demir und Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan für die Möglichkeit meinen Anteil zum weiteren Verständnis dieses komplexen Themas zu leisten und die stätige Bereitschaft mir nicht nur im Rahmen der Forschungsarbeit, sondern auch in der beruflichen Weiterentwicklung zur Seite zu stehen.

Nachfolgend möchte ich ein ganz großes Dankeschön an meinen Betreuer und Freund PD Dr. Jan D'Haese für seine stets schnelle, konkrete und konstruktive Kritik und Zusammenarbeit aussprechen, welche sowohl das Fertigstellen der Arbeit, als auch die Poster-Präsentation der ersten Ergebnisse im Rahmen des „Deutschen Pankreas Club 2012“ ermöglichte.

Im Weiteren gilt mein Dank der gesamten Forschungsgruppe „chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom“ am Klinikum rechts der Isar und besonders der stets freundlichen und kompetenten Unterstützung durch Frau Ulrike Bourquain sowie dem unermüdlichen Eifer und Erfahrungsschatzes von PD Dr. Dr. Ekin Demir.

Schlussendlich möchte ich noch meinen Eltern Bernd und Dorothea Winckler, meinen Freunden Dominique Cathy, Johannes Langer, Maxim Wandrowski und Roman Zitlau für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen meinen tiefen Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis

1. A, A.G., T.M. G, R.G. S, S.A. W, and M.E.-S. A, *Molluscicidal Activity of the Methanol Extract of Callistemon viminalis (Sol. ex Gaertner) G.Don ex Loudon Fruits: Bark and Leaves against Biomphalaria alexandrina Snails*. Iran J Pharm Res, 2014. **13**(2): p. 505-14.
2. Alexakis, N., C. Halloran, M. Raraty, P. Ghaneh, R. Sutton, and J.P. Neoptolemos: *Current standards of surgery for pancreatic cancer*. Br J Surg, 2004. **91**(11): p. 1410-27.
3. Andres, R., A. Forgie, S. Wyatt, Q. Chen, F.J. de Sauvage, and A.M. Davies: *Multiple effects of artemin on sympathetic neurone generation, survival and growth*. Development, 2001. **128**(19): p. 3685-95.
4. Batsakis, J.G.: *Nerves and neurotropic carcinomas*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1985. **94**(4 Pt 1): p. 426-7.
5. Bazan, J.F., K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, and T.J. Schall: *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
6. Bhuiya, M.R., Y. Nimura, J. Kamiya, S. Kondo, S. Fukata, N. Hayakawa, and S. Shionoya: *Clinicopathologic studies on perineural invasion of bile duct carcinoma*. Ann Surg, 1992. **215**(4): p. 344-9.
7. Bockman, D.E., M. Buchler, and H.G. Beger: *Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage*. Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 219-30.
8. Brown, I.S.: *Pathology of Perineural Spread*. J Neurol Surg B Skull Base, 2016. **77**(2): p. 124-30.
9. Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg: *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
10. Cardona, A.E., E.P. Pioro, M.E. Sasse, V. Kostenko, S.M. Cardona, I.M. Dijkstra, D. Huang, G. Kidd, S. Dombrowski, R. Dutta, J.C. Lee, D.N. Cook, S. Jung, S.A. Lira, D.R. Littman, and R.M. Ransohoff: *Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor*. Nat Neurosci, 2006. **9**(7): p. 917-24.
11. Celesti, G., G. Di Caro, P. Bianchi, F. Grizzi, F. Marchesi, G. Basso, D. Rahal, G. Delconte, M. Catalano, P. Cappello, M. Roncalli, A. Zerbi, M. Montorsi, F. Novelli, A. Mantovani, P. Allavena, A. Malesci, and L. Laghi: *Early expression of the fractalkine receptor CX3CR1 in pancreatic carcinogenesis*. Br J Cancer, 2013. **109**(9): p. 2424-33.
12. Ceyhan, G.O., F. Bergmann, M. Kadihasanoglu, B. Altintas, I.E. Demir, U. Hinz, M.W. Muller, T. Giese, M.W. Buchler, N.A. Giese, and H. Friess: *Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 177-186 e1.
13. Ceyhan, G.O., I.E. Demir, B. Altintas, U. Rauch, G. Thiel, M.W. Muller, N.A. Giese, H. Friess, and K.H. Schafer: *Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(3): p. 442-7.
14. Ceyhan, G.O., I.E. Demir, U. Rauch, F. Bergmann, M.W. Muller, M.W. Buchler, H. Friess, and K.H. Schafer: *Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(10): p. 2555-65.

15. Ceyhan, G.O., N.A. Giese, M. Erkan, A.G. Kerscher, M.N. Wente, T. Giese, M.W. Buchler, and H. Friess: *The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion*. *Ann Surg*, 2006. **244**(2): p. 274-81.
16. Ceyhan, G.O., K.H. Schafer, A.G. Kerscher, U. Rauch, I.E. Demir, M. Kadihasanoglu, C. Bohm, M.W. Muller, M.W. Buchler, N.A. Giese, M. Erkan, and H. Friess: *Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma*. *Ann Surg*, 2010. **251**(5): p. 923-31.
17. Conroy, T., P. Hammel, M. Hebbar, M. Ben Abdelghani, A.C. Wei, J.L. Raoul, L. Chone, E. Francois, P. Artru, J.J. Biagi, T. Lecomte, E. Assenat, R. Faroux, M. Ychou, J. Volet, A. Sauvanet, G. Breysacher, F. Di Fiore, C. Cripps, P. Kavan, P. Texereau, K. Bouhier-Leporrier, F. Khemissa-Akouz, J.L. Legoux, B. Juzyna, S. Gourgou, C.J. O'Callaghan, C. Jouffroy-Zeller, P. Rat, D. Malka, F. Castan, J.B. Bachet, G. Canadian Cancer Trials, and G.I.P.G. the Unicancer: *FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(25): p. 2395-2406.
18. D'Haese, J.G., I.E. Demir, H. Friess, and G.O. Ceyhan: *Fractalkine/CX3CR1: why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential*. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(2): p. 207-19.
19. D'Haese, J.G., B.W. Renz, and J. Werner: *Aktuelle Standards und Perspektiven in der Chirurgie des Pankreaskarzinoms*. *Der Onkologe*, 2019. **25**(8): p. 661-668.
20. Demir, I.E., G.O. Ceyhan, F. Liebl, J.G. D'Haese, M. Maak, and H. Friess: *Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future*. *Cancers (Basel)*, 2010. **2**(3): p. 1513-27.
21. Demir, I.E., H. Friess, and G.O. Ceyhan: *Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 97.
22. Demir, I.E., H. Friess, and G.O. Ceyhan: *Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015. **12**(11): p. 649-59.
23. Ducreux, M., A.S. Cuhna, C. Caramella, A. Hollebecque, P. Burtin, D. Goere, T. Seufferlein, K. Haustermans, J.L. Van Laethem, T. Conroy, D. Arnold, and E.G. Committee: *Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2015. **26 Suppl 5**: p. v56-68.
24. Garcea, G., A.R. Dennison, C.J. Pattenden, C.P. Neal, C.D. Sutton, and D.P. Berry: *Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature*. *JOP*, 2008. **9**(2): p. 99-132.
25. Garton, K.J., P.J. Gough, C.P. Blobel, G. Murphy, D.R. Greaves, P.J. Dempsey, and E.W. Raines: *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
26. Gasparini, G., M. Pellegatta, S. Crippa, M.S. Lena, G. Belfiori, C. Doglioni, C. Taveggia, and M. Falconi: *Nerves and Pancreatic Cancer: New Insights into a Dangerous Relationship*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(7).
27. Ghaneh, P., E. Costello, and J.P. Neoptolemos: *Biology and management of pancreatic cancer*. *Gut*, 2007. **56**(8): p. 1134-52.
28. Gil, L., M. Azanedo, M. Pollan, E. Cristobal, B. Arribas, L. Garcia-Albert, A. Garcia-Saiz, M.L. Maestro, A. Torres, J. Menarguez, and J.M. Rojas: *Genetic analysis of RET, GFR alpha 1 and GDNF genes in Spanish families with multiple endocrine neoplasia type 2A*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(2): p. 299-304.
29. Gillen, S., T. Schuster, C. Meyer Zum Buschenfelde, H. Friess, and J. Kleeff: *Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review*

- and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med*, 2010. **7**(4): p. e1000267.
30. Hartwig, W., T. Hackert, U. Hinz, M. Hassenpflug, O. Strobel, M.W. Buchler, and J. Werner: *Multivisceral resection for pancreatic malignancies: risk-analysis and long-term outcome*. *Ann Surg*, 2009. **250**(1): p. 81-7.
 31. Heinemann, V., M. Haas, and S. Boeck: *Systemic treatment of advanced pancreatic cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2012. **38**(7): p. 843-53.
 32. Hesse, U.J., C. DeDecker, P. Houtmeyers, P. Demetter, W. Ceelen, P. Pattyn, R. Troisi, and B. deHemptinne: *Prospectively randomized trial using perioperative low-dose octreotide to prevent organ-related and general complications after pancreatic surgery and pancreatico-jejunostomy*. *World J Surg*, 2005. **29**(10): p. 1325-8.
 33. Honma, Y., T. Araki, S. Gianino, A. Bruce, R. Heuckeroth, E. Johnson, and J. Milbrandt: *Artemin is a vascular-derived neurotrophic factor for developing sympathetic neurons*. *Neuron*, 2002. **35**(2): p. 267-82.
 34. Huang, X., Y. Zeng, Y. Jiang, Y. Qin, W. Luo, S. Xiang, S.R. Sooranna, and L. Pinhu: *Lipopolysaccharide-Binding Protein Downregulates Fractalkine through Activation of p38 MAPK and NF-kappaB*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 9734837.
 35. Hundhausen, C., D. Misztela, T.A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K.J. Kallen, S. Rose-John, and A. Ludwig: *The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion*. *Blood*, 2003. **102**(4): p. 1186-95.
 36. Huttner, F.J., C. Fitzmaurice, G. Schwarzer, C.M. Seiler, G. Antes, M.W. Buchler, and M.K. Diener: *Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **2**: p. CD006053.
 37. Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, and O. Yoshie: *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 521-30.
 38. Isaji, S., S. Mizuno, J.A. Windsor, C. Bassi, C. Fernandez-Del Castillo, T. Hackert, A. Hayasaki, M.H.G. Katz, S.W. Kim, M. Kishiwada, H. Kitagawa, C.W. Michalski, and C.L. Wolfgang: *International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017*. *Pancreatology*, 2018. **18**(1): p. 2-11.
 39. Isozaki, T., K. Otsuka, M. Sato, R. Takahashi, K. Wakabayashi, N. Yajima, Y. Miwa, and T. Kasama: *Synergistic induction of CX3CL1 by interleukin-1beta and interferon-gamma in human lung fibroblasts: involvement of signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathways*. *Transl Res*, 2011. **157**(2): p. 64-70.
 40. Jamieson-Gladney, W.L., Y. Zhang, A.M. Fong, O. Meucci, and A. Fatatis: *The chemokine receptor CX(3)CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(5): p. R91.
 41. Kameda, K., H. Shimada, T. Ishikawa, A. Takimoto, N. Momiyama, S. Hasegawa, K. Misuta, A. Nakano, Y. Nagashima, and Y. Ichikawa: *Expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in pancreatic cancer neural invasive lesion*. *Cancer Lett*, 1999. **137**(2): p. 201-7.
 42. Kayahara, M., H. Nakagawara, H. Kitagawa, and T. Ohta: *The nature of neural invasion by pancreatic cancer*. *Pancreas*, 2007. **35**(3): p. 218-23.

43. Kleeff, J., T. Kusama, D.L. Rossi, T. Ishiwata, H. Maruyama, H. Friess, M.W. Buchler, A. Zlotnik, and M. Korc: *Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(4): p. 650-7.
44. Knudsen, J.B., T. Nilsson, M. Sprechler, A. Johansen, and N. Christensen: *Venous and nerve invasion as prognostic factors in postoperative survival of patients with resectable cancer of the rectum*. *Dis Colon Rectum*, 1983. **26**(9): p. 613-7.
45. Koninger, J., P. Balaz, M. Wagner, X. Shi, I. Cima, A. Zimmermann, P. di Sebastiano, M.W. Buchler, and H. Friess: *Phosphatidylserine receptor in chronic pancreatitis: evidence for a macrophage independent role*. *Ann Surg*, 2005. **241**(1): p. 144-51.
46. Koshiba, T., R. Hosotani, Y. Miyamoto, J. Ida, S. Tsuji, S. Nakajima, M. Kawaguchi, H. Kobayashi, R. Doi, T. Hori, N. Fujii, and M. Imamura: *Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(9): p. 3530-5.
47. Kujath, P., R. Bouchard, J. Scheele, and H. Esnaashari: *[Current perioperative antibiotic prophylaxis]*. *Chirurg*, 2006. **77**(6): p. 490, 492-8.
48. Larson, D.L., A.E. Rodin, D.K. Roberts, W.K. O'Steen, A.S. Rapperport, and S.R. Lewis: *Perineural lymphatics: myth or fact*. *Am J Surg*, 1966. **112**(4): p. 488-92.
49. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan: *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(2): p. 329-33.
50. Liang, D., S. Shi, J. Xu, B. Zhang, Y. Qin, S. Ji, W. Xu, J. Liu, L. Liu, C. Liu, J. Long, Q. Ni, and X. Yu: *New insights into perineural invasion of pancreatic cancer: More than pain*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1865**(2): p. 111-22.
51. Liebl, F., I.E. Demir, K. Mayer, T. Schuster, J.G. D'Haese, K. Becker, R. Langer, F. Bergmann, K. Wang, R. Rosenberg, A.R. Novotny, M. Feith, D. Reim, H. Friess, and G.O. Ceyhan: *The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study*. *Ann Surg*, 2014. **260**(5): p. 900-7; discussion 907-8.
52. Liebl, F., I.E. Demir, R. Rosenberg, A. Boldis, E. Yildiz, K. Kujundzic, T. Kehl, D. Dischl, T. Schuster, M. Maak, K. Becker, R. Langer, M. Laschinger, H. Friess, and G.O. Ceyhan: *The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(1): p. 50-61.
53. Liu, B. and K.Y. Lu: *Neural invasion in pancreatic carcinoma*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2002. **1**(3): p. 469-76.
54. Marchesi, F., P. Monti, B.E. Leone, A. Zerbi, A. Vecchi, L. Piemonti, A. Mantovani, and P. Allavena: *Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4*. *Cancer Res*, 2004. **64**(22): p. 8420-7.
55. Marchesi, F., L. Piemonti, G. Fedele, A. Destro, M. Roncalli, L. Albarello, C. Doglioni, A. Anselmo, A. Doni, P. Bianchi, L. Laghi, A. Malesci, L. Cervo, M. Malosio, M. Reni, A. Zerbi, V. Di Carlo, A. Mantovani, and P. Allavena: *The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Cancer Res*, 2008. **68**(21): p. 9060-9.
56. Masiak-Segit, W., K. Rawicz-Pruszyński, M. Skorzevska, and W.P. Polkowski: *Surgical treatment of pancreatic cancer*. *Pol Przegl Chir*, 2018. **90**(2): p. 45-53.

57. Matsubara, T., T. Ono, A. Yamanoi, M. Tachibana, and N. Nagasue: *Fractalkine-CX3CR1 axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma*. J Surg Oncol, 2007. **95**(3): p. 241-9.
58. Meduri, F., F. Diana, R. Merenda, L. Losacco, A. Zuin, A. Cecchetto, G.E. Gerunda, D. Neri, F. Zangrandi, and A. Maffei-Faccioli: *Pancreatic cancer and retroperitoneal neural tissue invasion. Its implication for survival following radical surgery*. Zentralbl Pathol, 1994. **140**(3): p. 277-9.
59. Meijer, J., I.S. Zeelenberg, B. Sipos, and E. Roos: *The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9576-82.
60. Mihaljevic, A.L. and H. Friess: *Operatives Vorgehen bei zystischen Pankreastumoren: Radikale Resektion und organerhaltende Resektion*. Viszeralmedizin, 2011. **27**(3): p. 214-224.
61. Mitchem, J.B., N. Hamilton, F. Gao, W.G. Hawkins, D.C. Linehan, and S.M. Strasberg: *Long-term results of resection of adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas using radical antegrade modular pancreatectomy procedure*. J Am Coll Surg, 2012. **214**(1): p. 46-52.
62. Mosmann, T.: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
63. Muller, 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. Verastegui, and A. Zlotnik: *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
64. Neoptolemos, J.P., D.D. Stocken, C. Bassi, P. Ghaneh, D. Cunningham, D. Goldstein, R. Padbury, M.J. Moore, S. Gallinger, C. Mariette, M.N. Wenthe, J.R. Izbicki, H. Friess, M.M. Lerch, C. Dervenis, A. Olah, G. Butturini, R. Doi, P.A. Lind, D. Smith, J.W. Valle, D.H. Palmer, J.A. Buckels, J. Thompson, C.J. McKay, C.L. Rawcliffe, M.W. Buchler, and C. European Study Group for Pancreatic: *Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial*. JAMA, 2010. **304**(10): p. 1073-81.
65. Ozaki, H., T. Hiraoka, R. Mizumoto, S. Matsuno, Y. Matsumoto, T. Nakayama, T. Tsunoda, T. Suzuki, M. Monden, Y. Saitoh, H. Yamauchi, and Y. Ogata: *The prognostic significance of lymph node metastasis and intrapancreatic perineural invasion in pancreatic cancer after curative resection*. Surg Today, 1999. **29**(1): p. 16-22.
66. Pan, Y., C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J. Deeds, J.A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselin, J. Ma, B. Dussault, E. Woolf, G. Alperin, J. Culpepper, J.C. Gutierrez-Ramos, and D. Gearing: *Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 611-7.
67. Pleskow, D.K., H.J. Berger, J. Gyves, E. Allen, A. McLean, and D.K. Podolsky: *Evaluation of a serologic marker, CA19-9, in the diagnosis of pancreatic cancer*. Ann Intern Med, 1989. **110**(9): p. 704-9.
68. Pour, P.M., R.H. Bell, and S.K. Batra: *Neural invasion in the staging of pancreatic cancer*. Pancreas, 2003. **26**(4): p. 322-5.
69. Quante, A.S., C. Ming, M. Rottmann, J. Engel, S. Boeck, V. Heinemann, C.B. Westphalen, and K. Strauch: *Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030*. Cancer Med, 2016. **5**(9): p. 2649-56.

70. Ren, H., T. Zhao, J. Sun, X. Wang, J. Liu, S. Gao, M. Yu, and J. Hao: *The CX3CL1/CX3CR1 reprograms glucose metabolism through HIF-1 pathway in pancreatic adenocarcinoma*. J Cell Biochem, 2013. **114**(11): p. 2603-11.
71. Schorn, S., I.E. Demir, B. Haller, F. Scheufele, C.M. Reyes, E. Tieftrunk, M. Sargut, R. Goess, H. Friess, and G.O. Ceyhan: *The influence of neural invasion on survival and tumor recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma - A systematic review and meta-analysis*. Surg Oncol, 2017. **26**(1): p. 105-115.
72. Seufferlein, T., M. Porzner, T. Becker, V. Budach, G. Ceyhan, I. Esposito, R. Fietkau, M. Follmann, H. Friess, P. Galle, M. Geissler, M. Glanemann, T. Gress, V. Heinemann, W. Hohenberger, U. Hopt, J. Izbicki, E. Klar, J. Kleeff, I. Kopp, F. Kullmann, T. Langer, J. Langrehr, M. Lerch, M. Lohr, J. Luttges, M. Lutz, J. Mayerle, P. Michl, P. Moller, M. Molls, M. Munter, M. Nothacker, H. Oettle, S. Post, A. Reinacher-Schick, C. Rocken, E. Roeb, H. Saeger, R. Schmid, W. Schmiegel, M. Schoenberg, J. Siveke, M. Stuschke, A. Tannapfel, W. Uhl, S. Unverzagt, B. van Oorschot, Y. Vashist, J. Werner, E. Yekebas, A. Guidelines Programme Oncology, V. German Cancer Society e, and A. German Cancer: *[S3-guideline exocrine pancreatic cancer]*. Z Gastroenterol, 2013. **51**(12): p. 1395-440.
73. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal: *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
74. Stout, M.C., S. Narayan, E.S. Pillet, J.M. Salvino, and P.M. Campbell: *Inhibition of CX3CR1 reduces cell motility and viability in pancreatic adenocarcinoma epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **495**(3): p. 2264-2269.
75. Strasberg, S.M., J.A. Drebin, and D. Linehan: *Radical antegrade modular pancreatosplenectomy*. Surgery, 2003. **133**(5): p. 521-7.
76. Strobel, O., T. Hank, U. Hinz, F. Bergmann, L. Schneider, C. Springfield, D. Jager, P. Schirmacher, T. Hackert, and M.W. Buchler: *Pancreatic Cancer Surgery: The New R-status Counts*. Ann Surg, 2017. **265**(3): p. 565-573.
77. Takahashi, T., H. Ishikura, T. Motohara, S. Okushiba, M. Dohke, and H. Katoh: *Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas*. J Surg Oncol, 1997. **65**(3): p. 164-70.
78. Toomey, P., J. Hernandez, F. Golkar, S. Ross, K. Luberic, and A. Rosemurgy: *Pancreatic adenocarcinoma: complete tumor extirpation improves survival benefit despite larger tumors for patients who undergo distal pancreatectomy and splenectomy*. J Gastrointest Surg, 2012. **16**(2): p. 376-81.
79. van Erning, F.N., T.M. Mackay, L.G.M. van der Geest, B. Groot Koerkamp, H.W.M. van Laarhoven, B.A. Bonsing, J.W. Wilmink, H.C. van Santvoort, J. de Vos-Geelen, C.H.J. van Eijck, O.R. Busch, V.E. Lemmens, M.G. Besselink, and G. Dutch Pancreatic Cancer: *Association of the location of pancreatic ductal adenocarcinoma (head, body, tail) with tumor stage, treatment, and survival: a population-based analysis*. Acta Oncol, 2018. **57**(12): p. 1655-1662.
80. Villers, A., J.E. McNeal, E.A. Redwine, F.S. Freiha, and T.A. Stamey: *The role of perineural space invasion in the local spread of prostatic adenocarcinoma*. J Urol, 1989. **142**(3): p. 763-8.
81. Von Hoff, D.D., T. Ervin, F.P. Arena, E.G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S.A. Tjulandin, W.W. Ma, M.N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R.K. Ramanathan, J. Tabernero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias, and M.F. Renschler: *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. N Engl J Med, 2013. **369**(18): p. 1691-703.

82. Wagner, M., C. Redaelli, M. Lietz, C.A. Seiler, H. Friess, and M.W. Buchler: *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Br J Surg, 2004. **91**(5): p. 586-94.
83. Wehler, T., F. Wolfert, C.C. Schimanski, I. Gockel, W. Herr, S. Biesterfeld, J.K. Seifert, H. Adwan, M.R. Berger, T. Junginger, P.R. Galle, and M. Moehler: *Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease*. Oncol Rep, 2006. **16**(6): p. 1159-64.
84. Xu, X., Y. Wang, J. Chen, H. Ma, Z. Shao, H. Chen, and G. Jin: *High expression of CX3CL1/CX3CR1 axis predicts a poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Gastrointest Surg, 2012. **16**(8): p. 1493-8.
85. Zhang, J., H. Hu, N.L. Palma, J.K. Harrison, K.K. Mubarak, R.D. Carrie, H. Alnuaimat, X. Shen, D. Luo, and J.M. Patel: *Hypoxia-induced endothelial CX3CL1 triggers lung smooth muscle cell phenotypic switching and proliferative expansion*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(10): p. L912-22.
86. Zhu, Z., H. Friess, F.F. diMola, A. Zimmermann, H.U. Graber, M. Korc, and M.W. Buchler: *Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 1999. **17**(8): p. 2419-28.
87. Zlotnik, A. and O. Yoshie: *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.

Tabellenverzeichnis

Bezeichnung	Seite
Tabelle 1: TNM-Klassifikation, Exokrines Pankreaskarzinom	4
Kakar S, Pawlik TM, Allen PJ, Vauthey JN. Exocrine pancreas. Pancreatic adenocarcinoma. In:AJCC Cancer Staging Manual(8thEdition). Springer-Verlag, New York, USA (2016).	
Tabelle 2: ECOG Performance Status	5
Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol. 1982;5:649-55. PMID: 7165009	
Tabelle 3: ABC-Kriterien der Resektabilität	6
International Association of Pancreatology (IAP), Konsensus, S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Dez. 2021	
Tabelle 4: perineurale Invasiön, TNM-Klassifikation	11
TNM Classification of Malignant Tumours, 7th Edition, Leslie H. Sobin, Mary K. Gospodarowicz, Christian Wittekind, Wiley-Blackwell, New Jersey, 2011	

Abbildungsverzeichnis

Bezeichnung	Seite
Abb. 1: pyloruserhaltenden partiellen Duodenopankreatektomie (nach T.-L.)	7
AMBOSS GmbH; Name der Abbildung: OP-Prinzip der pyloruserhaltenden partiellen Duodenopankreatektomie (nach Traverso-Longmire), Kapitel: Pankreas und Leberchirurgie, [Kapitel zuletzt aktualisiert am: 02.07.2020; Kapitel zitiert am: 25.08.2019; https://www.amboss.com/de/wissen/pankreaskarzinom	
Abb. 2: partiellen Duodenopankreatektomie (nach Whipple-Kausch)	9
AMBOSS GmbH; Name der Abbildung: OP-Prinzip der partiellen Duodenopankreatektomie (nach Whipple-Kausch), Kapitel: Pankreas und Leberchirurgie, [Kapitel zuletzt aktualisiert am: 02.07.2020 ; Kapitel zitiert am: 25.08.2019; https://www.amboss.com/de/wissen/pankreaskarzinom	
<i>Die Darstellung der Abbildungen (1-2.) erfolgen mit freundlicher Genehmigung durch AMBOSS GmbH, S. Lickes, B. Sc. Customer Support DE, 20.07.2020</i>	
Abb. 3: Pankreaslinksresektion mit Splenektomie	10
Kantonsspital Baden, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Baden, Schweiz; https://www.kantonsspitalbaden.ch/Schwerpunkte/Viszeralonkologisches-Zentrum/Pankreaszentrum/Therapie-Pankreaszentrum/index.html	
<i>Die Darstellung der Abbildungen 3. erfolgen mit freundlicher Genehmigung durch O. Gisler, Leiter Marketing und Kommunikation KSB, Kantonsspital Baden AG, 31.08.2020</i>	
Abb. 4: Scratch-Assay zeitlicher Verlauf (0-40 Stunden)	23
Abb. 5: Migration-Assay Übersicht	25
Abb. 6: Chemotaxis - akk./eucl. Distanz	27
Instructions Chemotaxis and Migration Tool 2.0 © ibidi GmbH, Version 1.0, Yuki Asano, Elias Horn, March 09th, 2011	
Abb. 7: Chemotaxis – Directionality	28
Instructions Chemotaxis and Migration Tool 2.0 © ibidi GmbH, Version 1.0, Yuki Asano, Elias Horn, March 09th, 2011	
Abb. 8: Chemotaxis – FMI	29
Instructions Chemotaxis and Migration Tool 2.0 © ibidi GmbH, Version 1.0, Yuki Asano, Elias Horn, March 09th, 2011	
<i>Die Darstellung der Abbildungen 6-8 erfolgen mit freundlicher Genehmigung durch C. Oeri, Sales & Application Specialist, ibidi GmbH, Lochhamer Schlag 11, 82166 Gräfelfing, Germany, 22.07.2022</i>	
Abb. 9: Migration-Assay Migrationsfront-Auswertung	33

Abb. 10: Richtungsgenauigkeit und x-FMI	34
Abb. 11: Euklidische Migrationsdistanz und Geschwindigkeit	35
Abb. 12: Richtungsgenauigkeit und x-FMI nach CX3CR1-Antikörper-Behandlung	37
Abb. 13: euklidische Migrationsdistanz und Geschwindigkeit nach CX3CR1-Antikörper-Behandlung	38
Abb. 14: Richtungsgenauigkeit und x-FMI nach AZD8797-Compound-Behandlung	39
Abb. 15: euklidische Migrationsdistanz und Geschwindigkeit nach AZD8797-Compound-Behandlung	40
Abb. 16: Area under the curve (AUC) der zell-freien Fläche von PANC-1 nach AZD8797-Compound bzw. CX3CR1-Antikörper-Behandlung	41
Abb. 17: Area under the curve (AUC) der zellfreien Fläche von T3M4 nach AZD8797-Compound bzw. CX3CR1-Antikörper-Behandlung	42
Abb. 18: Zellviabilität von PDAC-Zelllinien unter Fraktalkine-Behandlung	43
Abb. 19: Zellviabilität von PDAC-Zelllinien unter CX3CR1-Antikörper-Behandlung	44
Abb. 20: Effekt von NaN₃ auf Viabilität	46
Abb. 21: Zellviabilität von PDAC-Zelllinien unter AZD8797-Compound-Behandlung	47
Abb. 22: Phosphorylierung von ERK1/2 unter FCS-Entzug bei AsPC-1	49
Abb. 23: Phosphorylierung von ERK1/2 unter FCS-Entzug und Fraktalkine-Stimulation bei AsPC-1. pERK1/2-Hemmstoff U0126 dient als Kontrolle	50
Abb. 24: Phosphorylierung von ERK1/2 unter FCS-Entzug, CX3CR1-Antikörper-Behandlung und Fraktalkine-Stimulation bei AsPC-1	52

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
UICC	Union for International Cancer Control
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
CA19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
FOLFIRINOX	Fluoruracin, Folsäure, Irinotecan und Oxalplatin
RAMPS	radical antegrade modular panreatosplenectomy procedure
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HBSS	Hank's balanced salt solution
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
PBS	Phosphate buffered saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular Matrix
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IgG	Immunglobulin G
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
pERK	phosphorylised Extracellular-signal Regulated Kinases
ECL	enhanced chemiluminescence
APS	Ammoniumpersulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ATCC	American Type Culture Collection
FCS	Fetal calf Serum
MW	Molecular Weight
DRG	Dorsal root ganglion, dorsale Wurzelganglien
FMI	Forward Migration Index
MEM	Minimum Essential Media
FKN	Fraktalkine/CX3CL1
LSB	Laemmli sample buffer
AUC	Area under the curve
X-FMI	Forward Migration Index relativ zur X-Achse
p-ERK1/2	Phospho-extracellular-signal related Kinases
BSA	Bovine serum albumin
PVDF	Polyvinylidene fluoride
AZD8797	stereochemischer CX3CR1-Inhibitor
U0126	stereochemischer p-ERK1/2-Inhibitor
AK	Antikörper
PNI	Perineurale Invasion
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
IFN γ	Interferon γ
AKT	Proteinkinase B

